



Thèse de doctorat

de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité ED 562

Institut Jacques Monod | Equipe Mécanotransduction : de la surface de la cellule à son noyau

Mécanotransduction au complexe E-cadhérine/β-caténine lors de la transition épithelio-mésenchymateuse

Par Charlène GAYRARD

Thèse de doctorat de Biophysique-Biologie Cellulaire

Dirigée par Nicolas BORGHI

Présentée et soutenue publiquement à Paris, le 25 Septembre 2017

Président du jury :	HENON, Sylvie - Professeur - Université Paris Diderot
Rapporteurs :	DUFOUR, Sylvie - Directrice de Recherche - Institut Mondor SILBERZAN, Pascal - Directeur de Recherche - Institut Curie
Examinateurs :	FAUROBERT, Eva - Chargée de Recherche - Institut pour l'Avancée des Biosciences FARGE, Emmanuel - Directeur de Recherche - Institut Curie
Directeur de thèse :	BORGHI, Nicolas - Chargé de Recherche - Institut Jacques Monod
Membre invité :	COPPEY-MOISAN, Maité - Emérite - Institut Jacques Monod

© (i) (creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

<u>Titre</u> : Mécanotransduction au complexe E-cadhérine/β-caténine lors de la transition épitheliomésenchymateuse

Résumé :

Dans les organismes multicellulaires, les cellules génèrent et subissent des forces mécaniques qui se propagent aux cellules voisines. Ces forces peuvent déterminer la forme des tissus et organes, et aussi être converties en signaux biochimiques. Dans un épithélium, les cellules forment un tissu en adhérant directement les unes aux autres grâce à des complexes d'adhérence, tels que les Jonctions Adhérentes. Ces Jonctions Adhérentes sont composées de protéines transmembranaires les E-cadhérines, dont la partie cytoplasmique est sous tension générée par le cytosquelette d'actomyosine par un lien assurée par la β -caténine. La β -caténine est aussi un cofacteur de transcription majeur qui régule l'activité de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse une fois dans le noyau. L'accumulation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de la β -caténine peuvent avoir lieu à la suite de stimulations mécaniques dans des situations physiologiques et pathologiques, et ont été proposées comme la conséquence d'une libération de la β -caténine des Jonctions. Adhérentes suite à sa phosphorylation. Néanmoins, les preuves directes de ce phénomène et ses mécanismes manquent, et le rôle qu'y tient la tension des E-cadhérines n'est pas connu.

Dans cette thèse, nous avons établi la relation entre la tension des E-cadhérines et la localisation nucléaire et l'activité de la β -caténine, prouvé l'existence d'une translocation de la membrane au noyau de la β -caténine, et caractérisé les mécanismes moléculaires sous-jacents dans des cellules en migration induite par un facteur de croissance ou par blessure sur un épithélium, deux conditions qui récapitulent au moins partiellement une transition épithélio-mésenchymateuse.

Nous avons montré que l'accumulation nucléaire de la β-caténine est due à un départ substantiel de celle-ci de la membrane, spécifiquement dans les cellules en migration. Cette translocation a lieu en aval d'une voie de signalisation impliquant les kinases Src et FAK, et qui conduit à une relaxation de tension des E-cadhérines. Le mécanisme sous-jacent implique une réorganisation du cytosquelette d'actine, caractérisé par un enrichissement des fibres des stress ventrales, soutenant les protrusions, en phospho-myosine, au détriment du cortex d'actine des Jonctions Adhérentes. En revanche, les phosphorylations dans le complexe cadhérine/caténine ne sont pas requises. Ces résultats démontrent que les E-cadhérines ont un rôle de senseur de la mécanique intracellulaire, et que les adhésions focales sont impliquées dans l'activation de la voie de signalisation β-caténine.

<u>Mots clefs</u> : Jonction Adhérente | E-cadhérine | Voie de signalisation β-caténine | Microscopie FRET | Mécanotransduction | Transition épithelio-mésenchymateuse

$\underline{Title}: Mechanotransduction at E-cadherin/\beta-catenin complex during Epithelial-to-Mesenchyme Transition$

Abstract :

In multicellular organisms, cells generate and experience mechanical forces that propagate between and within cells. These forces may shape cells, tissues and organs, and also convert into biochemical signals. In a simple epithelium, cells form tissue sheets by directly adhering to one another through adhesion complexes, such as the Adherens Junctions. Adherens Junctions comprise transmembrane proteins E-cadherins, which are under actomyosin-generated tension via a link that contains β -catenin is also a major transcription cofactor that regulates gene activity associated with Epithelial-to-Mesenchyme Transition when translocated in the nucleus. β -catenin nuclear localization and transcriptional activity are mechanically inducible in a variety of healthy and disease models and were proposed to follow phosphorylation-induced \mathbb{P} -catenin release from E-cadherin. However, direct evidence for this translocation and these mechanisms are lacking, and whether E-cadherin tension is involved is unknown.

In this thesis, we assess the relationship between E-cadherin tension and β -catenin nuclear localization and activity, determine the relevance of β -catenin shuttling between membrane and nucleus, and characterize the underlying molecular mechanisms in cells migrating in an at least partial EMT-like fashion upon hepatocyte growth factor (HGF) or wound stimulation.

We showed that β -catenin nuclear activity follows a substantial release from the membrane that is specific to migrating cells. This translocation occurs downstream of the Src-FAK pathway, which targets E-cadherin tension relaxation. The underlying mechanisms sufficiently involve actomyosin remodeling, characterized by an enrichment of ventral stress fibers that capture phosphomyosin at the expense of the cortex at Adherens Junctions. In contrast, phosphorylations of the cadherin/catenin complex are not substantially required. These data demonstrate that E-cadherin acts as a sensor of intracellular mechanics in a crosstalk with cell-substrate adhesions that targets β -catenin signaling.

<u>Keywords</u> : Adherens Junctions | E-cadherin | β-catenin signaling | FRET microscopy | Mechanotransduction | Epithelial-to-mesenchymal transition

Remerciements

Ces quatre années de thèse ont été une aventure scientifique mais également humaine, et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné, chacune à leur manière, au cours de ce périple.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury Sylvie Hénon, Eva Faurobert, Emmanuel Farge, Sylvie Dufour et Pascal Silberzan pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, et leur disponibilité. Je remercie particulièrement mes rapporteurs, Sylvie Dufour pour sa lecture attentive, et ses conseils pertinents pour améliorer mon manuscrit, et Pascal Silberzan pour m'avoir acceptée quelques mois dans son labo en stage, il y a maintenant six ans, et m'avoir fait découvrir la complexité et la beauté des cellules épithéliales. J'ai également eu la chance, lors de mes comités de thèse, d'échanger et d'être encouragée par Emmanuel Farge, qui a toujours su trouver un mot positif, ainsi que René-Marc Mège et Manuel Théry dont les regards critiques m'ont toujours poussée à aller plus loin.

Je remercie Nicolas Borghi pour m'avoir acceptée dans sa nouvelle équipe, alors que je n'y connaissais rien à la biologie cellulaire, et avoir partagée avec moi les questions qui l'animait à l'époque. Toujours plein d'idées, passionné, efficace et brillant, sous ses conseils j'ai appris une façon unique de me poser des questions, d'y répondre, et je crois, de faire de la recherche. Merci de m'avoir toujours poussée à aller plus loin, de m'avoir formée avec passion, et de m'avoir fait confiance pour que je sois libre d'entreprendre ce que je voulais, que ce soit sur les techniques que je ne connaissais pas et que j'ai voulu utiliser, ou les cours au CRI qui m'ont pris beaucoup de temps, ou encore me lancer dans la purification de protéines en 4^{ème} année. Les discussions scientifiques, nos échanges ainsi que ta passion communicative pour les sciences ont été un vrai moteur tout au long de ces quatre années.

Au sein de l'équipe, je suis également très reconnaissante envers Maité Coppey pour sa formation, ses conseils toujours utiles en microscopie, et pour sa présence au départ de cette thèse sans laquelle je n'aurais pas pu commencer ce projet avec Nicolas. Sa bienveillance, et son écoute resteront des exemples pour ma vie professionnelle. Je remercie également tous les membres de l'équipe NicoA, Philippe, Théo, Pietro, ainsi que les anciens membres Karen, Cynthia, NicoT, Guan, Danielle, et Zheng-Zheng. Votre présence à tous, nos discussions en lab meeting ou improvisées dans l'open space, ainsi que les pauses le midi (quand j'ai enfin pu faire partie du « club des grands ») ont fait du labo un environnement de travail très agréable, bien nécessaire dans les moments d'échec et de doute. Je tiens tous à vous remercier pour votre écoute et vos conseils, notamment Philippe pour ton entrain et ta curiosité sur les différents projets, NicoA pour ton expertise sur le FRAP ou le FILM, tes battles de musique avec NicoT et aussi pour ton coaching (pas du tout stressant) lors de la rédaction, Théo pour ton enthousiasme communicatif, ta vision toujours positive et ton partage de connaissances sur de nombreux sujets scientifiques ou non, et enfin Pietro : good luck for your thesis, it is your turn now to observe MDCK cells and discover cool new things about mechanotransduction !

Je remercie également tous les stagiaires qui sont passés dans l'équipe en apportant leur regard nouveau et leurs questions : Tracy, Estelle, Danaé, Alexis, Romain, Kévin, Malaika, Charles, Jules, et plus particulièrement ceux qui ont travaillés sur mon projet Clémentine, Clément, et Helena (I wish you all the best for you thesis).

Au-delà de l'équipe, ce projet n'aurait pas été aussi riche sans les interactions au sein de l'Institut. Les discussions lors des Commun Lab Meeting, dans les couloirs de la Plateforme ou avec les « non permanents » lors des Beer Sessions, ont été une bouffée d'air frais. Bien sûr, je remercie la Plateforme d'Imagerie pour nous fournir les outils de travail nécessaires à mes 4200 heures d'observation de cellules, et celle de Cytométrie pour les lignées cellulaires, mais je remercie surtout chacun des membres de la plateforme ImagoSeine, Griselda et Magalie, Rémi, Chloé, Juliette, Orestis, Vincent, et Xavier, ainsi que les anciens François, Julien, Sophie, Olivier, France, Aude pour leur formation, leur bonne humeur, et les moments que l'on partage ensemble.

A l'Institut, je tiens également à remercier ceux qui s'occupent de nous et nous permettent de nous concentrer sur les projets scientifiques : Jonathan et Nori pour le magasin, Nadine et Stéphane pour la gestion administrative, Jean-Claude à la laverie du 3^{ème}, ainsi que le service des milieux, et les services techniques et informatiques.

Ces quatre années de thèse ont été aussi rythmées par le monitorat au CRI à la Licence Frontière du Vivant, où je tiens à remercier Vincent Dahirel et Patricia Busca, pour m'avoir accueillie, formée, et fait confiance pour la gestion et la création des projets pédagogiques de chimie et les cours qu'ils m'ont permis de donner aux L1 et L2.

Mais la thèse n'aurait pas été aussi agréable sans tous mes « compagnons de galère » à l'IJM : Karen qui m'a tout enseigné au labo, et dont les discussions philosophiques et les blagues illuminaient les journées, Cynthia qui m'a appris à me servir du tube au bouchon bleu et celui au bouchon violet pour me former à la biologie moléculaire, qui a vérifié mes primers de l'IGR après son départ, et qui savait danser la mangue pour me remotiver après les manipes ratées, Julie ou la personne – incroyable– avec qui j'ai partagé les longs mois de rédaction et qui a su me distraire lors des pauses ou des piques niques avec skittle et des boulettes, Anaëlle et nos discussions sur les chatons et la dérive des continents, France dont l'expertise sur le 780 a sauvé une partie du projet, et qui sait toujours nous remotiver, Simon, Daria, Valéria, Mickael, Hugo, Héliciane, Benoit, Guan, Alexandre ... Je tiens également à remercier mes amis du master PSB dont le soutien a été bien utile pour se remotiver Anaëlle, Andreas, Clotilde, Fabien, et Olivier, mais aussi mes amis de PC, toujours là malgré les années qui passent, et qui ont su me faire sortir du labo.

Enfin, j'aimerai remercier ma famille, source inépuisable de confiance, de soutien et d'exemple de combativité, et Marc pour partager ma vie.

Résumé de la thèse: contexte/questions/résultats

Dans les organismes multicellulaires, les cellules génèrent et subissent des forces mécaniques qui se propagent aux cellules voisines. Ces forces peuvent déterminer la forme des tissus et organes. La connaissance des tensions à l'échelle moléculaire est non seulement importante pour comprendre comment émergent les mouvements et déformations à l'échelle des cellules et tissus, mais aussi car ces tensions sont susceptibles de servir de signaux biologiques en contrôlant des voies de signalisation en réponse à des stimulations mécaniques. Ce processus transformant des signaux physiques en signaux chimiques, appelé "mécanotransduction", dépend de la capacité de certaines molécules à changer de conformation sous l'effet d'une contrainte mécanique, modifiant leur affinité pour leurs partenaires moléculaires structuraux ou enzymatiques. Ces changements d'affinité pourraient ensuite être la cause de l'activation ou l'arrêt de certaines voies de signalisation, dont la cible peut aussi bien être le comportement immédiat de la cellule (migration, adhérence...) que son devenir à plus long terme (prolifération, différentiation). Le fonctionnement des complexes macromoléculaires qui transmettent et transduisent ces signaux mécaniques inter- et intra-cellulaires ainsi que les fonctions cellulaires qui en dépendent, sont encore mal connus et requièrent la mise en place de techniques originales pour être compris.

L'objectif général de ce projet de thèse vise à répondre à cette question : identifier ces protéines et la manière dont elles répondent à des stimulations, quelles sont les voies de signalisation impliquées, quelles sont les fonctions cellulaires ciblées, et quels sont leurs partenaires moléculaires. Pour ce faire, nous développons des biosenseurs génétiquement encodés dans des cultures cellulaires modèles, associé à des méthodes de microscopie avancées.

Nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur le complexe d'adhérence entre cellules. En effet dans un épithélium, les cellules épithéliales adhèrent les unes aux autres via les E-cadhérines, protéines transmembranaires qui assurent le lien avec le cytosquelette d'actine par notamment l'intermédiaire de la β -caténine. La β -caténine est aussi un cofacteur de transcription : elle peut se trouver dans le noyau où elle régule des gènes impliqués dans une large gamme d'activités physiologiques et pathologiques. La voie de signalisation β -caténine peut être activée mécaniquement : par exemple à la suite d'une perturbation reproduisant les mouvements morphogénétiques de la gastrulation chez la *Drosophile*, la pression exercée par la croissance d'une tumeur sur des cellules non tumorales, ou encore l'étirement du substrat des cellules épithéliales. Cette activation mécanique dépend de la kinase Src, et conduit à la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β -caténine. Il émerge, ainsi, de ces différentes études un modèle attractif où l'induction mécanique de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine pourrait être le résultat de la translocation des jonctions adhérentes au noyau de la β -caténine, qui serait possible grâce à la diminution d'affinité entre la β -caténine et la E-cadhérine aux jonctions lorsque la β -caténine est phosphorylée par les kinases de la famille de Src en tyrosine 654. Néanmoins, les preuves directes de ce phénomène et ses mécanismes manquent, et le rôle qu'y tient la tension des E-cadhérines n'est pas connu.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la E-cadhérine dans l'induction mécanique de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine lors de la migration des cellules épithéliales induite par l'ajout d'un facteur de croissance HGF ou après la blessure de la monocouche. Ces deux perturbations sont connues pour induire partiellement une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Nous avons cherché à savoir :

- (1) Est-ce que la tension exercée sur les E-cadhérines est impliquée dans la localisation de la β-caténine ?
- (2) Est-ce que la β-caténine présente à la membrane peut réellement contribuer de manière quantitative à l'accumulation nucléaire de la β-caténine ?
- (3) Est-ce que la kinase Src est impliquée dans ce mécanisme ? Comment ? Est-ce que sa cible est directement la βcaténine ?
- (4) Y-a-t-il d'autres acteurs moléculaires essentiels ?

Pour déterminer les tensions mécaniques dans les E-cadhérines, nous avons utilisé un biosenseur FRET (Förster Resonnance Energy Transfer) de tension moléculaire inséré entre le domaine transmembranaire et le site d'interaction avec les caténines du domaine intracellulaire de l'E-cadhérine. Ce biosenseur est composé de deux protéines fluorescentes, séparées par une séquence polypeptidique d'élasticité connue. Ces fluorophores sont susceptibles de subir du transfert d'énergie par résonnance Förster lorsqu'ils sont suffisamment proches l'un de l'autre, de telle sorte que si la protéine est sous tension, le signal FRET diminue. La mesure du signal FRET par microscopie de fluorescence permet sous certaines hypothèses bien contrôlées, de connaître la tension moléculaire exercée sur les protéines.

En utilisant cette nouvelle méthode, j'ai vérifié que les E-cadhérines, dans les cellules épithéliales MDCK, sont sous une tension mécanique de l'ordre de quelques pN générée par le cytosquelette et qui peut varier selon certaines perturbations externes. Nous avons montré que certaines perturbations telles que l'ajout du facteur de croissance HGF connu pour induire une transition épithélio-mésenchymateuse ou lors de la fermeture de blessures formées dans la monocouche épithéliale, induisent une relaxation de tension des E-cadhérines ainsi qu'une translocation nucléaire de la β-caténine suivie d'une activation de la transcription des gènes dépendants. Ainsi, nous avons mis en évidence que la tension s'exerçant sur les E-cadhérines et la signalisation par la β-caténine sont corrélées.

En utilisant une β -caténine photoconvertible, nous avons pu montrer que la β -caténine présente à la membrane contribue de manière significative à l'accumulation de celle-ci dans le noyau. Cette translocation ne peut s'expliquer par un changement de synthèse ou de dégradation de la β -caténine, ou la quantité de E-cadhérine présente à la membrane, mais est spécifique aux cellules en migration. Ces expériences de FRAP et de photoconversion soutiennent l'hypothèse selon laquelle la dissociation du complexe E-cadhérine/ β -caténine a lieu à la suite de la relaxation de la tension des E-cadhérines.

D'autre part, il a été mis en évidence qu'une activité constitutive de la tyrosine kinase Src, oncogène majeur, est requise pour l'induction mécanique de la voie de signalisation de la β -caténine. A l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, de mutants de Src, et d'un bio-rapporteur FRET de l'activité de la kinase Src, nous avons vérifié ces résultats dans nos propres expériences, et montré en plus que la relaxation de la tension dans les E-cadhérines dépend également de l'activité de Src. Cependant, nous avons remarqué en utilisant des phosphomutants de la β -caténine, que la phosphorylation de la β caténine n'était, ni nécessaire, ni suffisante pour sa délocalisation des jonctions et une accumulation substantielle dans le noyau. De même, afin d'identifier si la tension des cadhérines peut être régulée par le recyclage des cadhérines médié par leur phosphorylation par Src, nous avons utilisé des mutants de la E-cadhérine, et montré que cette phosphorylation n'est pas nécessaire à la relaxation de tension observée dans les stimulations par HGF et blessure. La cible de Src n'est donc pas au niveau du complexe E-cadhérine/ β -caténine. Néanmoins, nous avons observé que le mutant constitutivement actif de Src se localise majoritairement dans les adhésions focales au niveau des protrusions. Or Src peut phosphoryler la kinase FAK au niveau des adhésions focales. Avec l'utilisation de bio-rapporteur FRET de l'activité de FAK, d'inhibiteurs et d'anticorps spécifiques, nous avons mis en évidence que Src active FAK sous l'effet de HGF, et que cette activation est nécessaire pour la relaxation de tension sur les E-cadhérines et l'accumulation de la β -caténine au noyau.

Parmi les cibles de FAK, on trouve de nombreux régulateurs de l'architecture du cytosquelette. L'ajout d'HGF induit notamment la mise en place de nombreuses fibres ventrales d'actine qui sont enrichies en phospho-myosine comparé à l'actine corticale. De plus, en utilisant une version mutante de la E-cadhérine qui se lie directement au cytosquelette d'actine sans l'intermédiaire de la β -caténine, l'hypothèse selon laquelle la relaxation de la tension sur les E-cadhérines serait impossible sans la dissociation de la β -caténine a pu être invalidée. Ainsi, la relaxation de tension de la E-cadhérine est possible grâce à une réorganisation du cytosquelette d'actomyosine médiée par FAK et Src.

En définitive, dans les cellules en migration sous HGF ou lors de la fermeture de blessure, la translocation et l'activation dans le noyau de la β -caténine présente à la membrane résulte de l'activation d'une voie de signalisation médiées par les kinases Src et FAK qui induit une relaxation de la tension des E-cadhérines. La réorganisation du cytosquelette d'actomyosine est suffisante pour conduire à la relaxation de tension des E-cadhérines alors que la phosphorylation du complexe E-cadhérine/ β -caténine n'est pas nécessaire. Ces résultats apportent une nouvelle lumière sur les mécanismes fondamentaux de la mécanotransduction la β -caténine à travers son interaction avec les E-cadhérines et révèlent l'importance d'un couplage mécanique entre les complexes d'adhésion cellule-cellule et cellule-substrat, ainsi que l'existence de mécanotransducteurs primaires qu'il reste à découvrir.

Table des matières

Résum	é de la thèse : contexte/questions/résultats	8
Abrévi	ations 1	٤5
Préam	bule - Avant-propos 1	L 9
1. M	écanique des cellules et Mécanotransduction 2	22
1.1	MECANOTRANSDUCTION – HISTORIQUE ET DEFINITION	23
	Définitions	23
	Outils développés pour étudier la mécanotransduction	23
	Preuves expérimentales de l'existence des processus de mécanotransduction	24
1.2	PROCESSUS MECANIQUES EN BIOLOGIE	26
1.2	2.1 Mesurer des contraintes mécaniques2	26
	1.2.1.1 Mesurer des contraintes mécaniques	26
	1.2.1.2 Microscopie des forces moleculaires grace aux senseurs FRE I	34
1.2	2.2 Activite mecanique intracellulaire	39
	1.2.2.1 Filament d'actomyosine	39 11
	1.2.2.3 Filaments intermédiaires	44
1.2	2.3 Contraintes mécaniques exercées par l'environnement sur les cellules	46
1.3	Messagers et Voies de signal isation mecanosensibies	18
1.3	3.1 Exemples de protéines dont le rôle de messager est mécano-activable	48
1 3	 Régulateurs communs du cytosquelette d'actomyosine 	53
1 /	Di ATEGORMES DE MECANOTRANSDUCTION ETUDIEES DANS CE TRAVAIL DE THESE	55
1.4	1 La Leronnies de Millano rando de l'Odiles dans de Travale de Trese	56
1.4	4.1 Autreston Centre-Substruct	56
	1.4.1.2 Rôle comme mécanosenseur	62
1.4	4.2 Adhésion cellule-cellule	53
	1.4.2.1 Organisation moléculaire	63
	1.4.2.2 Rôle comme mécanosenseur	69
1.4	4.3 Similarités entre Jonctions Adhérentes et Adhésions Focales	71
1.5	PRINCIPES GENERAUX DE LA MECANOTRANSDUCTION	73
1.5	5.1 Influence des forces mécaniques sur les protéines et exemples de mécanotransducteurs	
т	pléculaires	73
1.5	5.2 Modèle général de la mécanotransduction	80
2. Bi	its, contexte et objectifs spécifiques de cette étude	36
2.1.	LA F-CADHERINE EST CONSTITUTIVEMENT SOUS TENSION	86
2.2	REGULATION DU COMPLEXE E-CADHERINE/B-CATENINE/A-CATENINE	22
2.2	Accordance du complexe E-cadhérine/B-caténine/a-caténine/actine	22
2.2	Association du complexe E-cadhérine/a-caténine/a-caténine	22
	Stabilisation par l'ancrage du cytosquelette d'actine au complexe	88
2.2	2.2. Régulation du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine	39
	Modifications transcriptionnelles	89
	Modifications du renouvellement membranaire des E-cadhérines	89
	Modifications post-traductionnelles sur le complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine	90
2.3.	SIGNALISATION B-CATENINE) 3
2.3	3.1. Homéostasie de la β-caténine	9 3
2.3	3.2. Perturbations et déclencheurs de la voie de signalisation	95
	(1) Modification de la dégradation de la β-caténine conduisant à l'activation de la transcription des gènes dépendant	S
	de la β-caténine	96

	(2)	Modification du niveau global de E-cadhérines conduisant à l'activation de la transcription des gènes dépende	lants
	de la β-α	caténine	97
	(3)	Modifications post-traductionnelles affectant l'affinité du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine qui	0.0
	Exomple	ent à l'activation de la transcription des genes dependants de la p-catenine	
	Stimulat	rions mécaniques activant la transcription des gènes dépendants de la B-caténine	
2.4	Mo	DELE DE LA MECANOTRANSDUCTION DES CADHERINES DANS LE CONTROLE DE LA SIGNALISATION Â-CATENINE	- 106
2.7	· • • • • • • •	STELE DE LA MECANO MANSDOCHON DES CADIENNES DANS LE CONTROLE DE LA SIGNALISATION p calemne	100
2.5	. QUE	STIONS NOS OBJECTIFS ET NOTRE STRATEGIE	108
3. I	Véthod	es et Démarches expérimentales	112
3.1	. Овл	T D'ETUDE : LES CELLULES EPITHELIALES COMME SYSTEME MODELE	112
3.2	. Stin	IULATIONS ET PERTURBATIONS	113
3	3.2.1.	Stimulations extérieures conduisant à la migration des cellules	113
-	322	Introduction de mutants	114
2	,. <u>.</u>	Parturbations pharmacologiques	115
	.∠.J. ►a		115
3.3	. IVIET	HODES D'OBSERVATION	115
3	3.3.1.	Observer la localisation et la dynamique des protéines	115
	3.3.1.1.	Imagerie en cellules vivantes	116
	3.3.1.2.	FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	116
	3.3.1.3.	Photoconversion	118
-	5.5.1.4.		120
3		Mesurer des jorces	120
	3.3.2.1.	Generalite sur la microscopie des forces moleculaires grace au FRET	120 124
	3322	Analyse	124
-	2 2 2	Mesurer une activité hiochimique	127
	3331	Rannorteur des gènes · TOPdGEP	127
	3.3.3.2.	Senseurs d'activité kinase en cellules vivantes	128
	3.3.3.3.	Quantification des phosphorylations par anticorps	131
3.4	. Ana	LYSES STATISTIQUES DES EXPERIENCES	133
	.		120
4. 1	Resulta		138
4.1	LAR	ELAXATION DE TENSION DES CADHERINES CORRELE AVEC L'ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION B-CAT	ENINE.
	138		
4	4.1.1.	Lors de la migration collective après blessure de l'épithélium	139
4	4.1.2.	Lors de la stimulation avec le facteur de croissance HGF	143
4.2	. LA в	-CATENINE PRESENTE A LA MEMBRANE CONTRIBUE MAJORITAIREMENT A L'ACCUMULATION DE CELLE-CI DAN	IS LE
NOY	(AU		147
4	1.2.1.	Quantification de la translocation membrane/novau de la 6-caténine.	147
	122	Différents naramètres neuvent influencer l'accumulation de la R-caténine dans le novau	149
-	1521	Modèle cinétique	150
	1.5.2.2	Modele enfetque	150
4	123	Est-ce que la translocation de la B-caténine est snécifique aux cellules en miaration ?	158
1 2	,.2.J.	Est de que la transfocation de la σ catenine est specifique dux centres en migration γ	
4.5	. LAR	ELAXATION DES CADRERINES ET LA TRANSLOCATION DE LA B-CATENINE DEPENDENT D'UNE VOIE DE SIGNALIS	100
IMP		LES KINASES OKU ET FAK.	160
4	4.3.1.	L'activité de Src est nécessaire mais ses cibles ne sont ni la cadhérine ni la 6-caténine	161
	a)	Nécessité de l'activité kinase de Src	161
	b)	Activation de la kinase Src	163
	c)	La p-catenine comme cible de Src	166
,	u) 1 2 2	La L-cautiente contine control de sic	170 ~ R
4	+.3.2.	SIC UCLIVE FAR QUI EST HECESSUITE POUR IN TEINXULION DES COOREFINES ET la translocation de la	-U -
C	catenine		1/1

	a) FAK est une cible de Src	171	
	b) Activation de la kinase FAK	173	
	c) Nécessité de l'activité kinase de FAK	175	
4.4.	LA REORGANISATION DU CYTOSQUELETTE EST SUFFISANTE POUR INDUIRE UNE RELAXATION DES CADHERINES	177	
4.4	1.1. Description de la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine dépendante de Src-FAK.	177	
4.4	1.2. Relaxation de tension des E-cadhérines et lien avec le cytosquelette	181	
5. Di	scussion	184	
5.1.	RELAXATION DE TENSION DANS LES E-CADHERINES	184	
	Quantification en pN de la relaxation des E-cadhérines	184	
	Caractéristiques spatio-temporelles de cette relaxation	184 195	
	Lien avec les forces a l'échene de la cenure	185	
5.2.	ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION B-CATENINE	189	
5.2.	Translocation de la B-caténine membranaire au novau	120	
5.2		189	
	La guantité de β-caténine membranaire est-elle suffisante ?	189	
	Modèle de l'homéostasie de la β-caténine : Modèle cinétique avec trois compartiments	190	
5.2	2.2. Rôle de la quantité de E-cadhérines membranaires	191	
	Aux temps courts : pas de dérégulation des E-cadhérines	191	
	Le recyclage des E-cadhérines et le rôle de Src	191	
	Stabilité des E-cadhérines à la membrane sans β-caténine	192	
5.2	2.3. Rôle de synthèse et la dégradation de la β-caténine	193	
5.2	2.4. Rôle de la kinase Src et des phosphorylations de la β-caténine	194	
	La kinase Src	194	
	Rôle des phosphorylations de la β-caténine	194	
5.2	2.5. Mécanismes à l'origine du départ de la β-caténine membranaire	195	
	Hypothèses sur le départ de la β-caténine de la membrane à la suite d'une relaxation observée sur les E-cadhérines :	195	
	Induire une relaxation de tension des E-cadhérines et devenir de la β-caténine ?	197	
5.3.	COUPLAGE AVEC LES ADHESIONS FOCALES ET ROLE DE FAK	198	
5.3	3.1. FAK, cible de Src	198	
5.3	<i>B.2. Origine de l'ouverture de FAK et de son autophosphorylation</i>	198	
5.4.	L'ACTINE : LIEN ENTRE LES ADHESIONS FOCALES ET LES JONCTIONS ADHERENTES	201	
5.5.	NOUVEAU MODELE EMERGENT	203	
Conclu	sion Générale	208	
۶ A.	neve i Neuveeuv preiete	210	
6 1		210 210	
6.2		210	
0.2.		214	
6.3.	APPLICATIONS A D'AUTRES SYSTEMES DE ECAD I SIVIOD	217	
6.3	3.1. Ablation laser	218	
6.3	3.2. Cellules suspendues	220	
6.3	3.3. Cisaillement des cellules	224	
Annex	e : Sollicitations mécaniques conduisant à l'activation de la voie eta -caténine	227	
Annex	e : FRET-based Molecular Tension Microscopy	231	
		_	
Liste d	es Figures	233	
Liste d	es Tables	247	
Référe	Références Bibliographiques249		

Abréviations

Abl	Tyrosine Kinase Abelson murine leukemia
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	Atomic Force Microscope
Akt	Kinase Thymoma viral oncogene homolog 1 ou protéine kinase B
Als5p	Glycoprotéine Agglutinin-Like Sequence
APC	Adenomatous polyposis coli
Arf6	ADP ribosylation factors 6, GTP-binding protéine de la famille de Ras
ARNm	Acide ribonucléique messager
Arp2/3	Actin-related protein
ATP	Adénosine triphosphate
BAR-1	Beta-catenin-like protein (C elegans) Beta-catenin/armadillo-related protein 1
Bcl	B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma
BirA	Enzyme biotin-protein ligase
BLK	Tyrosine kinase B Cell Receptor
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CasSD	Domaine cellular apoptosis susceptibility ou Crk-associated substrate
Cdc42	GTPase de la famille des RhoGTPases - Cell division control protein 42 homolog
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
СКІ	Casein kinase 1
СКІІ	Casein kinase 2
cMet	Receptor tyrosine kinase Met du ligand HGF
сМус	Myelocytomatosis cellular oncogene
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
Ctrl	Contrôle
DbpA	Facteur de transcription DNA-Binding Protein A
DIG	Digoxigenin-dUTP
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DO	Densité optique
dPBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
DVL	Famille de gène Dishevelled
E3 CRL4-DCAF1	Ubiquitine ligase cullin4A-RING E3 DDB1 And CUL4 Associated Factor 1
EC	Ectodomaine
Ecad	E-cadhérine
EGFR	Epidermal Growth Factor Recepteur
EMCCD	Electron multiplying Charge-coupled device
EMT	Epithelial to Mesenchymal transition
EPLIN	Epithelial protein lost in neoplasm
Erk	Extracellular-regulated MAP kinase
ERM	Domaine protéique de la famille Ezrin/radixin/moesin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting,
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAT	Domaine protéique focal adhesion targeting
FBS	Fetal bovine serum
FERM	Domaine protéique Four-point-one /Ezrin/radixin/moesin

FGR	Tyrosine kinase Gardner-Rasheed feline sarcoma viral				
FimH	Type 1 fimbrin D-mannose specific adhesin				
FLIM	Fluorescence-lifetime imaging microscopy				
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching				
FRET	Förster resonance energy transfer				
FRNK	FAK non related kinase				
Fyn	Tyrosine Kinase				
G418	Geneticin antibiotique aminoglycoside				
GAPDH	Enzyme oxydoréductase glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase				
GIT-1	G Protein-Coupled Receptor Kinase Interactor - ARF GTPase-Activating Protein				
Gli1	Protéine à doigt de fer Glioma-associated Oncogene Homolog				
GRB2,	Growth factor receptor-bound protein 2				
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta				
GTP	Guanosine triphosphate				
GTPases	Hydrolase Enzyme de Guanosine triphosphate				
HEAT	Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1				
HGF	Hepathocyte Growth Factor				
His6x	Etiquette avec 6 Histidine				
HMP-2	Beta-catenin-like protein (C elegans) Protein humpback-2				
HP35	35 acides aminés de la protéine Headpiece villin				
HP35st	35 acides aminés de la protéine Headpiece villin mutée				
IF	Immunofluorescence				
IKK	Kinase IkappaB				
Inh	Inhibiteur				
IP3	Inositol trisphosphate				
IPTG	Analogue de l'allolactose isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside				
IQ	Domaine protéique qui peut se lier à la calmoduline				
IQGAP1	IQ domain-containing GTPase-activating protein				
Kras	Domaine de la protéine Kirsten rat sarcoma viral				
Lats1/2	Sérine/Thréonine Kinase large tumor suppressor,				
LD	Domaine protéigue riche en leucine motifs (consensus LDXLLXXL)				
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate				
LIM	Domaine protéique à doigt de zinc				
LINC	Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex				
Lpp	Protéine Lipoma-preferred partner				
LRP5-6	Lipoprotein receptor-related protein				
LSM	Laser Scanning Microscope				
Lvn	Lck/Yes novel Tyrosine Kinase				
, MAPK	Mitogen-activated protein kinase				
MBP	Maltose Binding Protein				
MDCK	Cellules épithéliales de rein de chien Madin-Darby <i>Canine</i> Kidney cell strain II				
mDia	Diaphanous-related formin				
Merlin	Moesin-Ezrin-Radixin Like Protein				
MI-7	Inhibiteur de MICK 1-(5-lodonaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1.4-diazepine hydrochloride				
MLCK	Mvosin light-chain kinase				
MRCK	Myotonic dystrophy kinase related Cdc42-binding protein kinase				
MRTF	Myocardin-Related Transcription Factor				
MSC	Mesenchimal Stem Cell				
MTM	Molecular Tension Mycroscopy				
MUC-1	Mucin 1. proteine du glycocalyx				
Mvoll	Myosine II				
NF-ĸB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells				
NHS	N-hydroxysuccinimide				

NiNTA	Ligand acide nitrilotriacetique complexant du nickel Ni ²⁺				
NLS	Séquence de localisation nucléaire Nuclear localization sequence				
OCRL/INPP5b	Inositol polyphosphate 5-phosphatase / Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase				
p130cas	Protéine aussi connu sous BCAR1 Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1				
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis				
РАК	p21-activated kinase				
PBS	Phosphate-buffered saline				
PDGF-B	Platelet-derived growth factor B				
PDZ	Domaine post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), (ZO-1).				
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule				
PEST	Séquence peptidique riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine(S) et thréonine (T)				
PGE2	Prostaglandine E2				
PI(4,5)P2	ou PIP2 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate				
РІЗК	Phosphoinositide 3-kinase				
PI4P5K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase				
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate				
PIP5K	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase				
PIV	Particle image velocimetry				
РКС	Protein kinase C				
pLysS	T7 lysozyme coding sequence				
pMLC	Phosphor-Myosin light-chain				
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1				
PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B				
РТРк	Tyrosine-protein phosphatase kappa				
PVR	Polio virus receptor ou CD155				
РҮК	Tyrosine kinase 2 beta				
Rac	GTPase de la famille des RhoGTPases - Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1				
Rap1	GTPase Ras-related protein 1				
Ras	Famille de GTPase				
Rho	GTPase de la famille des RhoGTPases - Ras homolog				
RIAM	Rap1-GTP-interacting adapter molecule				
RLC	Regulatory light chain				
RMN	Résonance magnétique nucléaire				
ROCK	Rho-associated protein kinase				
ROI	Region Of Interest				
RT-PCR	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel				
Scar/WAVF	Suppressor of cAMP receptor/ Wiskott-Aldrich syndrome protein				
SDS	Sodium dodecyl sulfate				
SEM	Standard error of the mean - erreur type de la movenne				
SH2	Domaine protéique Src Homology 2				
SH2	Domaine protéique Src Homology 2				
SHC	Src homology 2 domain-containing				
Smad	Protéine des produits des gènes de Drosonhile Mothers against decanentanlegic				
Src	Rous Sarcoma kinase				
SRF	Serum response Factor				
SV/80	Cellules humaines cancéreuses fibroblastiques de noumon				
SVS-1	Reta-catenin-like protein (C elegans) for symmetrical sisters				
ΤΔΠ	Trans-activating domain - transcriptional coregulator				
TRST	Tric-huffered saline avec 0.1% de Tween20				
	Transcriptional enhancer factor TEF-1				
	Endonantidada qui couna antès la cystàine de la sáquiando spécifique du Tobacco Etch Vigue				
	Traction Force Microscopy				
	Transforming growth factor bota				
югр					

TIRF	Total internal reflection fluorescence			
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène			
TrCP1	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase			
TRIP6	Thyroid receptor-interacting protein 6 – member de la famille des zyxines			
TRP	Transient Receptor Potential cation channels			
TSMod	Tension Sensor Module			
VdW	Interactions de Van Der Waals			
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome protein			
Wave	Was protein family verprolin-homologous protein			
WB	Western Blot			
Wnt	Protéine Wingless-related integration site			
WRM-1,	Beta-catenin-like protein (C elegans) worm arm motif			
WT	Wild type / Sauvage			
Xanf1	Facteur de transcription Xenopus laevis Anf			
Y27632	Inhibiteur de ROCK R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl) cyclohexanecarboxamide			
YAP/TAZ	Yes-associated protein and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif			
Yes	Tyrosine Kinase associée au gène Yamaguchi sarcoma			
ZO	Zonula Occludens			
βcat	β-caténine			

Préambule - Avant-propos

Des forces mécaniques en biologie ?

Le fort développement de la biologie moléculaire depuis la découverte de l'ADN, et la puissance explicative des modèles de réaction-diffusion ont imposé un point de vue très biochimique des phénomènes biologiques, et pour décrire une cellule, ce sont souvent les mots « gènes » et « protéines » qui sont utilisés. Néanmoins, la cellule n'est pas une « soupe » de protéines dans un cytosol visqueux entouré de membrane, dont seul le noyau au centre avec son ADN, régule son devenir. Le devenir des cellules est le résultat d'une communication entre le programme génétique de la cellule et son environnement biochimique, mais aussi mécanique.

Les forces mécaniques interviennent de multiples façons dans le corps humain. Les manifestations les plus évidentes en sont peut-être les contractions cardiaques et musculaires, ou les forces de cisaillement issues de la circulation sanguine. Les cellules qui nous constituent sont soumises à des contraintes mécaniques provenant de nos propres mouvements ou des contacts avec notre environnement. Si nous pouvons voir les manifestations des contraintes mécaniques à l'échelle de l'organisme, celles-ci se propagent aussi à l'échelle de la cellule, et il faut pour cela que certaines protéines puissent transmettre cette information mécanique à l'intérieur de la cellule. Ces informations mécaniques sont susceptibles de servir de signaux biologiques en contrôlant des voies de signalisation dans la cellule. Ce processus dépend de la capacité de certaines molécules à changer de conformation sous l'effet d'une contrainte mécanique, modifiant leur fonction et leur interactome. Les observations de ces processus mécaniques ont contribué à l'émergence d'un domaine d'étude en biologie cellulaire, rendant compte des processus par lesquels une cellule intègre les informations relatives aux propriétés mécaniques de son environnement et des forces qu'elle subit, et réagit en conséquence. Ce domaine, appelé mécanotransduction, regroupe l'étude des mécanismes moléculaires de la transmission des forces mécaniques et de leur transduction en signaux biochimiques.

L'objet de cette thèse est, de manière générale, l'étude de complexes protéiques comprenant des mécanotransducteurs qui peuvent être impliqués dans les voies de signalisation, et les mécanismes moléculaires sous-jacents de la réponse cellulaire à la stimulation mécanique. Je me suis concentrée plus particulièrement sur le complexe d'adhérence entre cellules : les jonctions adhérentes. En effet dans un épithélium, les cellules adhèrent les unes aux autres via les E-cadhérines, protéines transmembranaires qui assurent le lien avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la β-caténine. La β-caténine est aussi un cofacteur de transcription : elle peut se trouver dans le noyau où elle régule des gènes impliqués dans une large gamme d'activités physiologiques et pathologiques.

Le **premier chapitre** de ce manuscrit se veut une introduction très générale aux notions de mécanique des cellules et de mécanotransduction. Je présenterai, à travers plusieurs exemples historiques, quelques preuves expérimentales du phénomène de mécanotransduction, puis les différents outils développés pour mesurer les contraintes mécaniques, qui ont permis de mettre en évidence les forces mécaniques mises en jeu dans différents processus mécaniques internes et externes, qui seront eux aussi présentés. Afin d'étudier les conséquences de ces stimulations mécaniques, de nombreux systèmes expérimentaux ont été construits pour reproduire ces effets sur les cellules, et différents messagers et voies de signalisation mécanosensibles ont pu être identifiés. Par exemple, plusieurs messagers nucléaires seront décrits tels que YAP/TAZ, la β-caténine, la zyxine, Merlin, MTRF, NF-κB. L'implication de certains régulateurs du cytosquelette d'actomyosine dans la réponse des cellules à la perturbation mécanique sera discutée. Pour détecter et transformer le signal mécanique, les cellules possèdent différentes plateformes de mécanotransduction. Celles permettant l'adhérence au substrat (adhésions focales) et aux cellules (jonctions adhérentes) seront présentées.

Finalement, je discuterai des différentes conséquences de l'application de forces mécaniques sur les protéines, et proposerai un modèle pour la mécanotransduction.

La **deuxième partie** a pour but d'introduire le contexte de cette thèse et les résultats préliminaires nous ayant amenés à définir mon sujet de thèse. Le complexe E-cadhérine/ β -caténine et la signalisation β -caténine seront détaillés, ainsi que le modèle, proposé à ce jour, des E-cadhérines dans le contrôle de la signalisation β -caténine. J'aborderai ensuite, les questions que nous nous sommes posés sur le rôle de la tension des E-cadhérines dans l'activation de la voie β -caténine, la translocation de la β -caténine de la membrane au noyau, et le rôle de Src dans les mécanismes mis en jeu lors de la migration des cellules épithéliales.

Ensuite, je présenterai dans le **chapitre 3**, les différentes méthodes et systèmes expérimentaux que nous avons mis en place pour répondre à nos questions. L'équipe de Nicolas Borghi « Mécanotransduction : de la surface de la cellule au noyau », où j'ai effectué cette thèse, possède une grande expérience dans le domaine de l'imagerie de fluorescence sur cellules vivantes. En plus des techniques d'observation et de caractérisation classiques en biochimie, j'ai notamment utilisé différents biosenseurs génétiquement encodés de force ou d'activité, des techniques de FRAP et de photoconversion pour caractériser la cinétique de nos protéines d'intérêt. L'originalité de ce travail repose en partie sur l'utilisation d'un senseur de la tension moléculaire dans les E-cadhérines.

Le **chapitre 4** présente les différents résultats obtenus sur la corrélation entre la relaxation de tension des Ecadhérines et l'activation de la signalisation β -caténine, la translocation nucléaire de la β -caténine, les rôles des kinases Src et FAK, et de la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine lors de la migration des cellules induite par un facteur de croissance ou par blessure sur un épithélium. Les interprétations issues de ces résultats ainsi que leur comparaison avec les données de la littérature seront discutées dans le **chapitre 5**. Nous proposerons alors un nouveau modèle à partir de nos observations.

En **annexes**, dans une première partie, je détaillerais certains nouveaux projets préliminaires lancés au cours de ma thèse. Nos résultats nous ont amenés à nous poser de nouvelles questions notamment sur le rôle de la tension dans l'affinité de la E-cadhérine avec la β -caténine, le rôle de la kinase FAK. Nous avons également cherché à identifier d'autres perturbations mécaniques pouvant affecter la tension des E-cadhérines. L'annexe suivante est un tableau récapitulatif des différentes sollicitations mécaniques susceptibles d'activer la signalisation β -caténine. La troisième annexe est constituée de la revue « FRET-based Molecular Tension Microscopy » que nous avons publiée qui reprend les principes et les différentes découvertes issues de l'utilisation des senseurs FRET de forces moléculaires.

Introduction

Mécanique des cellules et Mécanotransduction

Sommaire

1.1	MEC	ANOTRANSDUCTION – HISTORIQUE ET DEFINITION	23
	Définitio	ns	23
	Outils dé	veloppés pour étudier la mécanotransduction	23
	Preuves	expérimentales de l'existence des processus de mécanotransduction	24
1.2	Pro	CESSUS MECANIQUES EN BIOLOGIE	26
1	.2.1	Mesurer des contraintes mécaniques	26
	1.2.1.1	Mesurer des contraintes mécaniques	26
	1.2.1.2	Microscopie des forces moléculaires grâce aux senseurs FRET	34
1	.2.2	Activité mécanique intracellulaire	39
	1.2.2.1	Filament d'actomyosine	39
	1.2.2.2	Microtubules	44
	1.2.2.3	Filaments intermédiaires	46
1	.2.3	Contraintes mécaniques exercées par l'environnement sur les cellules	46
1.3	Mes	SAGERS ET VOIES DE SIGNALISATION MECANOSENSIBLES	48
1	.3.1	Exemples de protéines dont le rôle de messager est mécano-activable	48
1	.3.2	Régulateurs communs du cytosquelette d'actomyosine	53
1.4	PLAT	EFORMES DE MECANOTRANSDUCTION ETUDIEES DANS CE TRAVAIL DE THESE	55
1	.4.1	Adhésion cellule-substrat	56
	1.4.1.1	Organisation moléculaire	56
	1.4.1.2	Rôle comme mécanosenseur	62
1	.4.2	Adhésion cellule-cellule	63
	1.4.2.1	Organisation moléculaire	63
	1.4.2.2	Rôle comme mécanosenseur	69
1	.4.3	Similarités entre Jonctions Adhérentes et Adhésions Focales	71
1.5	Prin	CIPES GENERAUX DE LA MECANOTRANSDUCTION	73
1	.5.1	Influence des forces mécaniques sur les protéines et exemples de mécanotransducteurs moléculaires	73
1	.5.2	Modèle général de la mécanotransduction	. 80

1. Mécanique des cellules et Mécanotransduction

Les organismes vivants multicellulaires présentent un degré d'organisation extrêmement étonnant. Un homme adulte, par exemple, est constitué d'environ cent mille milliards (10^{14}) cellules, toutes issues d'une cellule unique, l'œuf fécondé qui se divise. Ces cellules possèdent des propriétés morphologiques et fonctionnelles très variées, du globule rouge d'environ ~ 10 µm à certaines cellules neuronales atteignant quelques dizaines de centimètres de longueur.

Cette organisation est le résultat de la régulation du programme génétique de chaque cellule, mais nécessite également une communication des cellules entre elles, ou avec leur environnement via des stimuli biochimiques, électriques ou encore mécaniques. Les cellules sont capables de « sentir » et d'exercer des forces mécaniques. Ces contraintes mécaniques qu'elles subissent leur donnent des informations indispensables pour s'adapter. Qu'il s'agisse de réparer des lésions ou de répondre à une inflammation, qu'il s'agisse de sculpter un embryon ou au contraire de dégénérer en métastases, les cellules se déplacent, s'associent, se dissocient, se contractent, se dilatent... Les sollicitations mécaniques de leur environnement peuvent être la cause de l'activation ou l'arrêt de certaines voies de signalisation, dont la cible peut aussi bien être le comportement immédiat de la cellule (migration, adhérence, polarité, organisation du cytosquelette...) que son devenir à plus long terme (prolifération, différentiation). Le phénomène de mécanotransduction recouvre la détection et la transmission des contraintes mécaniques, et leurs transductions en signaux biochimiques par les cellules. Néanmoins, les mécanismes qui relient les contraintes mécaniques à l'activation des gènes et au changement de comportement des cellules sont encore mal connus. Pour autant, l'étude des processus physiques et mécaniques qui peuvent avoir un rôle déterminant sur la forme, la structure et le devenir des cellules, est importante dans différents domaines allant de l'ingénierie tissulaire, à la médecine (Ananthanarayanan and Kumar, 2012; Guilak et al., 2014; Shin and Mooney, 2016). Les processus touchant à la mécanotransduction sont impliqués dans un vaste spectre de maladies tels que des problèmes d'audition, la dystrophie musculaire ou encore le développement de cancers et de métastases (Ingber, 2003; Jaalouk and Lammerding, 2009).

Dans ce chapitre d'introduction, nous allons illustrer comment l'environnement mécanique peut avoir une influence sur les gènes et le comportement des cellules, et ainsi définir :

- le phénomène de mécanotransduction via le biais d'exemples historiques dans la première partie ;
- ensuite, les processus mécaniques cellulaires mis en jeu, comment les mettre en évidence et les mesurer, quelles sont les activités mécaniques intracellulaires et les contraintes mécaniques exercées par l'environnement et subies par les cellules ;
- les protéines navettes, messagers de la stimulation mécanique, et les voies de signalisation associées qui ont été identifiées à ce jour comme des voies de signalisation répondant à un signal mécanique ;
- quelles sont les complexes protéiques capables de sentir et transformer les signaux mécaniques en signaux biochimiques qui constituent les plateformes de mécanotransduction, étudiées dans ce travail de thèse, qui peuvent détecter les contraintes mécaniques;
- et enfin, quel est le modèle actuel de la mécanotransduction dans la cellule, comment l'information mécanique est détectée par les cellules, puis intégrée et propagée à l'intérieur de la cellule, et comment une protéine peut être sensible à une force mécanique.

1.1 Mécanotransduction – Historique et Définition

Définitions

Les processus de développement qui conduisent à la forme adulte des êtres vivants impliquent une communication entre le programme génétique et les forces mécaniques. Une proposition de processus mécaniques sous-jacents à la genèse des formes du vivant a été publié dans le livre « On Growth and Form » de D'Arcy Thompson qui fête en cette année 2017 ses 100 ans, et qui propose par exemple, qu'à l'instar de l'organisation des bulles de savon dans une mousse, la distribution des tensions superficielles est à l'origine de l'organisation des cellules dans les tissus (D'arcy Thompson, 1917). L'une des premières propositions concernant le rôle des forces mécaniques pouvant être converties en signaux biochimiques remonte aux années 70 dans l'étude menée par Beloussov et ses collègues (Beloussov et al., 1975). Dans cet article, les auteurs présentent leurs observations sur la déformation d'explants d'embryons de Xenope à différents stades du développement. Ces déformations sont classées en deux catégories : les rapides et passives qui rendent compte d'une tension exercée sur l'explant par les tissus adjacents, et celles actives et observables sur des temps plus longs, qui rendent compte de l'activité mécanique intrinsèque de l'explant. L'observation des déformations du tissus après dissection est une technique qui a été utilisée sur d'autres organismes permettant de révéler les contraintes mécaniques existantes (chez l'oursin (Moore and Burt, 1939)), mais Beloussov et ses collègues sont les premiers à mettre en avant une corrélation entre leur cartographie des contraintes dans l'embryon et le destin cellulaire des cellules, et à proposer «The existence of such a correlation indicates that there may be a causal connexion between the mechanical stresses and subsequent activation of the intercellular mechanochemical machinery.».

Désormais, ce processus de conversion entre information mécanique et information biochimique est appelé **mécanotransduction**. La notion de mécanotransduction recouvre la façon dont une cellule intègre le signal mécanique et le transforme en signal biochimique lui permettant de réagir, de s'adapter et de modifier son comportement ou l'expression de ses gènes. Cette notion suppose que les forces mécaniques peuvent influencer les complexes protéiques en modifiant leur structure et en conséquence modifier leur intéractome. Un mécanotransducteur doit être mécanosensible c'est-à-dire être capable de détecter le signal mécanique, mais conduit en plus à une modification de fonction et une conséquence sur le comportement ou le devenir de la cellule.

Outils développés pour étudier la mécanotransduction

La stratégie employée pour étudier la mécanotransduction a été de développer différentes techniques expérimentales pour pouvoir exercer des contraintes mécaniques si possible quantitatives et contrôlées, et perturber l'environnement mécanique des cellules en mimant les contraintes mécaniques que les cellules ou tissus peuvent subir. Différentes techniques ont été développées notamment :

- celles qui permettent d'appliquer des forces ou des déformations directement. C'est le cas des systèmes d'étirement uniaxial ou biaxial des substrats avec cellules, ou des épithéliums suspendus ; des systèmes microfuidiques permettant d'appliquer des flux pour cisailler les cellules de manière constante, oscillante ; des systèmes de cisaillement ; des pinces optiques ou magnétiques qui permettent d'appliquer des forces de compression ou de tension sur la surface des cellules, mais également avec des nanoparticules magnétiques à l'intérieur des cellules ...

- celles qui permettent de changer les propriétés de l'environnement mécanique des cellules. Par exemple, les cellules peuvent être cultivées sur des substrats de rigidités différentes, sur des substrats de formes différentes induisant une distribution de forces non homogène ou leur migration ...

Preuves expérimentales de l'existence des processus de mécanotransduction

Grâce à ces outils développés pour exercer des contraintes mécaniques sur les cellules et les tissus, différentes manifestations de la mécanotransduction sur la modification du comportement (organisation des jonctions cellule-cellule, du cytosquelette, migration, division cellulaire) ou du devenir des cellules (apoptose, prolifération, différentiation), ont pu être mises en évidence, et sont regroupés dans les revues suivantes (Discher et al., 2005; Vogel and Sheetz, 2006; Wang et al., 2009a; Wozniak and Chen, 2009). De ces revues, on peut noter que les recherches de gènes ou de processus mécanosensibles ont d'abord été motivés par les observations faites sur les réponses morphologiques des cellules endothéliales au flux hydrodynamique de la circulation sanguine, ou encore à partir des cellules osseuses soumises à une extension mécanique.

En effet, dès 1892 Julius Wolff postula que les os sont des tissus dynamiques qui peuvent s'adapter en réponse aux contraintes physiques de leur environnement lors d'une immobilisation, d'un effort physique ou avec l'âge...(Wolff, 1986). En 1975, les auteurs de Rodan et al. ont montré qu'à la suite de l'application de force de compression sur le tibia d'embryon de poulet ou directement sur les cellules issues du tissu, la production des messagers secondaires adenosine 3',5'-monophosphate cAMP et guanosine 3',5'-monophosphate cGMP diminue (Figure 1) (Rodan et al., 1975). Par la suite, différentes études sur les cellules osseuses soumises à des extensions cycliques ou en réponse à des contraintes de cisaillement avec un flux, ont démontré l'existence d'une régulation des niveaux cellulaires d'ionositol triphophates (IP3), cAMP, de prostaglandine E2 (PGE2) ou de calcium (Bourret and Rodan, 1976; Reich and Frangos, 1991).



Figure 1 – Accumulation dans le segment du milieu du tibia de l'embryon de poulet de cAMP et cGMP en pmol/ μ g d'ADN pour des embryons contrôles et d'autres soumis à 15 minutes d'une compression de 60 g/cm² (Issus de Rodan et al. 1975).

Dans le début des années 1980, les conséquences de l'application de flux de cisaillement mimant la circulation sanguine sur des cellules endothéliales se limitaient à décrire une réorganisation morphologique des cellules ou du cytosquelette (Davies, 1995; Franke et al., 1984). Par la suite, les premières démonstrations d'une régulation mécanique du métabolisme cellulaire ont été mises en évidence sur les cellules endothéliales, notamment avec l'augmentation de la production de lipides de la famille des prostacyclines des cellules soumises à un flux hémodynamique cyclique par rapport à des cellules en conditions stationnaires (Frangos et al., 1985), ou encore la découverte de l'expression mécaniquement dépendante d'une enzyme paracrine plasminogène t-PA (Diamond et al., 1989) (Figure 2).



Figure 2 – a) Schéma du dispositif expérimental pour soumettre les cellules endothéliales à des forces de cisaillement mimant le flux de la circulation sanguine (Issu de Francke et al. 1984). b) Profils de production de prostacyclines (PGI_2) en $ng/10^6$ cellules pour des cellules soumises à un flux pulsatile (rouge), un flux statique (bleu), et sans flux (noir). (Issu de

Frangos et al. 1985). c) Sécrétion de t-PA en ng/10⁶ cellules HUVECS en fonction du temps pour des conditions normales statiques, ou pour des HUVECS sous l'application d'un flux laminaire de cisaillement de 4 (point verts), 15 (orange) ou 25 (rouge) dynes/cm² (Issu de Diamond et al. 1989).

L'observation de la différentiation des cellules en fonction des contraintes mécaniques a permis de conforter le rôle des contraintes mécaniques dans la différenciation des cellules, notamment, avec l'étude de la protéine BMP2 qui, lorsqu'elle n'est plus internalisée à la suite d'un choc osmotique, conduit alors à la différenciation des myoblastes en ostéoblastes (Rauch et al., 2002), ou encore l'étude sur le devenir de cellules souches mésenchymateuses en fonction de la rigidité du substrat (Engler et al., 2006). La Figure 3 reprend l'expérience menée dans cette dernière étude où les cellules souches mésenchymateuses (MSC), cultivées sur des gels de module élastique proche de celui du cerveau (entre 0.1-1 kPa), proche de celui des muscles (entre 8-17 kPa), et proche de celui des tissus osseux précalcifiés (entre 25-40 kPa), se différencient respectivement en cellules avec certains des marqueurs génétiques caractéristiques d'une cellule neuronale, d'une cellule musculaire ou d'une cellule osseuse.



Figure 3 – a) Haut : Schéma d'un gel de module élastique E variant de 1 à 100kPa, d'épaisseur contrôlé, fonctionnalisé avec du collagène-I pour permettre l'adhésion des cellules MSCs. Bas : Images des cellules MSCs, initialement non différentiées rondes, puis avec une forme plus branchée, en demi-lune, ou polygonale lorsqu'elles sont cultivées respectivement sur des substrats de module élastique $\sim E_{cerveau}$ (0.1–1 kPa), $\sim E_{muscle}$ (8–17 kPa), or E_{rigide} (25–40 kPa) b) Haut : Module élastique E (kPa) mesuré pour différents tissus. Bas : Intensité de fluorescence pour différents marqueurs de différentiations (Neurone : p-NFH ; Muscle ; MyoD ; Os : CBF- α -1) en fonction du module élastique E du substrat. (Issu de Engler et al. 2006)

La rigidité de la matrice extracellulaire est connue pour influencer la différentiation des cellules (Engler et al., 2006), leur migration (Gardel et al., 2008; Hadjipanayi et al., 2009; Lo et al., 2000), la morphogénèse (Paszek et al., 2005; Wozniak et al., 2003), et la prolifération (Provenzano et al., 2009; Ulrich et al., 2009; Wang et al., 2009b).

In vivo, l'existence de gènes mécanosensibles a été mise en évidence par l'équipe d'Emmanuel Farge dans l'embryon de *Drosophile* avec l'expression mécaniquement dépendante du gène Twist dépendant de la voie de signalisation β -caténine lors de la gastrulation (Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008; Farge, 2003).

Il faudra attendre 2006 pour avoir une première preuve de l'existence de protéines mécanotransductrices avec la découverte de la phosphorylation spécifique de la protéine des adhésions focales p130cas lorsque sa structure est étirée (Sawada et al., 2006). Néanmoins, encore aujourd'hui, la manière dont les contraintes mécaniques se propagent, et peuvent agir en modifiant le comportement de certaines protéines et conduire à une transmission mécano-chimique du signal dans le noyau de la cellule pour influencer son expression génétique, reste en partie méconnue.

1.2 Processus mécaniques en biologie

La cellule, généralement considérée comme la plus petite unité structurale et fonctionnelle du vivant est un objet complexe dont la description peut adopter de nombreuses approches (moléculaire, biochimique, génétique...). Elle, et ces composants, peuvent être vus également comme des objets mécaniques dont les propriétés et les états, telles que la viscoélasticité, la plasticité, la tension de surface déterminent comment ils se déforment en fonction des forces.

Dans cette partie, nous nous efforcerons d'introduire les éléments nécessaires à la détermination et la description des processus mécaniques en biologie. Nous allons distinguer les contraintes mécaniques externes exercées par l'environnement « subies » par la cellule, et celles que l'on appellera internes prenant en compte les forces générées par la cellule dans la cellule.

Ce paragraphe sera divisé en trois parties :

- La première concerne la mesure de forces et contraintes *in situ*. Nous détaillerons différentes techniques pour mesurer les forces dans les cellules ou les tissus, et en particulier celle que nous avons utilisée au cours de cette thèse : la microscopie des forces moléculaires grâce aux senseurs FRET.
- La deuxième partie décrit les processus mécaniques intracellulaires. Les cellules sont en effet organisées selon une architecture contrôlée par le cytosquelette dont les propriétés physiques et l'activité maintiennent les formes des cellules et leurs permettent de générer des forces.
- La dernière partie donnera quelques exemples des différentes contraintes mécaniques exercées par l'environnement extérieur qui peuvent s'appliquer sur les cellules ou les tissus.

1.2.1 Mesurer des contraintes mécaniques

Différents systèmes ont été conçus pour exercer des forces, et ont permis d'identifier des processus mécanosensibles dans les conditions expérimentales, mais mesurer des forces *in situ* permet de déterminer si de telles forces sont susceptibles d'exister en conditions plus physiologiques. Pour comprendre la mécanotransduction, il faut pouvoir mesurer les forces mécaniques. Ainsi tirer, pousser, compresser peuvent devenir des outils pour sonder les forces mécaniques à différentes échelles.

1.2.1.1 Mesurer des contraintes mécaniques

Il existe différentes revues sur les outils disponibles pour explorer les forces sur les cellules et les tissus, et qui décrivent les découvertes issues de ces nouveaux outils (Campàs, 2016; Roca-Cusachs et al., 2017; Sugimura et al., 2015). Dans ce paragraphe, nous décrirons brièvement différentes techniques, qui sont soit actives et nécessitent d'appliquer des perturbations mécaniques au système pour quantifier sa réponse, soit passives du point de vue mécanique pour le système étudié. Ces techniques permettent d'avoir accès à des informations à différentes échelles : moléculaire, cellulaire ou tissulaire.

i) Méthodes actives

Microplaque



Cette technique utilise l'application d'une force contrôlée de 1 nN à 1 μ N avec une plaque ou un cantilever sur la surface d'une cellule ou d'un tissu, et enregistrent la déformation du système au cours du temps. Les microplaques ont été utilisées la première fois par Thoumine et Ott, et leur ont permis en appliquant une déformation oscillante sur cellule unique de mesurer son comportement élastique aux temps courts et viscoélastique aux temps longs (Thoumine and Ott, 1997). Ces techniques permettent d'avoir des mesures quantitatives sur les propriétés physiques ou les forces de rupture d'un tissu dans sa globalité ou de cellule unique. Mais elles nécessitent toujours un contact avec les cellules, ce qui peut potentiellement perturber leur réponse à la stimulation. On peut également s'en servir en compression en appliquant une pression sur la cellule ou un tissu, et à partir de sa forme remonter à sa tension de surface (Foty et al., 1994; Mgharbel et al., 2009). Cette technique a aussi été utilisée sur des tissus ou des embryons pour évaluer la rigidité des tissus de différents endroits de l'embryon de poulet (Forgacs et al., 1998), ou de poisson zèbre (Schötz et al., 2008) ou du Xenope (Adams et al., 1990). Sur le même principe, d'autres systèmes se sont développés comme par exemple celui miniaturisé qui permet d'étirer une cellule entre deux substrats suspendus et mesurer à la fois sa rigidité et sa force maximale d'adhérence au substrat avant rupture (Mukundan et al., 2013).

AFM cantilever



La microscopie à force atomique AFM repose sur le même principe que la technique présentée précédemment. L'AFM est basée sur un levier très fin (100-200 µm) avec une sonde à sa pointe de type cône de l'ordre du nanomètre, ou une bille avec une zone d'interaction plus large, calibré de raideur connue, qui va balayer la surface d'un échantillon et permettre la caractérisation des propriétés mécaniques viscoélastiques. Le principe repose sur le fait que la force locale entre la surface et la pointe est déduite de la déflection du levier. La déflection verticale du levier, qui représente la force d'interaction entre la pointe et le substrat, est mesurée par le déplacement vertical d'un spot laser sur les détecteurs photodiodes. Cette technique permet d'accéder à des mesures quantitatives des forces de rupture entre protéines, purifiées ou en surface de cellules, ou des forces de séparation cellule-objet à l'échelle moléculaire ou cellulaire, ou encore aux propriétés rhéologiques (module élastique et visqueux) de l'échantillon. Mais cette technique nécessite un contact avec la surface de l'échantillon, et scanner la surface reste assez lent (~min). De plus, l'obtention du module élastique des courbes d'AFM nécessite d'utiliser un modèle (ex : modèle d'Hertz) et donc automatiquement faire des hypothèses sur le comportement du système. Cette technique d'AFM a été utilisée sur différents cellules (revue(Haase and Pelling, 2015)), mais aussi notamment pour mesurer la tension corticale dans les embryons de poisson zèbre (Krieg et al., 2008), mais aussi dans le cerveau (Iwashita et al., 2014).

• Aspiration par micropipette



L'idée consiste à étirer une cellule dans une petite pipette (diamètre 2-8 μ m) en exerçant des pressions contrôlées (0.1–100 Pa). A l'aide de ce système, on peut mesurer les déformations cellulaires et les relier aux forces appliquées (Evans et al., 1976). La tension corticale et la viscosité peuvent être déterminées en fonction de la pression d'aspiration, le rayon de courbure à l'intérieur et l'extérieur de la micropipette, et le déplacement de la membrane dans la pipette (Evans and Yeung, 1989; Hochmuth, 2000). La tension corticale comprend à la fois celle de la membrane et celle du cortex d'actine relié à la membrane. La tension membranaire peut être mesurée en utilisant des inhibiteurs de l'actine ou en détachant la membrane du cortex, et cette tension a été évaluée à 40 pN/ μ m soit 100 fois plus petite que la tension corticale globale mesurée lorsque le cortex d'actine est intact (Tinevez et al., 2009). Cette technique a été utilisée notamment sur des cellules uniques, premièrement sur des globules rouges (Rand and Burton, 1964), puis pour déterminer les forces de séparation cellule-cellule cadhérinedépendantes en mettant en contact deux cellules (Chu et al., 2004), puis entre des agrégats de cellules (Guevorkian et al., 2010), pour mesurer la tension corticale de fibroblastes (Tinevez et al., 2009), mais également plus récemment pour mesurer la tension corticale des ovocytes de souris (Chaigne et al., 2013), ou des embryons de poisson zèbre (Maître et al., 2012) ou de souris (Maître et al., 2016). Comme les autres techniques de contact, l'aspiration directe par micropipette peut perturber le comportement des cellules, et c'est un système dont le rendement est lent.

Aspiration par microfluidique



L'aspiration sur les cellules par les micropipettes a été combinée à l'utilisation d'une plateforme de microfluidique pour améliorer la capacité d'analyse haut débit des cellules. Dans cette étude (Lee and Liu, 2015), la plateforme microfluidique permet de bouger et piéger les cellules dans des canaux permettant d'assurer le rôle de l'aspiration de la micropipette sur plusieurs canaux en parallèle.

o Extrusion de tubes de membrane par force hydrodynamique



Cette technique a permis de sonder les propriétés mécaniques des membranes, et des cellules. La première extraction artificielle d'un tube de membrane a été observée sur des globules rouges ponctuellement accrochés sur une surface et soumis à l'écoulement du liquide environnant (Hochmuth et al., 1973). Le flux de liquide exerce sur l'objet attaché, une friction visqueuse qui, lorsqu'elle est suffisamment grande, fournit la force nécessaire à l'extrusion d'un tube de membrane. La cellule est emportée mais reste attachée à la pointe par un tube de membrane. La vitesse d'extrusion peut être mesurée en fonction des cycles d'extrusion/rétractation allant de 50-200 pN pour des globules rouges (Borghi and Brochard-Wyart, 2007). Cette même technique peut être appliquée à des cellules épithéliales où le tube membranaire est uniquement constitué de la bicouche lipidique détachée du cytosquelette sous-jacent (Brochard-Wyart et al., 2006; Tabdanov et al., 2009). Plus récemment, cette technique a été adaptée sur des cellules issues d'embryon de poisson zèbre avec une pointe d'AFM pour l'extrusion de la membrane plutôt qu'un flux (Diz-Munoz et al., 2010).

Pinces optiques



En 1989, Ashkin et al. découvrent une nouvelle méthode pour piéger une particule dans un faisceau laser, grâce à la focalisation de la lumière qui permet de créer des forces de radiation de l'ordre de 1–100 pN (Ashkin and Dziedzic, 1989). Après avoir calibré la relation force–déplacement de la bille qui joue le rôle de la particule piégée, on peut avoir accès à des forces en l'attachant à divers éléments de la cellule. Cette technique permet à la fois d'appliquer des forces et de mesurer la réponse mécanique de la cellule, mais également mesurer les forces. De telles méthodes ont, par exemple, été employées pour mesurer le module élastique de la membrane de globules rouges (Hénon et al., 1999), mais également la tension et les propriétés mécaniques des jonctions cellulaires dans la *Drosophile* (Bambardekar et al., 2015), ou encore pour des cellules en culture, les forces exercées par les adhésions focales sur une bille de fibronectine (Choquet et al., 1997) ou par les jonctions adhérentes sur une bille avec des anticorps contre le domaine extracellulaire des E-cadhérines (Sato et al., 1998).

Pinces magnétiques



lci, le champ magnétique utilisé est généré par un pointe électromagnétique ou de petits aimants permanents, et permettent d'appliquer des forces jusqu'à 200 pN sur des particules magnétiques de l'ordre de 20 nm à 1 µm. La force exercée est proportionnelle au gradient du champ magnétique. Au départ, les pinces magnétiques ont été développées pour faire de la rhéologie à l'intérieur de la cellule (Crick and Hughes, 1950), elles ont ensuite été utilisées pour appliquer des forces contrôlées sur des molécules in vitro, mais aussi des cellules, et des tissus. Par exemple, le recrutement de protéines partenaires des jonctions adhérentes en fonction de la force exercée, et le phénomène de renforcement des E-cadhérines en fonction de la force a été mis en évidence grâce aux pinces magnétique sur les cellules (Barry et al., 2014; Le Duc et al., 2010). De même, les pinces magnétiques ont permis de mesurer les propriétés élastiques comme la tension de surface d'agrégats cellulaires (Mazuel et al., 2015), ou encore dans les embryons de Drosophile ou de Xenope, ce système a permis d'appliquer des forces sur des tissus (Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008). Désormais, l'utilisation de nanoparticules magnétiques permet de mesurer des forces de quelques pN exercées par les E-cadhérines uniques en découplant force et recrutement en agrégats à la membrane (Seo et al., 2016).

Ablation laser



Cette technique s'inspire du travail de Beloussov et al. qui date des années 1975, dans lequel les auteurs disséquaient des embryons de grenouille pour observer la relaxation passive et non sensible aux inhibiteurs des tissus qui étaient donc sous tension juste avant l'ablation (Beloussov et al. 1975). L'ablation laser est maintenant utilisée pour mesurer la distribution des tensions, dans un épithélium par exemple. Elle consiste en l'utilisation d'un laser pulsé à la nano-ou-femtoseconde qui permet d'ablater de manière sélective une portion du système étudié. La réponse du système à la perturbation est souvent enregistrée par fluorescence, et la vitesse de rétractation initiale est quantifiée. Cette vitesse nous donne une information sur la tension avant l'ablation. Et si l'on considère que les propriétés du système sont les mêmes partout, elle peut nous permettre de distinguer des différences de tension au sein d'un tissu ou d'une monocouche de cellules épithéliales. Aux temps courts, les cellules peuvent être considérées comme des matériaux passifs viscoélastiques, alors que si l'on observe la relaxation des cellules ou des tissus sur des temps longs il faut tenir compte de leurs réponses actives. La principale limitation pour mesurer en valeur absolue la tension vient du fait que la relation entre la tension et la vitesse initiale de rétractation dépend des propriétés du matériau notamment sa viscosité. Ainsi, si l'on veut une mesure exacte de la tension il faut connaitre la viscosité du milieu. Cette technique a été utilisée dans de nombreuses publications, et notamment sur les cellules MDCK pour mesurer la tension au niveau des jonctions cellule-cellule (Acharya et al., 2017; Bertocchi et al., 2016; Vedula et al., 2014), ou sur la *Drosophile* également au niveau des jonctions cellulaires (Bonnet et al., 2012; Fernandez-Gonzalez et al., 2009; Rauzi et al., 2008) et dans l'embryon de *C. Elegans* pour visualiser une anisotropie de tension corticale responsable de la mise en place de la polarité antéro-postérieure (Mayer et al., 2010).

Imagerie par ondes acoustiques : Elastographie

Cette technique consiste à envoyer des ondes acoustiques qui vont générer des ondes de cisaillement dans les tissus. La vitesse de propagation du cisaillement local est reliée à la rigidité des tissus, et est détectée par imagerie ultrasonique rapide (Lele et al., 2006; Sarvazyan et al., 1998). Cette technique permet par exemple d'avoir accès au module élastique des tissus et des tumeurs (Fernández-Sánchez et al., 2015). Cette technique a également permis de mesurer le flux sanguin dans l'aorte d'un embryon de souris (Phoon et al., 2002), et d'en estimer les contraintes de cisaillement (Adamo et al., 2009).

o Tomographie par cohérence optique plein champ FF-OCT (Full-Field Optical Coherent Tomography)

La tomographie en cohérence optique est basée sur une technique interférométrique à faible cohérence. Cette technique est surtout utilisée dans l'imagerie biomédicale (Fujimoto et al., 2000), mais peut être appliquée en biologie sur des tissus, ou des épithéliums de cellules en culture. La tomographie par cohérence optique peut permettre d'accéder aux modules élastiques des tissus en mesurant les déformations introduites par des ondes mécaniques (Qiu et al., 2016). Cette technique a par exemple permis de mesurer avec une résolution submicrométrique le module élastique de tissus biologiques tels que la cornée, les seins ou le cœur (Nahas et al., 2013; Thouvenin et al., 2017).

ii) Méthodes passives

• Senseur de force FRET dans les cellules et sur les surfaces





Au départ, les senseurs de force FRET ont été conçu pour mesurer des tensions moléculaires dans les cellules vivantes par FRET. Cette technique repose sur l'insertion génétique dans les molécules d'intérêt d'un ressort polypeptidique dont on connait le comportement sous l'application d'une force, et qui permet, en changeant de distance ou d'angle sous l'application d'une force, de la quantifier grâce à la mesure du signal FRET. Nous reviendrons sur cette technique dans le paragraphe 1.2.1.2.

Cette technique a également été utilisée pour mesurer les tensions moléculaires entre cellule et substrat soit en utilisant les mêmes types de ressorts protéiques, soit en utilisant des doubles brins d'ADN calibrés en force (Wang and Ha, 2013), qui permettent l'adhésion entre la cellule et le substrat. On peut noter que l'utilisation des senseurs avec les doubles brins d'ADN donne uniquement accès à la force passant par la protéine qui excède la résistance maximale du senseur d'ADN, qui casse pour une force donnée. La mesure n'est pas réversible, et en utilisant des senseurs de plus en plus résistants jusqu'à ce que leur résistance soit telle qu'ils ne cassent plus, on peut donner une idée des forces maximales exercées par les protéines. Comme les senseurs sont dans le milieu extracellulaire, l'imagerie est plus simple, et a permis notamment de faire de la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique sur les intégrines par exemple avec le senseur polypeptidique TSMod (Chang et al., 2016).

o Substrat flexible continu : TFM

Détecter les forces entre les cellules et le substrat sur lequel elles adhèrent est un défi majeur pour comprendre les phénomènes de migration cellulaire. La première tentative remonte aux années 1980 (Harris et al., 1980). Dans cette étude, les auteurs ont déposé des fibroblastes sur un substrat composé d'un fin film de silicone solide reposant sur du silicone fluide. Le film supérieur était suffisamment fin pour pouvoir se plisser sous l'action de la contraction des cellules en migration.



Une variante de cette technique, proposée la première fois par Lee et al., consiste en l'utilisation de films de silicones déformables dont les déformations sont rapportées par des billes de latex de 1 µm de diamètre, dispersées de manière aléatoire sur la surface lorsque les cellules migrent au-dessus (Lee et al., 1994). Ainsi, en mesurant le champ de déplacement des billes et en calculant le champ des contraintes, ils ont pu montrer qu'un kératocyte exerçait des forces maximales sur toute sa surface de l'ordre de 20 nN sur le substrat. Cependant, bien qu'ils aient réussi à obtenir une meilleure résolution spatiale que Harris et al. 1980, le fait de ne pas tenir compte de la propagation des déformations à l'intérieur du film, et le fait que le silicone soit un matériau non pas élastique mais viscoélastique limite beaucoup l'exactitude de leurs mesures. Une autre approche pour mesurer les forces cellule-substrat déformable rapportées par les déplacements de marqueurs intégrés régulièrement à la surface du substrat de PDMS. Cette technique a été proposée par Balaban et al. où en fonction de la migration de fibroblastes sur le substrat, le maillage régulier des marqueurs étaient modifié et

permettait ainsi de remonter à la contrainte exercée par les adhésions focales (Balaban et al., 2001). Cette technique a été améliorée, et est maintenant très couramment utilisée, avec des gels de polyacrylamide contenant des billes fluorescentes de 0.2µm de diamètre, et des calculs plus précis tenant compte du comportement élastique du gel, de la propagation des déformations afin de calculer la correspondance contraintedéformation avec plus d'exactitude. L'inversion du champ de déformations du substrat élastique pour avoir les forces de traction peut se faire par inférence Bayésienne (Dembo et al., 1996; Soiné et al., 2015) ce qui permet de s'affranchir de certains problèmes engendrés par la régularisation (lissage des forces locales élevées, ou de forts gradients).

Cette technique a été largement utilisée pour des cellules uniques en culture pour mesurer les forces exercées sur le substrat, notamment par les MDCK (Borghi et al., 2010; Maruthamuthu and Gardel, 2014), et également sur des monocouches de cellules MDCK (Tambe et al., 2011; Trepat et al., 2009). Elle permet également, sous certaines conditions (en considérant que les propriétés rhéologiques des cellules de la monocouche soient linéaires, isotropes et élastiques, et surtout que toutes les forces exercées par les cellules sur le substrat y induisent une déformation), de mesurer les forces de traction intercellulaires (ou « tugging forces ») en invoquant un principe d'équilibre des forces entre les forces transmises au substrat et celles transmises entre les cellules (Ng et al., 2014; Tambe et al., 2011; Trepat and Fredberg, 2011). Les hypothèses sur les propriétés de la monocouche sont nécessaires pour poser le problème 3D correctement entre les forces de traction obtenues en 2D et le tenseur de contraintes de la monocouche en 3D. Récemment, une approche par inférence Bayésienne a été proposée pour avoir accès aux forces de traction intercellulaires sans hypothèse sur la rhéologie de la monocouche de cellules (Nier et al., 2016).

o Substrat flexible discret : Piliers



Une autre approche pour avoir accès aux forces exercées par les cellules sur le substrat repose sur l'utilisation de substrats avec dans le rôle de marqueurs des piliers verticaux et micrométriques en PDMS (Tan et al., 2003). Ces piliers sont finalement des microcapteurs indépendants de la force, puisque lorsque les cellules exercent des forces dessus, ils peuvent fléchir. La mesure de cette déflection permet de calculer la force, connaissant la raideur du pilier. Cette technique a largement été utilisée pour les cellules MDCK où il a été montré par exemple, que les forces exercées par un ilot d'une dizaine de cellules sur le substrat sont plus importantes sur les bords de l'ilot jusqu'à 12nN (du Roure et al., 2005; Saez et al., 2007) ou encore que les cellules sont sensibles à la rigidité du substrat (Saez et al., 2010). Elle permet également, sous certaines conditions, de mesurer les forces transmises au substrat et celles transmises entre les cellules (Liu et al., 2010).

o Goutte liquide déformable



A la base cette technique a été développée pour mesurer les tensions mécaniques développées *in vitro* par des réseaux d'actine polymérisants (Boukellal et al., 2004). Elle a ensuite été adaptée pour mesurer les forces exercées par les cellules en migration dans des canaux microfluidiques (Molino et al., 2016), ou bien encore directement dans des épithéliums de cellules en culture ou encore des explants d'embryons de souris (Campàs et al., 2014). Cette technique consiste à utiliser des micro-gouttes d'huile de tension de surface connue, biocompatibles, greffées avec des ligands permettant aux cellules d'adhérer par exemple. Les déformations de la goutte permettent de calculer les forces qui lui sont exercées, mais ne permettent pas de visualiser les pressions au sein du tissu, car les gouttes sont incompressibles.

o Inférence de Force



Cette technique ne mesure pas les forces comme son nom l'indique, mais les déduit directement des images obtenues par microscopie. L'idée principale repose sur le fait que les forces exercées sur le tissu peuvent être déduites des formes des cellules le composant, sous réserve de connaitre ou de faire l'hypothèse de certaines propriétés mécaniques du tissus. Les équations reliant forme et propriétés mécaniques sont issues de la balance des forces entre cellules. Par exemple, si la tension est la même au niveau d'un vertex entre trois cellules, alors les angles du vertex devraient être symétriques à 120° chacun. Ainsi, cette méthode d'inférence des forces permet d'avoir accès, par exemple sur un épithélium de cellules, à la tension au niveau des jonctions cellule-cellule, et la pression intérieure, à une constante près. Seules les différences sont connues. Son avantage repose essentiellement sur le fait que les forces peuvent être déduites à partir d'une seule image de microscopie à fluorescence sans aucune perturbation du système. Mais néanmoins cette technique nécessite de faire beaucoup d'hypothèses sur le comportement du tissu pour reconstruire les tensions, et ne fonctionne qu'en 2D sur un seul plan, or les forces soutenues par la membrane basale ne peuvent pas être prises en compte. Cette technique a beaucoup été utilisée sur les embryons de Drosophile (Brodland et al., 2014; Ishihara and Sugimura, 2012; Ishihara et al., 2013a; Sugimura and Ishihara, 2013).

Suivie de particules et PIV



Pour mesurer le champ de vitesses d'un tissu, ou d'un fluide, il est souvent difficile de suivre chacune des particules individuelles. Une alternative est d'identifier des mouvements moyens dans des sous régions, c'est sur cette technique de corrélation des déplacements de petites régions que se base la PIV (particle image velocimetry). La PIV, développée dans les laboratoires de mécanique des fluides, a été utilisée la première fois pour mesurer les vitesses du flux sanguin dans le développement cardiaque (Hove et al., 2003). L'analyse des flux de fluides *in vivo* peut permettre de mesurer les forces de cisaillement qui dépendent de la vitesse du fluide, et du diamètre du canal. Ainsi, le suivi de globules rouges, ou du flux par analyse PIV dans l'aorte de poisson zèbre ou dans les veinules des muscles de souris ont permis de mesurer la vitesse du flux (Freund et al., 2012; Harlepp et al., 2017; Smith et al., 2003). Le flux peut être aussi mesuré en libérant localement des particules avec une ablation laser femtoseconde (Supatto et al., 2009), être suivi à partir de l'injection de billes fluorescentes dans les explants dorsaux de *Xenope* (Schweickert et al., 2007) ou en suivant des particules fluorescentes, par

exemple dans le système lacunaire-canaliculaire osseux (Price et al., 2011). A noter que les forces de cisaillement ont été également simulées à partir des formes du cœur de l'embryon de poisson zèbre (Boselli and Vermot, 2016).

1.2.1.2 Microscopie des forces moléculaires grâce aux senseurs FRET

Les senseurs de forces moléculaires sont des outils qui ont permis d'avoir accès à des grandeurs jusque-là inaccessibles autrement. Ils permettent de mesurer des forces directement dans les cellules vivantes ou les organismes à l'échelle de la molécule, spécifiquement dans une molécule d'intérêt et donc d'avoir accès à une meilleure compréhension de l'architecture mécanique des cellules et du tissu, et des voies de mécanotransduction sous-jacentes.

Nous avons écrit une revue sur ces senseurs de force pour décrire les différents outils à la disposition de la communauté scientifique en 2016 (Gayrard and Borghi, 2016). Elle se trouve à la fin de cette thèse en annexe dans le paragraphe : « FRET-based Molecular Tension Microscopy ». Dans cette revue, nous avons présenté les principes du fonctionnement de ces différents senseurs de force basés sur le FRET, les différentes versions disponibles, les façons de mesurer du FRET, leurs avantages et leurs inconvénients. Puis nous avons décrit les tests qu'il faut mener afin de valider les senseurs, commenter les différentes avancées faites avec les différentes protéines d'intérêts, cellules ou organismes sur lesquels les senseurs de force FRET ont été appliqués, et conclu sur leurs limites et les développements possibles.

Dans ce paragraphe, nous allons rappeler le principe des senseurs de force FRET, mettre à jour les différentes versions disponibles aujourd'hui, et brièvement revenir sur les points importants pour leur utilisation.

Principe : Un newtonmètre génétiquement encodé

Les forces mécaniques en physique sont souvent mesurées avec des dynamomètres qui sont en général constitué d'un ressort dont la raideur k est connue. Lorsqu'on applique une force sur le ressort dont une extrémité est attachée à un point fixe, on peut mesurer la déformation Δl et en déduire la force par la loi de Hooke : $F = k\Delta l$ (Figure 4.a). Les senseurs de forces moléculaires sont des ressorts moléculaires génétiquement encodés dont la déformation est mesurée par la quantification du transfert FRET entre deux fluorophores accrochés de part et d'autre du ressort. La séquence de ce ressort avec les deux fluorophores (un donneur et un accepteur) est alors insérée dans la protéine d'intérêt à un endroit où l'on suppose que la protéine est sous tension. Le FRET est sensible a de toutes petites variations de distance ou d'angle entre les fluorophores (Figure 4.b), et permet donc de mesurer en fonction de la raideur du ressort utilisé des forces de l'ordre de quelques pN dans les protéines. La déformation du senseur sous la force doit être réversible, insensible à la vitesse d'application de la tension, et sans hystérésis.



Figure 4 – a) Schéma d'une force appliquée sur un ressort. b) Principes des senseurs de forces FRET. Un bas FRET indique que le senseur s'est déformé par l'application d'une force. Deux types de senseurs existent : celui dont la déformation est due à un changement de distance entre les fluorophores et celui dont la déformation est due à un changement d'angle entre les deux fluorophores.

Les différentes versions disponibles

Trouver un peptide qui possède les caractéristiques d'un bon ressort n'est pas une chose facile, car la plupart des dépliements des protéines ne sont pas identiques à leur repliement (Bustamante et al., 2004). Plusieurs séquences ont été choisies pour jouer le rôle de ressort, et sont présentées ci-dessous et sur la Figure 5:

- Le premier senseur qui a été publié, stFRET, est basé sur une hélice α dont la longueur, optimisée pour avoir un FRET maximum sans force, augmente lorsqu'on applique une tension uniaxiale (Meng et al., 2008).
- Un deuxième, TSMod, contient lui une séquence de 40 acides aminés dérivé de la protéine flagelliforme issue de la soie d'araignée (Grashoff et al., 2010). Il est composé de 8 répétitions de 5 acides aminés qui se comportent comme un ressort entropique (Becker et al., 2003). Une version plus courte du même senseur a été créée avec seulement 5 répétitions des 5 acides aminés TSMod-F25 (Brenner et al., 2016).
- Un troisième, sstFRET, se base sur trois hélices α issues de la spectrine (Meng and Sachs, 2011)
- Un quatrième, HP35, a été conçu plus récemment pour permettre de mesurer des forces plus grandes autour de 10 pN (Austen et al., 2015). Il en existe deux versions, toutes deux basées sur 35 acides aminés issus du peptide « long villin-headpiece», connu pour se dérouler entièrement et très rapidement (taux>10000 s⁻¹) lorsqu'on applique une force dessus. Pour la première version HP35, la transition entre cet état plié/déplié se produit à environ 7.4 pN, alors que pour la seconde version stabilisée, HP35st, le seuil est autour de 10.6 pN (Žoldák et al., 2013).
- Un cinquième 12AA est basé sur une séquence non structurée de 12 acides aminés : TSGSPGLQEFGT séparés par deux fluorophores. Cette séquence de 12 acides aminés avec les séquences ajoutés pour se lier aux fluorophores contient 28 acides aminés, possède une longueur de persistance de 1nm, et forme un ressort entropique (Ohashi et al., 2007). Il n'a été utilisé qu'une seule fois (Suzuki et al., 2016).

Ces cinq premiers senseurs sont basés sur l'allongement de leur structure lors de l'application d'une force qui est mesurable grâce à une diminution de transfert FRET entre les fluorophores.

 Un sixième, cpstFRET, a été conçu en exploitant la sensibilité du FRET à l'orientation relative des fluorophores (Meng and Sachs, 2012). Il est composé uniquement des deux fluorophores, sans aucun acide aminé de liaison, qui sont parallèles l'un à l'autre sans force, et qui peuvent se tordre et s'orienter perpendiculairement sous la tension.



Figure 5 – Différents ressorts génétiquement encodés : hélice α (stFRET), répétition de spectrine (sstFRET), ressort entropique issue de la protéine flagelliforme de la soie d'araignée (TSMod) ou de 12 acides aminés, et issue du peptide villinheadpiece.(HP35).

Seuls les senseurs TSMod et HP35/HP35st ont été calibrés en spectroscopie en molécule unique *in vitro* dès leur publication originale grâce à l'application de forces par pinces optiques (Austen et al., 2015; Grashoff et al., 2010). Ces courbes de calibration permettent de relier la force et la mesure de l'efficacité FRET. Pour les senseurs stFRET, sstFREt, cpstFRET, 12AA, il n'existe pas de calibration en tant que telle, mais leur sensibilité à la force a été mise en évidence. Le détail des différentes calibrations sera discuté dans la partie du Méthodes et Démarches expérimentales 3.3.2.1.

Différentes utilisations

Les différentes utilisations des 6 senseurs de forces présentés plus haut ont été regroupées dans la Table 1 suivante qui présente les protéines dans lesquelles ils ont été utilisés, ainsi que l'organisme et la publication associée. Les protéines ciblées sont des protéines du cytosquelette telles que l' α -actinine, la spectrine, la filamine, ou l'actine, du kinetochore comme Ndc80, des protéines des adhésions comme la vinculine, l' α -caténine, les talines, les intégrines, la E-cadhérine, VE-cadhérine, N-cadhérine, PECAM-1, EpCAM, desmoplakine, la protéine du glycocalyx MUC1 ou le collagène. Ces protéines ont été exprimées dans des cellules en culture, mais également avec succès dans *C. Elegans*, la *Drosophile*, le *Xenopus Laevis* et le poisson zèbre. En bleu, sont présentés les articles qui ont été publiés depuis l'écriture de notre revue publiée en février 2016.

Name	Spring	Proteins	Organisms	References
	α-helix	collagen-19	C. Elegans	
		spectrin		
stFRET		filamin A	НЕК293, 3Т3, ВАЕС	(Meng and Sachs, 2011; Meng et al., 2008)
		a-actinin		
		α-actinin	MC3T3-E1	(Wang et al., 2016)
	spectrin repeat	α-actinin	ВАЕС, НЕК293	(Meng and Sachs, 2011)
			MDCK	(Rahimzadeh et al., 2011)
sstFRET				(Verma et al., 2012)
				(Ye et al., 2014)
			HEK293	(Suffoletto et al., 2015)
costERET	GGGGG	a-spectrin	BAEC, HEK293, MDCK	(Meng and Sachs, 2012)
CPSTFRET		α -actinin	MDCK	(Guo et al., 2014)

Table 1 – Résumé des différents senseurs de force et leurs utilisations.
		β -actin	HEK293, MDCK, 3T3, BAEC	
		vinculin	Vinculin ^{-/-} cells, BAEC, MEF, HEK293	(Grashoff et al., 2010)
			Dendritic cells	(van den Dries et al., 2013)
			U-373 MG	(Chang and Kumar, 2013)
			Primary epidermal keratinocytes	(Gautrot et al., 2014)
			Xenopus neural crest cells	(Kuriyama et al., 2014)
			Caco-2	(Leerberg et al., 2014)
			Mammary epithelial cells	(Rubashkin et al., 2014)
			Chromaffin cells	(Papadopulos et al., 2015)
			H1299	(Hernández-Varas et al., 2015)
			MEF	(Rothenberg et al., 2015)
			MDCK	(Sarangi et al., 2016)
			MDCK, C2C12	(Bertocchi et al., 2016)
			MEC	(Miroshnikova et al., 2017)
		E-cadherin	MDCK, L fibroblasts	(Borghi et al., 2012)
			Drosophila	(Cai et al., 2014)
			MCF10A	(Rolland et al., 2014)
			MDCK	(Sim et al., 2015)
			Xenopus Laevis	(Herbomel et al., 2017)
			MDCK – 3D acini	Narayanan Thesis 2017
TSMod	flagelliform (GPGGA) ₈		MDCK	2017)
		PECAM-1	BAEC, VE-cadherin ^{-/-} cells, PECAM- 1 ^{-/-} cells, HUVEC	(Conway et al., 2013)
			1 ^{-/-} cells, HUVEC	(conway et al., 2015)
		VE-cadherin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells	(Daneshjou et al., 2015)
		VE-cadherin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015)
		VE-cadherin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017)
		VE-cadherin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014)
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70)	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs C. Elegans	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015)
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2014)
		VE-cadherin β -spectrin (UNC70) MUC1 α -actinin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2014) (Yamashita et al., 2016)
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2014) (Paszek et al., 2014) (Yamashita et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2016)
		VE-cadherin β -spectrin (UNC70) MUC1 α -actinin Talin 1 Talin 2	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2017) (Kelley et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2016) (Austen et al., 2016) (Austen et al., 2015)
		VE-cadherin β -spectrin (UNC70) MUC1 α -actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i>	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2015) Hamilton Thesis 2015
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoplakin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i> MDCK	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2014) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2014) (Yamashita et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2015) Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoplakin Desmoglein-2	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i> MDCK	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2015) (Austen et al., 2015) Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster (Baddam et al., 2017) poster
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoplakin Desmoplakin Desmoglein-2 CENP-C kinetochore	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i> MDCK MDCK, A431 Drosophila S2 cell lines	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2014) (Relley et al., 2015) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2015) (Kumar et al., 2015) Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster (Baddam et al., 2017) poster (Ye et al., 2016)
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoglakin Desmoglein-2 CENP-C kinetochore	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs C. Elegans Mammary epithelial cells Xenopus laevis, HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 Zebrafish MDCK MDCK, A431 Drosophila S2 cell lines	(Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2017) (Kelley et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2016) (Austen et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster (Baddam et al., 2017) poster (Ye et al., 2016) (Arsenovic et al., 2016)
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoplakin Desmoplakin Desmoglein-2 CENP-C kinetochore Nesprin (miniN2G)	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i> MDCK MDCK, A431 Drosophila S2 cell lines NIH3T3 MDCK	(Conway et al., 2015) (Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2014) (Relley et al., 2015) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2014) (Yamashita et al., 2016) (Austen et al., 2015) Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster (Baddam et al., 2017) poster (Ye et al., 2016) (Arsenovic et al., 2017) poster
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoplakin Desmoplakin Desmoglein-2 CENP-C kinetochore Nesprin (miniN2G) N-cadherin	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i> MDCK MDCK, A431 Drosophila S2 cell lines NIH3T3 MDCK vascular smooth muscle cells, cardiomyocytes and cancer cells	(Conway et al., 2015) (Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2015) (Austen et al., 2015) Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster (Baddam et al., 2017) poster (Ye et al., 2016) (Arsenovic et al., 2017) poster Urs, Aarti Thesis 2016
		VE-cadherin β-spectrin (UNC70) MUC1 α-actinin Talin 1 Talin 2 EpCAM Desmoplakin Desmoplakin Desmoglein-2 CENP-C kinetochore Nesprin (miniN2G) N-cadherin Integrin αL and β2 subunits	1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC BAECs <i>C. Elegans</i> Mammary epithelial cells <i>Xenopus laevis</i> , HEK SV40 Talin1-/- cell lines ; NIH 3T3 SV40 <i>Zebrafish</i> MDCK MDCK, A431 Drosophila S2 cell lines NIH3T3 MDCK vascular smooth muscle cells, cardiomyocytes and cancer cells	(Conway et al., 2015) (Daneshjou et al., 2015) (Tornavaca et al., 2015) (Conway et al., 2017) (Krieg et al., 2014) (Kelley et al., 2015) (Paszek et al., 2015) (Paszek et al., 2014) (Yamashita et al., 2016) (Austen et al., 2015) (Kumar et al., 2015) Hamilton Thesis 2015 (Price and Dunn, 2016) poster (Baddam et al., 2017) poster (Ye et al., 2016) (Arsenovic et al., 2017) poster Urs, Aarti Thesis 2016 (Nordenfelt et al., 2016)

TSMod F25	flagelliform (GPGGA)₅	Vinculin	vinculin-/- cells	(Brenner et al., 2016)
HP35 HP35st	35 amino acids WT villin-headpiece peptide35 amino acids villin-headpiece stabilized mutant	Talin1 Talin2	SV40	(Austen et al., 2015)
12AA	12aa	NDc80	yeast	(Suzuki et al., 2016).

Développement futur

L'utilisation des senseurs de force FRET est finalement assez récente et a permis de mettre en avant de nouveaux mécanismes. A travers les différentes observations, il a été découvert que les processus observés sont plus complexes que ce qui avait été pensé préalablement et c'est sans doute ce qui est le plus stimulant.

Malgré tout, les senseurs disponibles à ce jour possèdent certaines limites. Notamment, ces senseurs sont limités dans les forces qu'ils peuvent mesurer avec des forces de 0-7 pN pour le TSMod, entre 6-8 pN pour HP35, et 9-11 pN pour HP35st. Ainsi ces senseurs ne pourront jamais discriminer des forces de 10, 50 ou 100 pN, elles seront toujours mesurées avec le même niveau de FRET bas (Figure 6). Et bien qu'un seul moteur ne puisse pas créer des forces supérieures à quelques piconewtons, de l'ordre de 4 pN pour des myosines sur l'actine (Finer et al., 1994), 5 à 7 pN pour les kinésines ou les dynéines sur les microtubules (Svoboda et al., 1993), les intégrines peuvent supporter des forces allant jusqu'à 30 pN (Kong et al., 2009). D'autre part, aucune information sur la direction dans laquelle s'applique cette force n'est donnée par la mesure de FRET. De plus, les senseurs de forces FRET ne donnent qu'une valeur moyenne de la force pour un ensemble de molécules (Figure 6). En effet, chaque pixel de l'image correspond à une valeur de FRET moyenne pour toutes les protéines contenues dans le volume focal, et nous n'avons aucune idée de la distribution des forces. On peut imaginer que seule la moitié des protéines est sous tension, ou qu'il existe plusieurs populations de protéines qui n'ont pas la même tension. L'information de la distribution est complètement perdue dans cette mesure globale, mais on peut imaginer qu'avec les progrès des techniques d'imagerie en molécules uniques nous pourrons bientôt avoir accès à la tension de chaque molécule à l'intérieur de la cellule. Les techniques de spectroscopie de force en molécules uniques ont déjà permis d'avoir accès à cette distribution de force pour les intégrines en plaçant le senseur à l'extérieur de la cellule (Chang et al., 2016; Morimatsu et al., 2013).



Figure 6 – Mesure d'un ensemble de tension au sein d'un pixel. a) Exemple de distribution des forces au sein d'un ensemble de protéines : certaines ne sont pas sous tension, d'autres ont une tension trop élevée pour être mesurée avec le senseur TSMod, seule une mesure moyenne est accessible. b) Exemple de fluctuations de tension trop rapides pour être détectées.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le senseur TSMod inséré dans la partie cytoplasmique de la Ecadhérine pour mesurer les forces dans les E-cadhérines dans différentes situations que nous détaillerons dans les chapitres suivants.

1.2.2 Activité mécanique intracellulaire

La cellule eucaryote est composée d'une membrane plasmique qui la délimite, d'un noyau, d'un cytoplasme renfermant de nombreux compartiments ayant des fonctions particulières tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, ... et cytosquelette constitué de plusieurs réseaux de polymères. Le cytosquelette possède des propriétés physiques qui permettent à la cellule de maintenir sa forme et de générer des forces. Ce cytosquelette est constitué de trois réseaux : celui de l'actine, des microtubules, et celui des filaments intermédiaires.

Les forces générées par les différents cytosquelettes qui se propagent et s'organisent dans le cytoplasme et aussi dans le noyau des cellules, sont très variées et nécessitent différentes interactions moléculaires. Nous allons faire un rapide point sur la structure des différents cytosquelettes ci-dessous et leur rôle dans la génération de force intracellulaire.

1.2.2.1 Filament d'actomyosine



Les filaments d'actine (F-actine) résultent de la polymérisation de l'actine monomérique globulaire de 42kDa. Ces filaments sont fins, de l'ordre de 7nm, constitués d'une double hélice de pas 37nm, et sont polarisés. Cette polarité provient de l'asymétrie du monomère d'actine. Une des extrémités présente un site de fixation préférentiel à l'ATP, elle est dite (-). L'assemblage des monomères hydrolyse lentement l'ATP en ADP, et conduit à une diminution de l'affinité des monomères entre eux, ce qui va conduire à leur dissociation. Comme indiqué sur la Figure 7, les vitesse de polymérisation et de dépolymérisation ne sont pas les mêmes, et ne sont pas les mêmes à chaque extrémité. Si on suit un monomère d'actine venant d'être incorporé à l'extrémité (+) on constate que le filament garde une longueur constante, mais il se déplace vers l'extrémité (-). C'est ce qu'on appelle le treadmilling (illustré en avec le monomère jaune sur la Figure 7). L'actine est donc une structure très dynamique.



Figure 7 – Elongation des filaments d'actine. a) Taux de polymérisation pour les filaments d'actine avec de l'actine GTP ou ATP. Les constantes d'associations sont en μ M⁻¹ s⁻¹ et les constantes de dissociation sont en s⁻¹, K est la constante d'équilibre de dissociation en μ M. Les constantes d'équilibre pour l'actine-ATP différent entre l'extrémité (+) et (-), ce qui explique le

phénomène de treadmilling – illustré ici par le monomère d'actine en jaune -. En définitive, l'extrémité (+) a tendance à polymériser à partir d'actine-ATP, et l'extrémité (-) à dépolymériser. Le départ du phosphate dû à l'hydrolyse de l'ATP liée à chaque unité d'actine se fait progressivement le long du filament. (Adapté de (Pollard and Borisy, 2003)).

Les filaments d'actine ne sont pas seuls, il existe toute une batterie de protéines associées servant à faire glisser les filaments les uns par rapports aux autres (myosines), à nucléer de nouveaux filaments de manière branchée (Arp2/3, Scar/WAVE, WASP...) ou non (formine), à les stabiliser (tropomyosine, calponine,...), les déstabiliser (cofiline), à les joindre entre eux afin de former des réseaux (spectrines, filamines, trangelines...) ou des fibres (α -actinine, fascine, villine, fimbrine...), à les ancrer à la membrane...



Figure 8 – Exemple de protéines associées à l'actine (Adapté de (Pollard, 2016))

<u>Génération de force par le cytosquelette d'actine : polymérisation de l'actine et moteur moléculaire</u> Le cytosquelette d'actomyosine peut générer des forces dans la cellule de plusieurs manières, notamment directement par polymérisation des filaments d'actine contre la membrane par exemple, mais également grâce aux moteurs moléculaires de myosines.

L'idée selon laquelle la polymérisation à elle seule d'un câble d'actine permet de générer une force qui peut s'exercer sur la membrane plasmique des cellules et engendrer une protrusion remonte aux années 1980 (Cortese et al., 1989; Hill and Kirschner, 1982), et a été décrite par des modèles théoriques (Mogilner and Oster, 1996). Ce mécanisme de génération de force par polymérisation de l'actine a été confirmé expérimentalement dans un système simplifié de liposomes géants contenant de l'actine monomérique, où des déformations de la membrane et la croissance de protrusions ont pu être observées supposément grâce à la polymérisation de l'actine (Miyata et al., 1999). Une autre preuve des forces produites par la polymérisation de l'actine a été apporté par certains pathogènes intracellulaires, comme la Listeria monocytogenes, qui catalysent localement la polymérisation d'actine à leur surface de manière asymétrique, et génèrent à l'arrière une queue appelée comète riche en actine. Ils peuvent être propulsés par la polymérisation de filaments d'actine, et la vitesse de déplacement de la bactérie est du même ordre que celle de la polymérisation de l'actine environ 1 µm/s (Theriot et al., 1992). Ce type de système a été reconstitué in vitro avec des billes de polystyrène fonctionnalisées avec les protéines ActA et WASP. Ces structures sont capables de former des comètes d'actine et de bouger dans un extrait de protéines cytoplasmiques (Capaldo and Macara, 2007; Noireaux et al., 2000). De même, dans un système reconstitué avec 5 protéines purifiées, il a été montré qu'en mesurant la vitesse de déplacement de la bille de 2 µm dans un milieu de viscosité connue, les forces mises en jeu dans le déplacement de la bille pouvaient atteindre 50 pN (Wiesner et al., 2003). La force qu'exerce la polymérisation de l'actine sur la bille a été mesurée également dans des expériences de micromanipulation dans lesquelles la bille est attachée à une microfibre flexible qui se comporte comme un senseur de force (Marcy et al., 2004). En tirant la comète d'actine de la bille, le module élastique du gel a pu être estimé, ainsi que la force nécessaire pour détacher l'actine de la bille, autour de 3 nN pour une vitesse de 10 μ m/min. En utilisant un autre système composé de réseau d'actine branché avec Arp2/3 et en présence de protéines de coiffe et de profiline, il a été montré que lors de l'application d'une force mécanique avec un AFM sur le gel, celui-ci se densifie, le nombre de filaments augmente mais pas leur longueur moyenne, et macroscopiquement cela conduit à une rigidification du gel (Bieling et al., 2016). Plus tard, une mesure directe des forces de polymérisation a été rendu possible grâce aux techniques de molécule unique. Dans une première étude en utilisant des pinces optiques sur les filaments d'actine, cette force a été évaluée autour de 1 pN (Footer et al., 2007). En observant le flambage des filaments d'actine dont l'extrémité (+) interagit avec une formine, la force de polymérisation du filament a été évaluée autour de 1.3 pN (Kovar and Pollard, 2004).

Un autre mécanisme permet quant à lui de générer des forces contractiles. Ces forces sont dues aux moteurs de myosine. Il existe plusieurs types de moteurs de myosine, mais globalement ils ont la même structure en trois domaines : une tête, un cou, une queue (Figure 9.a). La tête constitue la partie motrice de la protéine, interagit avec l'actine, et génère les forces grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Le cou et la queue servent de bras de levier, et permettent de transmettre les forces. Et la queue peut interagir avec des molécules de transports appelé cargos, ou alors avec d'autres sous unités de la myosine. Notamment, les myosines II peuvent se lier entre elles, ainsi permettre à plusieurs filaments d'actine et complexe d'actomyosine de s'associer de manière antiparallèles. Ils forment ainsi ce qu'on appelle les fibres de stress contractiles (Figure 9.b).



Figure 9 – Représentation schématique de la myosine II. a) sous sa forme inactive, et activée après phosphorylation en Ser19 par la kinase MLCK par exemple. b) Exemple d'association pour les myosines II au niveau de leurs chaines lourdes, qui vont permettre d'assembler plusieurs filaments d'actines entre eux en réseau bipolaire. L'activité APTase de la tête des myosines va leur permettre de changer de configuration et d'avancer le long des filaments antiparallèles d'actine et donc de générer des forces contractiles. (Adapté de (Vicente-Manzanares et al., 2009)).

L'étude du déplacement de ces moteurs moléculaires a été mise au point avec des expériences de motilité *in vitro* dans lesquelles la motilité le long des filaments purifiés a été mesurée soit en mesurant la vitesse d'une bille (« bead assay »), ou en regardant le mouvement des filaments sur une surface fonctionnalisée avec les moteurs (« gliding assay ») (Howard, 2001). Pour pouvoir observer le mouvement des moteurs de myosine, l'idée ingénieuse mise en place en 1983 par M. Sheetz et J. Spudich a été d'attacher une bille microscopique de 100 nm à 1 µm de diamètre derrière le moteur, en profitant de sa capacité naturelle à lier les cargos (Sheetz and Spudich, 1983). Suffisamment grande pour être vue au microscope optique, la bille indique, instant par instant, la position du moteur. Le mouvement d'une molécule unique a pu être observé, et la vitesse et la processivité de la myosine ont pu être mesurées. Par la suite, l'utilisation de pinces optiques a permis de piéger une bille attachée au moteur de myosine. La bille s'échappe progressivement du piège optique qui agit tel un ressort sur la bille. Plus la bille s'éloigne du centre, plus la force de rappel augmente, et il a ainsi été montré *in vitro* qu'un seul moteur de myosine des muscles squelettique peut exercer des forces de l'ordre de 4 pN sur l'actine, en suivant l'avancement de la bille qui s'échappe du piège optique tirée par la myosine sur le filament

d'actine (Finer et al., 1994). Les expériences de suivi de particules uniques, de plus en plus performantes, ont permis de caractériser différent moteurs, par exemple celui de la myosine V (Mehta et al., 1999). De ces observations ont été extraits la vitesse moyenne d'avancement de l'ordre de 400 nm/s et le pas de 36 nm, et il a été montré que le moteur de myosine V reste accroché jusqu'à une force de 3 pN.

Organisation du cytosquelette d'actine

Il existe plusieurs types de superstructures de l'actine permettant de modifier la forme de la cellule (Figure 10) :

- L'actine corticale est un gel d'actine en dessous de la membrane plasmique de la cellule. Ce réseau recrute différents réticulants en fonction du type cellulaire pour ancrer le cortex à la membrane. Le cortex d'actomyosine des cellules peut être caractérisé par sa tension, qui peut être mesurée par des techniques d'aspiration par micropipette. La mesure issue des expériences d'aspiration par micropipette reflète une tension membrane/corticale (souvent appelé tension corticale). Quantifier la contribution du cytosquelette d'actomyosine cortical comparée à celle de la tension membranaire de la bicouche lipidique et protéines membranaires qui la composent, n'est pas possible à moins que la membrane ne se détache du cortex, ce qui permet alors de découpler les deux contributions. Grace à l'extrusion de tubes de membrane, la tension membranaire a pu être évaluée entre 20-40 pN/μm (Dai and Sheetz, 1999; Tinevez et al., 2009).
- Les « blebs » apparaissent sous certaines conditions, et sont issus d'une augmentation de la pression hydrostatique localement sous la membrane. La membrane plasmique n'est alors plus reliée au cytosquelette cortical d'actine. La pression hydrostatique pousse la membrane pour former le « bleb » qui continue à croitre tant qu'un nouveau cortex d'actine n'a pas repolymérisé (Tinevez et al., 2009).
- Les fibres de stress peuvent se contracter. Elles peuvent être constituées de filaments d'actine antiparallèles, couplés à des moteurs de myosines dont on a vu qu'ils peuvent exercer des forces entre 2-5 pN par moteurs, et cross-linkés par des protéines telles que l'α-actinine. En effet, les expériences d'ablation laser des fibres de stress d'actine ont permis de mettre en évidence, dans les cellules, que les fibres de stress sont sous tension d'après leur mouvement de rétractation le long de l'axe de la fibre après ablation, grâce aux myosines (Kumar et al., 2006).

La cellule présente également différent types de protrusions qui résultent à la fois de la polymérisation et de la réorganisation de l'actine, ainsi que de l'extension de membrane. Parmi les différents types de protrusions, on peut citer :

- Le lamellipode qui est impliqué dans les mécanismes permettant l'avancée des cellules sur le substrat. Il forme des extensions cytoplasmiques aplaties, larges et très fines. Il est constitué d'un réseau branché, et entrelacé d'actine. Ce réseau peut pousser la membrane plasmique en polymérisant l'actine au front avec les extrémités (+) et en recrutant un grand nombre de complexes Arp2/3 permettant le branchement du réseau. Ce réseau dense est non contractile à l'avant, et l'on peut observer un flux rétrograde d'actine de l'avant à l'arrière. En termes de forces appliquées, la force maximale nécessaire pour stopper complètement la migration d'un kératocyte de poisson est de 35 nN (Heinemann et al., 2011). Alors que la force nécessaire pour stopper l'extension locale sur 1 µm² d'un lamellipode de kératocyte en migration a été mesurée par AFM autour de 3 nN (Prass et al., 2006). Cette force est du même ordre de grandeur que celle générée par la formation d'un réseau d'actine avec Arp2/3 sur une microbille (Marcy et al., 2004).
- Les « ruffles » qui forment aussi des protrusions, moins persistantes, et sont composés de filaments d'actine polymérisant et dépendent de la quantité de PIP2 à la membrane (Doughman et al., 2003; Honda et al., 1999).

Les filopodes qui sont de longues fibres d'actine, arrangées de manière parallèles et très compactes grâce aux formines et Ena/VASP, bloquant la liaison de la myosine avec de l'actine, et qui forment de fines tiges aux extrémités des cellules. La force requise pour faire croitre un filopode a été estimée théoriquement à une force supérieure à 10 pN pour surpasser la rigidité et la tension de la membrane, et pour cela il faut au moins qu'une dizaine de filaments s'assemblent (Mogilner and Rubinstein, 2005). Expérimentalement, des billes fonctionnalisées avec des protéines issues de la surface de bactéries peuvent être reconnues s'accrocher à la pointe du filopode. Ainsi, avec des pinces optiques pour piéger ces billes à la pointe des filopodes, il a été mesuré que la rétraction d'un filopode peut exercer des forces de 10 pN sur une distance de plus de 10 μm (Vonna et al., 2007).



Figure 10 – Schéma d'une cellule et des différentes superstructures d'actine la composant. Le cortex et le lamellipode sont constitués d'un réseau d'actine formant un gel. Les filopodes sont constitués de fibres d'actine parallèles, les fibres de stress de fibres d'actine antiparallèle contractiles. Les adhésions focales adhérentes au substrat sont représentées en violet. Chaque structure recrute des protéines se liant à l'actine spécifique (Blanchoin et al., 2014).

Il a été proposé que les filaments d'actine du cytosquelette puissent propager des contraintes mécaniques sur de longues distances (Wang and Suo, 2005). Ce phénomène est illustré par exemple avec les fibres de stress qui relient des adhésions focales. L'ablation de la fibre entraîne un déplacement de l'adhésion focale à l'autre bout de la cellule (Tanner et al., 2010), diminue les forces de traction pas uniquement au niveau de la fibre de stress (Kumar et al., 2006) et modifie par exemple la tension des vinculines dans d'autres adhésions focales (Chen et al., 2005). De même, une stimulation mécanique des intégrines avec une bille magnétique peut conduire à l'activation de Src très rapide en 0.3 s et sur des distances de 15 à 60 µm plus loin que la bille (Na et al., 2008). Un mécanisme de propagation direct entre la surface des cellules et le noyau est particulièrement

séduisant dans le sens où l'information mécanique peut se propager beaucoup plus rapidement que les phénomènes de réaction-diffusion chimiques, ou de translocation de protéines.

De plus, réorganiser le cytosquelette est un moyen efficace pour la cellule de répondre à son environnement mécanique. Par exemple, pour se mouvoir, la cellule forme de nouvelles structures d'actine et remodèlent leur cytosquelette. Leur mouvement, pour des cellules individuelles, peut être décomposé en trois étapes de la manière suivante : premièrement, la déformation du cytosquelette et la création d'une protrusion dans la direction de migration, deuxièmement la formation d'une adhésion entre l'extrémité de la protrusion et le substrat, et troisièmement le déplacement de l'ensemble de la cellule et le détachement des adhésions qu'elle formait avec le substrat. Lors de ces processus, différentes protéines régulatrices permettent de transformer l'organisation du cytosquelette d'actine, et de modifier les interactions entre les différentes protéines partenaires interagissant avec l'actine (Figure 8).

La contribution des forces générées par le cytosquelette d'actomyosine dans les forces exercées par la cellule sur son substrat a été évaluée en mesurant les forces transmises au substrat par TFM en utilisant des inhibiteurs chimiques comme le cytochalasineB qui dépolymérise l'actine, la calyculineA qui augmente la phosphorylation de la myosine, ou Y27623 qui inhibe MLCK et diminue la quantité de phospho-myosine (Kraning-Rush et al., 2011). Il a été montré que le traitement avec la cytochalasineB ou Y27623 conduit à une diminution des forces de traction exercées par la cellule, et le traitement avec la calyculineA permet de les augmenter. Ces expériences confirment que le cytosquelette d'actomyosine peut permettre la transmission des forces cellulaires au substrat.

1.2.2.2 Microtubules



Les microtubules sont des fibres organisées sous forme de tube de 25 nm de diamètre et d'environ 10 µm de longueur. Ce sont les composants les plus larges, les plus rigides des filaments des trois cytosquelettes, leur longueur de persistance étant de l'ordre du millimètre. Ils résultent de la polymérisation d'une protéine : la tubuline de 50 kDa. La tubuline présente plusieurs isoformes : l' α -tubuline, et la β -tubuline, dont l'assemblage est contrôlé par l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP). Les tubulines s'organisent tout d'abord en protofilaments qui s'assemblent ensuite pour former un microtubule. La Figure 11 résume ces différentes étapes, et l'on peut voir que les microtubules sont polarisés, c'est-à-dire qu'ils possèdent une extrémité (+) à polymérisation rapide, et une extrémité (-) à polymérisation lente. Cette dernière est ancrée au niveau du centrosome, souvent situé près du noyau. Les microtubules passent régulièrement d'une phase de polymérisation, à une dépolymérisation (catastrophe), puis une repolymérisation (sauvetage).



Figure 11 – Structure des microtubules. a) Assemblage à partir d'un dimère à partir d'un monomère d' α -tubuline, avec un de β -tubuline, puis assemblage en protofilaments, et puis en fibres sous forme de tube. b) Polarité d'un microtubule avec une extrémité (+) polymérisant rapidement, et phénomène de catastrophes c'est-à-dire de dépolymérisations brutales. (Adapté de Ross Lab).

Génération de force par les microtubules

Les microtubules ont deux moteurs qui leurs sont associés : les kinésines, qui se déplacent vers l'extrémité (+), et les dynéines, vers l'extrémité (-). Ces moteurs ne servent pas à produire de mouvements contractiles comme les myosines, mais peuvent transporter des vésicules ou des organites en transformant de l'énergie chimique en travail mécanique en se déplaçant. Les mêmes types d'expériences que celles réalisées pour observer les propriétés des moteurs de myosines ont été utilisés pour les kinésines et les dynéines. En effet, à l'aide de pinces optiques *in vitro*, il a été montré que ces moteurs peuvent ainsi exercer des forces qui ont été estimées autour de 5 à 7.5 pN pour les kinésines avec une vitesse 0.8 µm/s le long des microtubules (Svoboda et al., 1993), et de 7 à 10 pN pour des dynéines à 85 nm/s (Reck-Peterson et al., 2006). Dans les cellules vivantes, le mouvement d'une kinésine transportant un quantum dot de 30nm peut exercer des forces autour de 0.6 pN (Courty et al., 2006).

Outre la capacité via les moteurs de générer des forces, l'assemblage des microtubules peut générer des forces de poussée lorsque les microtubules rencontrent des obstacles tels qu'une membrane, tandis que leur désassemblage contribue à exercer des forces de traction au niveau du centrosome (Dogterom et al., 2005). Les forces de poussée contribuent, par exemple, au bon positionnement du noyau dans les levures *S. Pombe* (Tran et al., 2001). Un microtubule seul ne peut pas exercer plus que 3 à 4 pN, mais ils peuvent aussi flamber ou s'associer entre eux et former des « bundles », ce qui leur permet d'exercer des forces plus élevées (Dogterom, 1997). D'autre part, il a été montré que les microtubules en train de dépolymériser dans un extrait de protéines *in vitro* peuvent pousser des particules ou des chromosomes à des vitesses d'environ 20µm/min pour lesquelles les forces de friction ont été évaluées à 10 pN (Coue et al., 1991). Par la suite, les forces de traction exercées par les microtubules ont été évaluées entre 30 et 65 pN à partir du suivi *in vitro*, à l'aide de pinces optiques, de billes au niveau des microtubules qui dépolymérisent (Grishchuk et al., 2005).

La contribution des microtubules dans les forces exercées par la cellule sur son substrat a été évaluée par TFM en utilisant des inhibiteurs chimiques comme le nocodazole qui dépolymérise les microtubules, et il a été montré que ce traitement conduit à une augmentation globale des forces de traction (Rape et al., 2011). Ceci pourrait suggérer que les microtubules sont globalement sous compression dans la cellule (Kolodney and Elson, 1995; Wang et al., 2001a), et que leurs désassemblages conduisent à un report de cette force vers les adhésions au substrat. Néanmoins, cette augmentation a aussi été en partie attribuée à une augmentation de la phosphorylation de la MLC (Kolodney and Elson, 1995) et un changement de concentration en calcium (Paul et al., 2013) à la suite du traitement avec le nocodazole. Une autre preuve de la contribution des forces générées par les microtubules et transmises au milieu est celle des battements des cils ou flagelles qui sont majoritairement constitués de microtubules. En effet, les battements de ces structures dans différents types de cavités provoquent des mouvements de liquide, de mucus, et permettent la propulsion chez bon nombre d'unicellulaires, et chez certains pluricellulaires (Brennen and Winet, 1977; Kamimura and Takahashi, 1981).

1.2.2.3 Filaments intermédiaires



Les filaments intermédiaires sont des fibres de diamètre d'environ 10 nm qui constituent un réseau large et hétérogène. Ce sont les moins bien connus et pourtant les plus stables. Ils sont composés de protéines fibrillaires (et non globulaires comme l'actine et les microtubules) variées et très hétérogènes comme la vimentine, la desmine, ou la kératine assemblées de façon hélicoïdale, et pouvant s'assembler en dimère puis tétramère. Contrairement à l'actine ou aux microtubules, les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés, et pour l'instant aucun mouvement directionnel de moteur moléculaire n'a été observé sur ces filaments. Les filaments intermédiaires sont très abondants dans les cellules de l'épiderme et les axones des neurones.

Néanmoins, les filaments intermédiaires confèrent aux cellules certaines propriétés, comme leur rigidité globale ou leur vitesse de migration, par exemple lors de la déplétion de kératine, les fibroblastes migrent plus vite (Busch et al., 2012) et possèdent une rigidité plus faible (Ramms et al., 2013). A la suite de l'application de forces de cisaillement, les cellules épithéliales pulmonaires forment un réseau plus dense en filaments intermédiaires de kératines, supposément pour les aider à résister aux forces (Flitney et al., 2009), ou encore à la suite de l'expression d'un mutant non fonctionnel de desmine, les forces que les cellules musculaires peuvent exercer sur leur substrat sont plus faibles (Charrier et al., 2016).

Ainsi la régulation de l'organisation par l'assemblage et le désassemblage des filaments des cytosquelettes, les propriétés contractiles des filaments d'actine, ainsi que la régulation des partenaires protéiques structurels des cytosquelettes sont des éléments permettant à la cellule de générer des forces mécaniques, et sont utilisés pour la mise en place de la réponse de la cellule à une stimulation mécanique.

1.2.3 Contraintes mécaniques exercées par l'environnement sur les cellules

Les cellules de notre organisme sont constamment exposées à des perturbations mécaniques soit de par leur contractilité propre comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent 1.2.2, soit par différents évènements environnementaux externes. Ce sont ces sollicitations mécaniques de l'environnement extérieur que nous allons décrire dans ce paragraphe. Ces contraintes mécaniques sont souvent observées à travers les déformations qu'elles engendrent, en effet il reste encore des défis technologiques à franchir pour pouvoir mesurer les forces de compression, de cisaillement et de tension *in vivo*, malgré le développement des outils présentés dans la partie 1.2.1.1.

Dans un contexte biologique, on peut lister différents types de contraintes mécaniques qui s'appliquent sur plusieurs échelles :

à l'échelle du corps entier :

La gravité, ou les forces exercées lors d'un exercice physique à travers les muscles et le squelette peuvent s'appliquer de manière non spécifique à un ensemble de tissus. Par exemple, certaines études essayent de quantifier le nombre de sollicitations subies par les os au cours d'une journée, pour ensuite pouvoir mieux comprendre l'adaptation des cellules osseuses (Fritton et al., 2000), ou encore l'effet d'un effort musculaire

sur les cellules osseuses ou musculaires. Par exemple, la mesure de la contraction des muscles de *C. Elegans*, a permis de montrer que la tension exercée par les muscles sur l'épiderme adjacent maintien l'enzyme GTPase GIT-1 au niveau des hemidesmosomes (Zhang et al., 2011).

De même, les forces mises en place lors de l'embryogénèse qui permettent de sculpter la forme 3D de l'embryon sont des forces exercées sur une large échelle comparée à l'échelle cellulaire. Ces mouvements morphogénétiques impliquent des réarrangements entre cellules voisines, la migration de certaines cellules, ou un changement de forme des cellules. Par exemple, le repliement des tissus épithéliaux lors de gastrulation chez la *Drosophile*, la fermeture dorsale de l'embryon de *Drosophile* et la fermeture ventrale de l'embryon de *C. Elegans* sont des exemples de la manifestation des forces mécaniques dans la mise en place des formes dans la morphogénèse. Mesurer quantitativement ces forces à l'échelle de l'organisme reste compliqué, mais dès 1975 les microdissections réalisées par Beloussov et al. ont permis de cartographier les régions sous tension dans l'embryon de grenouille (Beloussov et al., 1975). Depuis, les techniques d'ablation laser ont permis de mettre en évidence que de nombreux tissus sous tension chez la *Drosophile* ou *C. Elegans* (Bonnet et al., 2012; Fernandez-Gonzalez et al., 2009; Mayer et al., 2010; Rauzi et al., 2008). Les nouvelles techniques de senseurs de déformation basées sur des gouttes liquides déformables ont permis également de mesurer les contraintes mécaniques dans les embryons de souris (Campàs et al., 2014). Ces techniques pourraient être étendues à d'autres organismes modèles pour quantifier les contraintes mécaniques *in vivo*.

à l'échelle des tissus :

On peut observer diverses contraintes mécaniques, spécifiques à certains tissus ou organes de notre corps, comme par exemple le cisaillement dû au flux hydrostatique sanguin sur l'endothélium, l'étirement des vaisseaux dû à la pression sanguine, la tension exercée sur les os par les muscles, les vibrations stimulant les cellules ciliées du système auditif, les forces mécaniques dues à la contraction des poumons sur l'épithélium pulmonaire ou dans l'intestin, les pressions osmotiques dans l'appareil urinaire ...

In situ ces forces n'ont pas forcément été mesurées systématiquement. Mais par exemple, la visualisation par imagerie ultrason et la mesure des flux de cisaillement par la circulation sanguin sur les cellules endothéliales vasculaires dans l'embryon de souris a permis de mettre en évidence que ce cisaillement est un acteur majeur pour la mise en place de la première étape de différentiation des cellules souches hématopoïètiques en différents progéniteurs de cellules sanguines (Adamo et al., 2009). L'analyse des flux de fluides *in vivo* permet de calculer les forces de cisaillement (Freund et al., 2012). Par exemple, le cisaillement dans les artères a été estimé autour de 1-3 N/m² (Davies, 1995), dans les tubules proximales autour de 0.3 N/m² (Guo et al., 2000), dans le système lacunaire-canaliculaire osseux des ostéocytes autour de 0.8-3 N/m² (Price et al., 2011; Weinbaum et al., 1994; You et al., 2001).

Toujours à l'échelle d'un tissu, la croissance de cellules tumorales non contrôlée dans un espace confiné, peut générer des forces de compression sur les cellules (Cheng et al., 2009), qui potentiellement peuvent modifier le comportement des cellules cancéreuses qui vont se mettre à migrer, mais aussi des cellules saines des tissus adjacentes (Tse et al., 2012). Les contraintes mécaniques issues de la croissance des cellules tumorales dans le colon ont été estimées autour de 0.4-5.6 kPa après un mois de croissance (Fernández-Sánchez et al., 2015). Les tumeurs possèdent très souvent des propriétés mécaniques différentes des tissus adjacents, elles sont notamment plus rigides. Par exemple, les tissus sains du sein ont une rigidité autour de 0.2 kPa alors que les tumeurs issues d'un cancer du sein possèdent des rigidités de l'ordre de 4 kPa (Levental et al., 2007).

• à l'échelle cellulaire :

A cette échelle, les évènements tels que la migration, la croissance et la prolifération de cellules voisines, ou encore leurs apoptoses sont autant d'événements mettant en jeu des forces mécaniques qui peuvent se propager aux cellules adjacentes, notamment dans les épithéliums. Les cellules sont capables d'exercer des forces sur les cellules voisines (Barry et al., 2014; Le Duc et al., 2010; Liu et al., 2010; Ng et al., 2014; Tambe et al., 2011; Trepat and Fredberg, 2011).

De plus, les perturbations mécaniques peuvent être directement dues aux propriétés mécaniques du substrat sur lequel se développent les cellules telles que la courbure, la texture, la topologie ou encore la rigidité du substrat. La composition de la matrice extracellulaire en fonction de sa localisation dans les tissus du corps, est très différente, et peut former une membrane basale pour les cellules épithéliales, une matrice osseuse, ou cartilagineuse. Les substrats des cellules peuvent ainsi avoir des propriétés viscoélastiques dont le module élastique va de 100 Pa pour le cerveau à 100 kPa pour un cartilage (Levental et al., 2007). D'autre part, le maillage serré des fibres de la matrice extracellulaire peut conduire à la déformation des fibroblastes migrant dans cet environnement mécanique en les comprimant (Harada et al., 2014).

En définitive, chacune de ces contraintes mécaniques exercées par l'environnement est potentiellement une information mécanique qui peut modifier le comportement ou le devenir des cellules. On peut également remarquer que ces contraintes mécaniques – de compression, tension ou cisaillement – peuvent être appliquées sur un tissu entier, sur une cellule, mais aussi directement sur une protéine. Il serait intéressant de comprendre la correspondance, par exemple, entre les forces de cisaillement appliquées à la surface d'une cellule, et les protéines de surface de la cellule à l'échelle moléculaire, et comment se transpose une force appliquée à l'échelle d'un tissu ou d'une cellule sur les protéines qui la composent.

1.3 Messagers et Voies de signalisation mécanosensibles

Les voies de signalisation, en biologie, regroupent un ensemble de mécanismes de communication cellulaire, qui se manifestent par une cascade de réactions biochimiques qui vont permettre la transmission d'un signal et en réponse modifier le comportement ou le devenir d'une cellule. Dans ce paragraphe, nous allons décrire des voies de signalisation mécanosensibles, c'est-à-dire dont l'activation dépend des stimulations mécaniques. Nous allons nous intéresser particulièrement, aux voies de signalisation dont certains messagers ont pu être clairement identifiés.

1.3.1 Exemples de protéines dont le rôle de messager est mécano-activable

Certaines voies de signalisation mécanosensibles qui ont été caractérisées, impliquent des protéines qui jouent le rôle de protéines « navettes » et peuvent aller activer certains gènes dans le noyau des cellules. Nous allons décrire ici certaines de ces voies de signalisation mécanosensibles :



La voie YAP/TAZ, ou voie Hippo, a comme effecteurs terminaux les co-facteurs de transcription YAP et TAZ chez les vertébrés, et qui sont l'homologue de Yorkie chez la *Drosophile*, et qui présentent tous deux, un domaine d'interaction avec les facteurs de transcription de la famille de TEAD, un domaine transactivateur TAD et un domaine PDZ. YAP est soit retenu dans le cytoplasme où sa concentration est finement régulée par une voie ubiquitine-ligase, soit transporté dans le noyau où il active ses gènes cibles par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription car il est incapable de se lier directement à l'ADN. Schématiquement, lorsque la voie Hippo est active, l'effecteur YAP, phosphorylé par les kinases Lats1/2, réside dans le cytoplasme et ne peut exercer ses effets prolifératifs et anti-apoptotiques (Zhao et al., 2007b). A contrario, lorsque la protéine YAP n'est pas phosphorylée, elle est nucléaire et active ses cibles transcriptionnelles via sa liaison aux facteurs de transcription TEAD1-4 (Vassilev, 2001). YAP peut ainsi participer à la régulation de la prolifération, la différentiation des cellules, et leur croissance.

Son rôle de médiateur clé de la réponse biologique aux propriétés mécaniques de l'environnement des cellules a été mis en évidence à différentes reprises :

- en fonction de la rigidité du substrat (Dupont et al., 2011; Sun et al., 2014; Thomasy et al., 2013) : YAP est re-localisé dans le cytoplasme des cellules cultivées sur des substrats mous, et la transcription des gènes dépendant de YAP est sur régulée sur des substrats plus rigides.

- de la surface de confinement du substrat (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011) : YAP est localisé dans le cytoplasme des cellules lorsque celles-ci sont confinées sur des surfaces de petites aires.

- de l'étirement des cellules (Aragona et al., 2013; Benham-Pyle et al., 2015; Cui et al., 2015) : YAP entre dans le noyau des cellules confluentes sous tension et étirées.

- de la densité cellulaire : (Aragona et al., 2013; Varelas et al., 2010; Zhao et al., 2007b) : YAP se trouve dans le cytoplasme des cellules confluentes en inhibition de contact.

- de l'application d'un flux (Kim et al., 2014; Zhong et al., 2013): sous l'application de contraintes de cisaillement sur les cellules, YAP se localise dans le noyau.

Le rôle de mécanotransduteur de YAP/TAZ n'est pas entièrement compris, en particulier la manière dont YAP reçoit l'information mécanique dans la cellule (Dupont, 2016; Piccolo et al., 2014). Dans ces deux revues sont relevées différentes inconnues, notamment autour des effecteurs en amont de YAP, du rôle de protéines partenaires, et de la manière dont YAP peut « sentir » les forces mécaniques. En effet, le rôle de la kinase Lat1/2 pour l'accumulation nucléaire de YAP a été remise en question lors de l'activation de YAP sur des substrats rigides (Dupont et al., 2011), alors qu'elle a été montré nécessaire dans d'autres stimulations mécaniques impliquant la voie Hippo (Zhao et al., 2012). Le rôle du cytosquelette dans la régulation de Lat1/2 n'est pas clair. De plus, YAP peut interagir avec plusieurs protéines des jonctions cellule-cellule : ZO-1 (Oka et al., 2010), l' α -caténine (Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011), mais le rôle des jonctions dans la séquestration de YAP n'est pas encore compris. De même, la nécessité de la contractilité du cytosquelette d'actine, des Rho-GTPases pour l'activation de YAP a été mise en évidence (Dupont et al., 2011), mais le lien direct avec YAP reste à déterminer.



- Mechanically stressed
- o Dans ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la voie de signalisation mécanosensible de la β-caténine. Cette voie de signalisation sera décrite en détails dans la partie 2.3. La β-caténine est une protéine dont le rôle est multiple : elle est à la fois un élément constitutif des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales, et un déterminant majeur, en tant que co-facteur de transcription dans le noyau, de la transcription de certains gènes conduisant à la prolifération et à la migration des cellules. Son rôle dans la mécanotransduction a été mis en évidence dans différents contextes biologiques normaux ou pathologiques : par exemple lors de la morphogénèse chez les embryons de Drosophile et de poisson zèbre (Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008; Farge, 2003), lors de la différenciation des cellules osseuses (Arnsdorf et al., 2009; Case et al., 2008; Hens et al., 2005; Kahn et al., 2009; Lara-Castillo et al., 2015; Norvell et al., 2004; Robinson et al., 2006; Santos et al., 2010; Sen et al., 2008; Sen et al., 2009; Sen et al., 2011a), lors de la croissance de certaines cellules cancéreuses (Armstrong and Esser, 2005; Avvisato et al., 2007; Fernández-Sánchez et al., 2015; Whitehead et al., 2008), ou encore dans des cultures de cellules sur différents supports et stimulées mécaniquement (Benham-Pyle et al., 2015; Benham-Pyle et al., 2016; Hirata et al., 2017; Samuel et al., 2011; Schernthaner et al., 2012). Chacune de ces perturbations mécaniques seront décrites dans la partie 2.3.2 et sont regroupées dans un tableau en Annexe.
- La protéine cytoplasmique zyxine (et ses homologues de la même famille Ajuba, Lpp, 0 TRIP6), connue pour réguler l'attachement du cytosquelette d'actine aux contacts cellulecellule ou cellule-substrat, peut jouer le rôle de navette entre les plateformes d'adhésion et le noyau des cellules grâce à sa structure. Le recrutement de la zyxine dans les fibres de stress est mécaniquement inductible et augmente avec l'application d'une force par AFM sur les cellules (Colombelli et al., 2009). La constante de dissociation de la zyxine aux fibres de stress des adhésions focales dépend de la tension des fibres de stress et de la rigidité du substrat, et se retrouve plus élevée sous une force plus faible ou une rigidité faible, alors que celle de la vinculine ne change pas (Lele et al., 2006). De plus, les cellules n'exprimant plus la zyxine présentent des anomalies dans le remodelage de l'actine à la suite de perturbations mécaniques telles que l'application d'un étirement cyclique, de cisaillement avec un flux, ou de cicatrisation; suggérant ainsi que la zyxine est particulièrement importante dans la régulation dynamique du réarrangement du cytosquelette. De plus, l'étirement cyclique du substrat de cellules musculaires lisses conduit à l'accumulation de la zyxine dans le noyau, et qui ne se retrouvent plus au niveau des adhésions focales (Cattaruzza et al., 2004; Suresh Babu et al., 2012). Cette translocation pourrait permettre la transcription de certains gènes (Wang and Gilmore, 2003), car il a été montré que la zyxine peut se lier aux facteurs de transcription Xanf1 et Gli1 chez le Xenope (Martynova et al., 2008). La question fondamentale reste de savoir quelle(s) molécule(s) sentent la force mécanique et permettent la localisation préférentielle de la zyxine dans les jonctions adhérentes, les adhésions focales, les fibres de stress ou le noyau. De même, les questions de la redondance et du rôle spécifique des autres membres de la famille de la zyxine tels que Ajuba, Lpp, TRIP6 dans la réponse à la sollicitation mécanique, n'ont pas été encore examiné. Par exemple, Ajuba interagit préférentiellement avec l' α -caténine au niveau des jonctions adhérentes et n'est pas retrouvé au niveau des adhésions focales (Marie et al., 2003). Son interaction avec l' α caténine est tension dépendante dans le sens où son recrutement à la membrane est plus faible en diminuant la quantité de Myoll et inversement quand la quantité de Myoll est

augmentée (Rauskolb et al., 2014). Ajuba peut également faire la navette avec le noyau où il peut interagir avec Gfi1 (Montoya-Durango et al., 2008) et réprimer la transcription de certains gènes impliqués dans la prolifération (Kanungo et al., 2000). Néanmoins pour Ajuba, il n'y a pas encore de preuve de son accumulation nucléaire dépendante de sollicitations mécaniques. Ajuba a un rôle dans la prévention de l'accumulation nucléaire de YAP en séquestrant les kinases à la membrane en amont de la signalisation Hippo lors l'augmentation de tension lors de la croissance des ailes de *Drosophile* (Rauskolb et al., 2014).

- Mtref/sref stressed
- o Merlin est une protéine du cytosquelette principalement localisée au niveau cortical aux jonctions cellule-cellule grâce à son domaine ERM, et qui interagit avec le cytosquelette dans sa conformation ouverte (revue : (Li et al., 2012)). En conformation fermée, Merlin peut se trouver dans le noyau et inhiber l'ubiquitine ligase E3 CRI4DCAF1 et ainsi modifier la transcription de certains gènes répresseurs de tumeurs (Li et al., 2010). La présence au noyau de Merlin n'a pu être mise en évidence que difficilement, peut-être à cause du même problème d'anticorps et de techniques de fixation qui avait été observé pour la βcaténine au noyau. Néanmoins, le transport nucléaire de Merlin a pu être mis en évidence (Muranen et al., 2005). Il a également été montré que lors de la migration collective de cellules épithéliales, une partie des protéines Merlin est localisée dans le cytoplasme au lieu de la membrane (Das et al., 2015). Cette relocalisation dépend de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine, et il a été suggéré que la force de poussée sur la membrane pour la création du lamellipode des cellules leaders est à l'origine de cette relocalisation. Merlin coordonne l'activation de Rac1, et permet la polarisation et la formation du lamellipode. Le rôle de Merlin n'est pas encore complètement compris. En tant que protéine intermédiaire entre la membrane plasmique, le cytosquelette et les jonctions adhérentes, il s'avère que sa fonction est également liée à la voie de signalisation de YAP/TAZ, et β -caténine mais aussi aux récepteurs tyrosine-kinases (Stamenkovic and Yu, 2010). En effet, Merlin peut être associé à la E-cadhérine via l' α -caténine (Gladden et al., 2010), et la perte de son expression peut conduire à une déstabilisation des jonctions, la perte de l'inhibition de contact, et une augmentation de l'activité de Rac et de la formation de lamellipode (Lallemand et al., 2003; Shaw et al., 2001). Merlin peut ainsi inhiber la voie β -caténine/Wnt (Kim et al., 2016). De même, la perte d'expression de Merlin conduit à une augmentation de YAP dans le noyau et inhibe la voie Hippo (Li et al., 2014), mais les mécanismes de la répression de la voie YAP/TAZ par Merlin ne sont pas encore compris.
 - Un autre messager important entre les forces mécaniques et l'expression génétique est le co-facteur de transcription MRTF (appelé aussi MAL). MRTF est un régulateur de la polymérisation de l'actine, mais il peut aller dans le noyau et activer le facteur de transcription SRF (Olson and Nordheim, 2010). Une tension mécanique de 0.65pN/µm² avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec du collagène sur les fibroblastes conduit à une activation de RhoA en 10 min, une phosphorylation de la kinase LIM, la déphosphorylation de la cofiline et l'accumulation nucléaire de MRTF-A (Zhao et al., 2007a). De même, l'étirement du substrat de cellules musculaires lisses conduit à l'activation de RhoA, à l'activation des gènes dépendants de SRF, et à leur différenciation en myofibroblastes (Hanna et al., 2009). Le même type d'étirement cyclique du substrat conduit également à une accumulation de MRTF dans le noyau en 2h pour des fibroblastes

embryonnaires de souris (Cui et al., 2015). Le traitement avec la cytochalasineD conduit aussi à une accumulation de MRTF dans le noyau en empêchant son association avec les monomères d'actine (Miralles et al., 2003). Dans l'ovocyte de *Drosophile*, lors la migration des cellules de bordures, on peut observer une accumulation nucléaire de SRF et cette accumulation nucléaire corrèle avec des cellules à la forme étirée (Somogyi and Rørth, 2004). La culture de kératinocytes sur des surfaces adhésives de différentes géométries conduit sur des surfaces restreintes de 20 μ m où les cellules sont peu étalées, à l'accumulation nucléaire de MRTF et à leurs différenciations, et corrèle avec un changement d'organisation du cytosquelette d'actine (Connelly et al., 2010).

- Le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans les réponses immunitaires et au stress des cellules, mais il a été également identifié comme une protéine mécaniquement activable. En l'absence de signaux extracellulaires, NF-κB est situé dans le cytoplasme. Il est retenu sous une forme inactive par son interaction avec les molécules de la famille des protéines IKK. Lors de contraintes de cisaillement par exemple, la phosphorylation de IKK ne retient plus NF-κB qui est alors accumulé dans le noyau et participe à l'activation de gènes anti-apoptotiques. Ce mécanisme a été observé dans diverses situations : dans les cellules endothéliales soumises à un flux de cisaillement (Khachigian et al., 1995; Mohan et al., 2006), dans les cellules épithéliales et endothéliales étirées cycliquement (Du et al., 1995; Pedrigi et al., 2017), et également pour des cellules cultivées sur des substrats de rigidité différentes (Ishihara et al., 2013b).
 - Parmi les effecteurs et les voies de signalisation mécaniquement activables, on peut noter les canaux ioniques. En effet, historiquement, ce sont les premiers éléments mécanosensibles qui ont été découverts (Guharay and Sachs, 1984). Par exemple, l'augmentation des contraintes de cisaillement imposées à des cellules endothéliales isolées en culture entraîne une hyperpolarisation de leur membrane cellulaire liée à l'activation de canaux potassiques (Hoger et al., 2002). L'hyperpolarisation accroît l'entrée du Ca²⁺, provoquant une accumulation du calcium dans le cytosol et une modification des fonctions cellulaires. Cependant, les mécanismes utilisés par les contraintes mécaniques pour contrôler les phénomènes d'ouverture/fermeture de ces canaux sont mal connus : lien direct avec une déformation du cytosquelette d'actine, avec d'autres récepteurs notamment tyrosine kinases, ou déformation directe du canal. De nombreuses revues détaillent les différents canaux mécanosensibles : canaux calciques, TRP, connexines, Piezo (Martinac, 2004; Peyronnet et al., 2014).
- Control Contro

NF-κB

Control

Mechanically stressed

Ca²⁺ O

Control

Mechanically stressed

Mechanically

ions channel

7798069

O Un dernier exemple de protéine navette entre le cytoplasme et le noyau est celui des protéines Smad, qui sont les médiateurs intracellulaires des facteurs de croissance TGFβ. TGFβ peut être séquestré par la matrice extracellulaire en interagissant avec, et en masquant ainsi son site d'interaction avec son récepteur cellulaire. Le remodelage de la matrice extracellulaire par exemple lors de la transmission de forces de contraction par les intégrines des myofibroblastes en migration, peut libérer mécaniquement ce facteur de la matrice (Hinz, 2009). Une fois détecté par son récepteur, la voie de signalisation TGFβ va se déclencher par l'intermédiaire des protéines Smad, qui vont pouvoir s'accumuler dans le noyau en quelques minutes.

Il existe plusieurs voies de signalisation qui peuvent être activées mécaniquement. Nous avons en particulier illustré, ici, le rôle important des protéines intermédiaires multifonctionnelles qui peuvent changer de localisation et de fonction entre le noyau et le cytoplasme par exemple. La manière dont l'information mécanique est transmise à ces protéines, l'implication de partenaires intermédiaires, et dans certains cas les preuves expérimentales de leur translocation, comme par exemple pour la β-caténine, merlin ou la zyxine, sont des éléments qui restent à étudier. Pour certaines de ces voies de signalisation, le messager ne peut pas à lui seul percevoir la perturbation mécanique, changer son activité, sa localisation et aller modifier la transcription de certains gènes. Ces processus nécessitent plusieurs protéines. Les protéines YAP/TAZ, β-caténine, zyxine, merlin, MRTF, NF-κB... sont des protéines cytoplasmiques dont l'activation à la suite d'une perturbation extérieure à la cellule, nécessite l'existence de protéines intermédiaires, capable de transmettre le signal mécanique (jonctions adhérentes, adhésions focales,...) et/ ou du cytosquelette d'actine.

1.3.2 Régulateurs communs du cytosquelette d'actomyosine

Dans ce paragraphe, nous allons revenir brièvement sur certains régulateurs communs des voies de signalisation mécaniquement activables, en particulier ceux qui régulent le cytosquelette d'actomyosine. On peut mettre en évidence deux catégories de protéines dont il a été montré qu'elles répondent aux perturbations mécaniques dans les cellules, et qui ne sont pas des co-facteurs de transcription dans le noyau des cellules, mais qui peuvent avoir un rôle en amont des messagers nucléaires que nous avons présentés dans la partie précédente. Il s'agit des régulateurs directs du cytosquelette d'actine tels que RhoA, Rac, Cdc42, des protéines qui interagissent directement avec, et de certaines kinases (Akt, MAPK, FAK, Src...).

Rho GTPases : Rho, Rac, Cdc42 et leurs effecteurs : réguler l'architecture du cytosquelette d'actine

Présentation des régulateurs de l'organisation du cytosquelette d'actine

La régulation du cytosquelette d'actomyosine peut être prise en charge par les protéines régulatrices Rho-GTPases. Celles-ci vont permettre d'articuler les différentes structures dans la cellule présentées en Figure 10. La famille de protéines des Rho-GTPases est au cœur de nombreuses voies de signalisation. Ce sont de petites hydrolases qui sont actives sous leur forme GTP, et inactives lorsque le GTP est hydrolysé en GDP. Cette famille de protéines est composée d'au moins une vingtaine de membres, et en particulier de RhoA, Rac1 et Cdc42, ayant à la fois des rôles complémentaires et opposés. Par exemple, le réseau d'actine peut adopter différentes architectures telles qu'un réseau très branché qui est nucléé en aval de Rac1 et Cdc42, ou un réseau non branché, très contractile qui dépend de RhoA et des myosines (Ridley, 2006). Dans les cellules en migration, RhoA régule la formation de fibres de stress d'actomyosine contractiles, et joue un rôle dans la contraction et la rétraction, notamment à l'arrière de la cellule migrante. Rac et Cdc42 quant à eux sont localisés à l'avant de la cellule migrante où Rac peut réguler la polymérisation de l'actine, permettant la formation de lamellipodes, tandis que Cdc42 régule la formation de filopodes, mais également la polarisation de la cellule et la direction de sa migration. Rho et Rac sont des protéines antagonistes, elles forment des gradients d'activité opposées entre l'arrière et l'avant de la cellule.

De plus, ces protéines peuvent ensuite affecter un grand nombre de protéines (Figure 12), plus d'une soixantaine d'effecteurs ont été recensés (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Sit and Manser, 2011). On peut citer notamment pour RhoA : mDia1-2, ROCK1-2, PIP5K..., pour Rac1 : PAK, WAVE/Scar... et pour Cdc42 : n-WASP, mDia, PAK... Par exemple, la liaison et l'activité de la myosine-II sont régulées par la phosphorylation de la MLC et il a été établi que RhoA contrôle cette phosphorylation via son effecteur ROCK.



Figure 12 – Régulateurs de l'actine : les Rho-GTPases : RhoA, Rac, Cdc42 et leurs effecteurs. (Adapté de (Bishop and Hall, 2000)

Régulateurs mécaniquement activables

De plus, les Rho-GTPases peuvent s'activer notamment à la suite de stimulations mécaniques. En effet, cela a été mis en évidence dans différents types de cellules, sur les cellules musculaires squelettiques dont la prolifération à la suite d'étirement cyclique dépend de Rac1 et FAK (Kumar et al., 2004), sur les cellules musculaires lisses soumises à un flux (Halka et al., 2008; Qi et al., 2010) ou étirées (Liu et al., 2007), sur les cellules endothéliales soumises à un flux (Tzima et al., 2001), ou encore avec les cellules mésenchymateuses souches MSC soumises à un étirement bi-axial (Sen et al., 2011b). Sur des substrats rigides, l'activité de RhoA est augmentée par rapport à des substrats mous (Provenzano et al., 2009; Wozniak et al., 2003). De même, l'activité de RhoA peut être augmentée à la suite de l'application extérieure de perturbations mécaniques telle qu'un cisaillement à la surface de cellules endothéliales en 30 min (Tzima et al., 2001), ou d'une compression issue de la tension des muscles des chondrocytes (Haudenschild et al., 2010), ou encore d'un étirement par des billes magnétiques fonctionnalisées avec de la fibronectine (Guilluy et al., 2011) ou l'étirement uniaxial du substrat (Goldyn et al., 2009).

Plusieurs revues illustrent l'activation des Rho-GTPases à la suite de stimulations mécaniques avec d'autres exemples (Hoon et al., 2016; Lessey et al., 2012; Provenzano and Keely, 2011). La compréhension des mécanismes moléculaires précis de l'activation mécanique des Rho-GTPases au niveau des jonctions adhérentes, ou de l'adhérence au substrat n'est pas encore complète. Il pourrait être aussi intéressant de discriminer selon les stimulations mécaniques, si l'activité des Rho-GTPases est uniquement permissive à l'activation des voies de signalisation tel qu'il a été montré par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques que Rho est nécessaire pour l'accumulation nucléaire de MTRF (Hanna et al., 2009; Zhao et al., 2007a), YAP (Dupont et al., 2011; Kim et al., 2014), ou de la β-caténine (Arnsdorf et al., 2009; Hirata et al., 2017; Samuel et al., 2011), ou si leur activité est augmentée ou diminuée directement en raison de la perturbation mécanique.

Protéines Kinases à la base de l'activation de nombreuses voies de signalisation et des Rho-GTPases

Les tyrosines kinases cytoplasmiques sont des protéines, également impliquées dans les voies de signalisation mécanosensibles, qui peuvent réguler à plusieurs niveaux un grand nombre de protéines, dont les Rho-GTPases mais pas seulement. Elles sont présentes à la fois dans les complexes protéiques d'adhérence au substrat au niveau des adhésions focales, et entre cellules au niveau des jonctions adhérentes. On peut notamment citer le rôle des kinases de la famille de FAK (FAK, PYK), Src (Src, FGR, Fyn, Yes, BLK, Lyn...) et Abl.

A ce titre, le rôle de FAK dans la mécanotransduction a été étudié dans différents contextes de la cellule au tissu. Les stimulations mécaniques telles que l'étirement des différents types cellulaires comme les fibroblastes (Moalli et al., 2001; Molina et al., 2001; Wang et al., 2001b), les osteocytes (Wozniak et al., 2000), les chondrocytes (Lee et al., 2000), les cellules musculaires lisses (Li et al., 2009; Nakayama et al., 2003),

squelettiques (Fluck et al., 1999), ainsi que les cellules épithéliales (Chaturvedi et al., 2006; Provenzano et al., 2009; Zhang et al., 2003) ou encore l'application d'un flux à la surface de cellules (Young et al., 2011), ou la modification de la rigidité du substrat (Alexander et al., 2008), affectent l'activité de FAK. De même, la kinase Src peut être activée suite à des perturbations mécaniques telles que l'application d'une force sur les intégrines de la cellule grâce au marquage fibronectine d'une bille manipulée avec des pinces optiques (Wang et al., 2005), sous l'application d'un étirement cyclique pour des cellules endothéliales (Sokabe et al., 1997), des fibroblastes (Moalli et al., 2001; Sai et al., 1999) ou épithéliales (Chaturvedi et al., 2006). Les activités des kinases Src et FAK sont modifiées par la rigidité du substrat également (Provenzano et al., 2009; Shih et al., 2011).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux protéines de la famille des tyrosines kinases Src et FAK, et à la régulation des voies de signalisation dans lesquelles elles interviennent. Leurs structures seront présentées pour FAK dans la partie 1.4.1 et Src dans la partie Résultats lorsque nous discuterons de leurs rôles respectifs.

En conclusion, l'activation mécanique de certaines voies de signalisation a permis de mettre en évidence des protéines aux rôles multiples, qui peuvent faire la navette entre différents compartiments et induire la transcription de certains gènes dans le noyau. De plus, ces voies de signalisation, et la réponse de la cellule aux stimulations impliquent souvent une réorganisation du cytosquelette d'actine. Ainsi, le cytosquelette est un acteur central, et les réponses de la cellule aux sollicitations mécaniques peuvent impliquer certains régulateurs communs et intégrer différents signaux. C'est le cas des Rho-GTPases qui peuvent restructurer le cytosquelette, et des tyrosines kinases cytoplasmiques qui permettent de faire le lien entre les protéines qui sentent les perturbations mécaniques et les régulateurs de l'actine.

1.4 Plateformes de mécanotransduction étudiées dans ce travail de thèse

Nous avons vu que les contraintes mécaniques extérieures peuvent être transmises aux cellules, et les cellules vont pouvoir activer différentes voies de signalisation pour répondre et s'adapter à ces sollicitations mécaniques. Mais, la grande question qui reste, encore aujourd'hui ouverte, est celle de la nature des récepteurs de cette information mécanique. Afin de mieux comprendre comment certaines protéines clés dans le déclenchement de voie de signalisation sont activées après une sollicitation mécanique, il est nécessaire d'identifier les complexes protéiques faisant le lien entre le milieu extracellulaire et l'intérieur de la cellule, et la manière dont ils sont à l'origine des premiers éléments de mécanosensation, et doivent posséder des protéines mécanotransductrices.

Certains complexes protéiques semblent avoir une position et un rôle privilégiés dans l'organisation de la cellule pour « sentir » en premier et détecter l'information mécanique extracellulaire (Figure 13). Parmi ces complexes, on peut nommer celui des adhésions focales qui font le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette interne de la cellule ; celui des jonctions cellule-cellule dont notamment les jonctions adhérentes, mais également la membrane plasmique avec ces canaux ioniques, ces récepteurs membranaires, son organisation lipidique..., ou encore les cils primaires de certains types de cellules.



Figure 13 – Exemple de mécanotransduteurs : cil primaire, canaux ioniques, adhésion focales, jonctions adhérentes.

Dans cette partie, nous introduirons les deux grandes plateformes de mécanotransduction qui ont été étudiées dans ce travail de thèse, à savoir les adhésions focales et les jonctions adhérentes. Dans les cellules épithéliales, les complexes d'adhésion cellule-substrat, majoritairement composés des adhésions focales et de protéines transmembranaires appelées intégrines, et les complexes d'adhésion entre cellules composés des jonctions adhérentes avec les E-cadhérines - protéines transmembranaires, sont tous deux liés au cytosquelette d'actine et partagent des molécules de signalisation communes.

1.4.1 Adhésion cellule-substrat

L'environnement immédiat de la cellule est constitué en général de cellules voisines et/ou d'un substrat. Ce dernier consiste en un entremêlement complexe de protéines fibreuses de plusieurs sortes telles que la fibronectine, la laminine, ou le collagène, de polysaccharides et de glycoprotéines. Ils constituent ce qu'on appelle la matrice extracellulaire. Les cellules peuvent établir des contacts avec cette matrice extracellulaire par l'intermédiaire de complexes que l'on appelle adhésions focales. Ces structures sont souvent impliquées dans la migration de cellules en 2D sur le substrat, bien qu'elles ne soient pas indispensables à tous les modes de migration (Petrie and Yamada, 2016).

1.4.1.1 Organisation moléculaire

Les adhésions focales sont des structures allongées de quelques micromètres qui permettent l'ancrage du cytosquelette d'actine au substrat. Elles servent de point d'ancrage au cytosquelette d'actomyosine, et donc aux forces contractiles générées par le cytosquelette qu'elles peuvent transmettre à la matrice extracellulaire. De plus, leur partie extracellulaire leur permet d'être sensible aux propriétés mécaniques de la matrice qui les entoure. Par leur localisation elles ont donc un rôle d'intégration et de transmission des différents signaux mécaniques intra et extracellulaires.

Intégrines – lien avec la matrice extracellulaire et au cytosquelette

La partie transmembranaire des adhésions focales est constituée de protéines de la famille des intégrines. Celles-ci se lient de façon spécifique à des protéines de la matrice extracellulaire. Ce sont des hétérodimères constitués de deux sous unités transmembranaires nommées α et β . Il existe plusieurs types de sous unités qui reconnaissent des ligands différents dans la matrice extracellulaire. L'intégrine possède une conformation native dite repliée (Figure 14.a). Dans cette conformation, elle est incapable de se lier à la matrice et diffuse librement dans la membrane, sa partie liante étant non exposée (Choquet et al., 1997; Rossier et al., 2012). L'engagement de l'intégrine a pour effet de diminuer sa mobilité. Il existe deux voies d'activation des intégrines permettant de changer leur conformation (Figure 14.b et c). La voie dite "inside-out" conduit à faire interagir l'intégrine inactive avec des partenaires cytoplasmiques comme la taline pour modifier sa conformation dans sa partie extracellulaire et modifier son affinité pour la matrice. L'autre voie d'activation possible des intégrines est la voie "outside-in", et correspond à une interaction entre la matrice et l'intégrine en premier lieu, qui va avoir pour effet de briser le pont salin entre les deux bras cytoplasmiques des sous-unités, et d'augmenter l'affinité de l'intégrine pour la taline (revue (Calderwood et al., 2013)).



Figure 14 – Schéma de l'activation des Intégrines. a) Hétérodimère formé à partir des sous unités transmembranaires α et 6 sous forme courbé inactif. b) Activation des intégrines par sa liaison avec un ligand extracellulaire comme le domaine RGD de la fibronectine : modèle Outside-In, ou par sa liaison dans le domaine cytoplasmique avec une protéine partenaire activatrice telle que la taline : modèle Inside-Out. c) Activation complète des intégrines dès lors sous sa forme complètement ouverte.

L'activité des intégrines ne se résume donc pas uniquement à sa capacité à se lier à la matrice extracellulaire et au cytosquelette en même temps. C'est sa capacité à modifier sa conformation, à osciller entre un état de faible et de forte affinité avec la matrice extracellulaire en fonction des protéines partenaires qu'elle recrute, qui définit son activité et sa fonctionnalité.

Organisation multi-protéique des adhésions focales

L'assemblage des adhésions focales est déclenché, en premier lieu, par la liaison des intégrines à leur substrat. Cette liaison est suivie par la formation d'un petit complexe protéique ponctuel, déjà raccordé à l'actine. Ces complexes focaux naissent en périphérie de la cellule, au front des lamellipodes par exemple, et leur formation est induite par Rac (Nobes and Hall, 1995). Ensuite, les adhésions focales maturent, c'est-à-dire qu'elles recrutent de nouveaux complexes protéiques avec les intégrines, et assemblent les fibres d'actine entre elles (Figure 15.b). Ces structures sont très dynamiques et peuvent s'assembler et se désassembler, s'étaler... (Figure 15.a). Plusieurs revues décrivent en détails les mécanismes d'assemblage et désassemblage des adhésions focales, et le processus de "molecular clutch" ou embrayage moléculaire lors de la migration cellulaire (Gardel et al., 2010; LaCroix et al., 2015).



Figure 15 – Schéma de cellule en migration. a) Dynamique des adhésions focales qui sont soient stables, soit se dessassemblent pour s'assembler plus loin, soit augmentent de taille. b) Maturation des adhésions focales dans un lamellipode avec la création de complexes focaux à l'avant et l'assemblage/désassemblage progressif en fonction du front de migration.

Dans sa partie intracellulaire, ce sont plus de cent cinquantaine protéines qui ont été recensées dans ces complexes se liant à l'actine (Zaidel-Bar et al., 2007). Ces protéines sont des régulateurs de l'actine, des protéines d'ancrage entre les intégrines et l'actine, mais aussi des protéines impliquées dans des voies de signalisation comme des kinases, des phosphatases, ou des protéines G. Ces dernières protéines de signalisation permettent de moduler la dynamique et l'assemblage des adhésions focales.

L'organisation moléculaire du complexe a été mise en évidence de façon détaillée en combinant l'interférométrie et une technique de super-résolution PALM (Bertocchi et al., 2010; Case and Waterman, 2015). Les auteurs ont défini trois zones : un premier niveau de signalisation proche des intégrines, un second pour la transduction des forces regroupant la taline et la vinculine, et un dernier niveau avec les régulateurs de l'actine (Figure 16.a). Ils ont également montré que le recrutement des différentes protéines dépend de la maturation du complexe (Case et al., 2015) (Figure 16.b). Parmi toutes ces protéines, on peut distinguer notamment la taline, la paxiline, la vinculine ou les kinases FAK et Src.



Figure 16 – Organisation moléculaire du complexe des adhésions focales. a) Les adhésions focales s'organisent en nanodomaines 3D dont on peut distinguer plusieurs niveaux en z en fonction du recrutement des protéines. Dans un lamellipode, à l'aval de l'adhésion focale on retrouve un fort flux rétrograde d'actine, un enrichissement en paxilline et de fortes forces de traction exercées sur le substrat ; à l'aval les adhésions focales interagissent avec les fibres de stress d'actine qui sont enrichies en protéines qui se lient à l'actine telles que l' α -actinine, la zyxine, ou VASP, et ont un faible flux rétrograde d'actine et de plus faible force de traction. b) Modèle de formation et maturation des intégrines avec l'activation du recrutement de la vinculine en fonction de la formation des adhésions focales et au sein d'un complexe plus grand d'adhésion focale. (Issu de Case et al. 2015).

Taline

La taline est un médiateur essentiel de l'activation des intégrines. La taline étant capable de lier également l'actine, elle permet à elle seule à créer un continuum entre le cytosquelette d'actomyosine et la matrice extracellulaire (Calderwood et al., 2013). La taline peut lier d'autres protéines adaptatrices tel que l' α -actinine, elles-mêmes capables d'interagir avec d'autres protéines telles que la zyxine, ou la vinculine, recrutant à leur tour la paxilline, ou la tensine (Figure 17). L'activation de la taline nécessite l'ouverture de la protéine, ce mécanisme est encore mal compris mais pourrait être dû à une interaction avec PIP2 à la membrane et/ou l'interaction avec les protéines PKC, Rap1 ou RIAM (Das et al., 2014). L'application d'une force peut permettre l'ouverture de la taline *in vitro* (Perez-jimenez et al., 2016; Yao et al., 2015; Yao et al., 2016). Dans les cellules, l'étirement de la taline a été mis en évidence grâce au marquage de la taline par deux fluorophores de part et d'autre de la protéine. L'observation des fluorophores par TIRF a pu mettre en évidence un passage d'une longueur de 80 nm à 350 nm lorsque la taline est dépliée (Margadant et al., 2011). De plus, il a été aussi mis en évidence que la taline est bien sous tension dans les cellules, un tension autour de 7-10 pN grâce à l'utilisation de senseurs de force moléculaire FRET (Austen et al., 2015; Kumar et al., 2016).



Figure 17 – Structure de la taline. En haut : représentation schématique ; en bas : modèle 3D de la taline défini à partir du cristal et des données RMN. La taline est composée de différents domaines : domaine N-terminal FERM composé de 4 sous domaines qui interagit avec les intégrines et FAK, puis de plusieurs domaines cylindriques R1-R13qui présente des domaines VBS qui peuvent se lier à la vinculine. Notamment les domaines R1-R4 peuvent être en configuration repliés et masquer ces

domaines d'interaction avec la vinculine et s'ouvrir sous certaines conditions quand la taline est activée (adapté David A. Calderwood et al. 2013)

Paxilline

La paxilline est une protéine de 68kDa possédant de multiples domaines qui lui servent à recruter de nombreuses protéines partenaires adaptatrices (Figure 18) (Brown and Turner, 2004). La phosphorylation de la paxilline est médiée par FAK (Pasapera et al., 2010). De plus, la phosphorylation de la paxilline sur sa tyrosine 118 est nécessaire pour la maturation des plaques focales. Cette phosphorylation se traduit par un recrutement de la vinculine et une augmentation du temps de résidence de la paxilline dans les adhésions.



Figure 18 – Structure de la paxilline et de ses différents domaines avec en N terminal 5 domaines riches en leucine (LD), et en C terminal 4 domaines protéiques à doigt de zinc (LIM). Ces différents domaines interagissent avec différents protéines et présentent de nombreux sites de phosphorylation qui modulent son affinité avec ses différents partenaires (adapté de Brown et al.2004)

FAK

FAK est une tyrosine kinase cytoplasmique de 125kDa possédant un domaine FERM N-terminal, un domaine non structuré, puis son domaine kinase, et enfin un domaine FAT en C-terminal (Figure 19.a). La kinase FAK est en conformation fermée lorsqu'elle est inactive (Figure 19.b). La kinase FAK peut être activée par les intégrines à la membrane plasmique (Schaller et al., 1994), par certains facteurs de croissance (Sieg et al., 2000) L'ouverture de FAK par le déplacement du domaine FERM est une étape qui n'est pas entièrement comprise, mais qui pourrait faire intervenir l'interaction du domaine FERM avec PIP2 à la membrane, et également la tension dans la protéine (Hamada et al., 2000; Lietha et al., 2007; Zhou et al., 2015). Une fois ouverte, FAK s'autophosphoryle en tyrosine 397. Cette phosphorylation permet au domaine SH2 de Src de se lier à FAK, et le domaine SH3 de Src se lie à un domaine PxxP adjacent (Eide and Turck, 1995). Src peut ensuite phosphoryler d'autres tyrosines : les tyrosines 576 et 577, présentes dans la partie kinase de FAK, qui permettent d'augmenter les propriétés kinase de FAK (Calalb et al., 1995; Schlaepfer and Hunter, 1996), et la tyrosine 861 qui permet ensuite, une fois phosphorylée, de recruter p130cas. Ces phosphorylations préviennent l'autoinhibition de FAK par son domaine FERM (Lietha et al., 2007). La kinase FAK a été étudiée dans le contexte de la migration cellulaire (revue :(Frame et al., 2010; Mitra et al., 2005)).



Figure 19 – a) Structure de la tyrosine kinase FAK et de ses différents domaine en N terminal son domaine FERM, puis son domaine kinase, son domaine non structuré et en C-terminal son domaine FAT. b) Schéma de l'activation de FAK : sous sa forme inactive FAK est en configuration fermé, une fois que ses domaines FAT et FERM sont liés à leur partenaire, la kinase FAK s'ouvre et son domaine kinase peut alors autophosphoryler sa tyrosine Y397. Dès lors le domaine SH2 de Src peut se lier sur cette tyrosine et phosphoryler les tyrosines Y576-577 et 861 pour permettre à FAK d'avoir une plus grande activité kinase et de se lier à p130cas (Adapté de Mitra et al. 2005).

Vinculine

La vinculine est une protéine de 116kDa composée d'un domaine N-terminal qui constitue sa tête qui interagit avec l' α -actinine, la taline, l' α -caténine, et un domaine C-terminal qui lui interagit avec le paxilline, l'actine ou PIP2 (DeMali, 2004) (Figure 20.a et b). Elle aussi possède un état de conformation fermée qui masque certains de ces domaines d'interaction (Figure 20.c) (Bakolitsa et al., 2004). Son recrutement est majoritaire au niveau des adhésions focales, mais la vinculine peut aussi être recrutée au niveau des jonctions adhérentes et se trouve dans le cytoplasme (Ziegler et al., 2006). Son activation sous forme ouverte a été mise en évidence notamment au niveaux des adhésions focales plutôt que dans le cytoplasme, et seule une partie de la vinculine est sous sa conformation ouverte dans les adhésions en train de se former dans les protrusions (Chen et al., 2005). Il a aussi été montré que la conformation fermée de la vinculine est plus présente au niveau distal à l'avant de l'adhésion vers la protrusion, et sa conformation ouverte au niveau proximal à l'arrière là elle s'associe avec l'actine et la taline (Figure 16) (Case et al., 2015). Pour visualiser l'état ouvert de la vinculine dans les cellules, a été développé un senseur de conformation FRET (Chen et al., 2005). Néanmoins, l'origine du mécanisme d'activation en conformation ouverte de la vinculine est encore débattue, et peut avoir lieu à la suite de multiples liaisons conjointement avec ses partenaires tels que PIP2, l'actine ou la taline (Bakolitsa et al., 2004) ou uniquement à partir de la liaison à un seul partenaire tel que la taline ou l' α -actinine (Bois et al., 2006; Izard et al., 2004).



Figure 20 – a) Structure des différents domaines de la vinculine. b) Modèle 3D de la vinculine issu des données cristallographiques. c) Schéma de l'activation de la vinculine dans sa configuration ouverte (adapté de DeMali et al. 2004 et Bakolitsa et al. 2004)

1.4.1.2 Rôle comme mécanosenseur

L'une des premières preuves expérimentales mettant en évidence les forces exercées par les cellules en migration date des années 1980 (Harris et al., 1980). Les intégrines ont été découvertes à la fin des années 1980, et dès les années 1990 leurs propriétés de mécanotransducteurs ont été mises en avant. Par exemple, ses propriétés ont été caractérisées lors de l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées avec de la fibronectine, et qui ont permis de mettre en avant la rigidification du cytosquelette à la suite de l'application d'une force via les intégrines (Wang et al., 1993), ou encore avec les premières utilisations de surfaces fonctionnalisées contrôlées, et adhésives pour contrôler la forme des cellules (« micropattern ») (Singhvi et al., 1994). Les pinces optiques ont permis de mettre en avant le lien entre le recrutement des intégrines en fonction de la rigidité appliquée et le renforcement de l'adhésion (Choquet et al., 1997). Finalement, la première démonstration de la croissance des adhésions focales en fonction de la force a été mise en évidence en 2001 (Riveline et al., 2001), et le renforcement de l'adhésion sous l'application d'une sollicitation mécanique cyclique a été confirmé par la suite (Kong et al., 2013).

Plusieurs études ont, par la suite, révélé le rôle important de la taline (Margadant et al., 2011), la vinculine (Dumbauld et al., 2013; Goldmann et al., 2013; Liu et al., 2016) ou encore la paxilline (Zaidel-Bar et al., 2006) dans la détection de différentes rigidités des substrats.

D'autres études ont montré qu'il existe une relation complexe entre les forces de traction à l'échelle cellulaire et la dynamique des protéines des adhésions focales. Notamment, Balaban et al. 2001 ont montré que la taille des adhésions focales est corrélée avec une augmentation de force de traction (Balaban et al., 2001). Plus tard, il a été montré que ceci est uniquement vrai pour des adhésions focales qui sont en train de se développer (Stricker et al., 2011).

L'insertion d'un senseur FRET de force moléculaire entre la tête et la queue de la vinculine a permis de montrer que la vinculine pouvait être effectivement sous tension dans les adhésions focales (Grashoff et al., 2010). La distribution de cette tension en fonction de la distribution spatiale des adhésions focales et des forces de traction cellulaire est complexe (Chang and Kumar, 2013). Cette complexité provient certainement du fait qu'il existe une multitude d'adaptateurs qui permet aux adhésions focales de s'organiser de différentes manières au sein d'une même adhésion focale entre l'avant et l'arrière, mais également entre des adhésions focales en train de se créer et grandir, et celles qui sont en train de se désassembler, et ce de manière très dynamique. Néanmoins, les forces de traction et la tension moléculaire dans la vinculine sont corrélées positivement pour différentes rigidités de substrat, et la tension dans la vinculine est plus élevée à l'avant de l'adhésion focale vers les protrusions (Sarangi et al., 2016). L'utilisation des senseurs FRET de tension moléculaire insérés dans la taline et l'intégrine, a permis de confirmer que ses protéines sont sous tension (Austen et al., 2015; Nordenfelt et al., 2016). Dans les adhésions focales matures, il a été montré que la vinculine supportait des forces de l'ordre de 2.5 pN, la taline de l'ordre de 7 à 10 pN, et la β intégrine de l'ordre de 1.5 pN. Ces mesures ont été faites dans différents types cellulaires pour les intégrines dans des cellules immunitaires : Jurkat T, pour la taline des fibroblastes, et la vinculine à la fois des fibroblastes, des cellules épithéliales (cf Table 1). Il a pu être mis en évidence qu'à travers les intégrines, les cellules pouvaient exercées des forces moyennes sur le substrat entre 1-6 pN en utilisant des senseurs de force extracellulaires, basés sur le même ressort que celui pour les senseurs intracellulaires (Chang et al., 2016; Morimatsu et al., 2013), et des forces allant de 15 à 40 pN avec des senseurs basés sur le dépliement de l'ADN qui sont sensibles uniquement à une force seuil qui permettra le dépliement du double brin d'ADN de manière non réversible (Blakely et al., 2014; Wang and Ha, 2013; Zhang et al., 2014).

L'utilisation future des senseurs de force moléculaire dans la taline, les intégrines, ou la vinculine va permettre de mieux comprendre comment se propagent les forces dans le complexe, et d'avoir une meilleure description de leur activité spatiale et temporelle. De même, l'utilisation des techniques de super-résolution a permis de mettre en évidence l'organisation du complexe, mais elle permet également de suivre la dynamique en molécules uniques. Ce genre d'étude couplée à ce que l'on connait déjà sur la dynamique et la mobilité des protéines des adhésions focales par FRAP, permettra de mieux identifier l'organisation spatiale et temporelle des adhésions en fonction des stimulations mécaniques appliquées. Par exemple, lors de leur migration, les adhésions focales des cellules ne sont pas les mêmes entre les adhésions focales naissantes au front du lamellipode, celles un peu plus en arrière qui peuvent former des complexes plus larges où les forces de traction sur le substrat sont les plus fortes, celles au milieu de la cellule, et celles à l'arrière qui se désassemblent mais où également les forces de traction sont élevées. Mais pour autant on ne connait pas encore l'organisation nanoscopique de chaque protéine au sein de chacune de ces adhésions focales en terme de recrutement de protéine partenaires, de changement conformationnel pour les protéines mécanosensibles, de tension au sein de chacune de ces protéines avec une résolution en molécules uniques... ni comment certaines adhésions à l'avant du lamellipode maturent et s'organisent en agrégats tandis que d'autres disparaissent (Sun et al., 2016).

1.4.2 Adhésion cellule-cellule

Les cellules épithéliales représentent plus de 60% des cellules constituant les organismes vertébrés. Ces cellules sont caractérisables par leur adhérence entre elles. Ces propriétés adhésives leur permettent de remplir plusieurs fonctions (1) assurer une intégrité à la barrière épithéliale du tissu, (2) communiquer en laissant passer certains métabolites, et (3) transmettre les forces mécaniques de cellules en cellules.

1.4.2.1 Organisation moléculaire

Afin d'adhérer, les cellules épithéliales possèdent différents types de complexes protéiques : les jonctions serrées de fermeture (tight junctions) reposant sur les protéines zonula occludens, les jonctions communicantes (gap junctions) médiées par les connexines, les desmosomes et les jonctions adhérentes reposant sur les cadhérines. La découverte de ces différents complexes est racontée d'un point de vue historique dans la revue Franke (Franke, 2009). Nous allons décrire uniquement le complexe des jonctions

adhérentes comprenant des cadhérines dans ce paragraphe. Il existe plus d'une vingtaine de membres dans la famille des cadhérines chez les vertébrés, parmi lesquelles les E,N ou VE cadhérines qui sont exprimées en fonction de la spécificité du tissu (Hulpiau and van Roy, 2009).

Les E-cadhérines

Les cadhérines sont des glyco-protéines transmembranaires qui peuvent interagir entre elles de manière calcium dépendante, et qui ont été découvertes en 1982 (Yoshida and Takeichi, 1982). Pour les cellules épithéliales, la cadhérine la plus abondante est la E-cadhérine. Elle est composée dans sa partie N-terminal extracellulaire de 5 ectodomaines EC, chacun séparé par trois sites de fixation de l'ion Ca²⁺ (Figure 21.a) (Parisini et al., 2007). Ces domaines EC sont au cœur des propriétés d'interaction (Shapiro et al., 1995). Sous la complexation des ions Ca²⁺, les domaines EC des E-cadhérines s'associent pour former une liaison homophilique (Figure 21.b). La structure de cette interaction entre cadhérines est encore aujourd'hui débattue, et plusieurs modèles existent (Figure 21.c). Le modèle de dimérisation « strand dimer » permet l'adhésion entre seulement le dernier domaine EC1 des deux E-cadhérines en conformation trans. Un autre modèle d'interaction trans permet la dimérisation des cadhérines en formant un X, c'est sous cette forme que les cadhérines forment une liaison renforcée sous l'application d'une force de 30 pN in vitro (Rakshit et al., 2012). Un autre modèle dit d'interdigitation, lui, permet une interaction entre les différents domaines EC (Sivasankar et al., 2001). De plus, les cadhérines peuvent interagir également en position cis. Ces protéines peuvent ainsi s'agréger latéralement, c'est-à-dire former des assemblages entre plusieurs protéines appelés « clusters ». Ainsi les différentes modulations possibles des domaines extracellulaires pourraient réguler la force d'adhésion, mais cela n'a pas encore été démontré expérimentalement dans les cellules, bien que l'utilisation de micropipette ait pu mesurer les différences d'adhérence entre cadhérines avec différents domaines EC (Chien et al., 2008; Tabdili et al., 2012a). Différentes revues discutent du rôle des domaines EC dans la stabilité, l'assemblage, l'agrégation des E-cadhérines (Leckband and de Rooij, 2014; Tan et al., 2016).

Grâce à son domaine transmembranaire et sa partie C-terminale intracellulaire, la E-cadhérine peut relier l'extérieur à l'intérieur de la cellule. Son domaine intracellulaire, très conservé pour les différents types de cadhérines classiques, lui permet de se lier au cytosquelette d'actine de manière indirecte. Cette liaison avec le cytosquelette est nécessaire pour former une adhésion stable. En effet, sous cytochalasineD qui conduit à la dépolymérisation de l'actine, le nombre de contacts cellule-cellule diminue (Adams et al., 1998; Angres et al., 1996), et l'utilisation de E-cadhérine tronquée en C-terminale dont la liaison au cytosquelette est empêchée ou la déplétion en α -caténine, diminue l'adhésion entre les cellules (sans complètement l'abolir en fonction des types cellulaires présentant d'autres types de cadhérines ou d'autres types de jonctions cellule-cellule) (Capaldo and Macara, 2007; Chu et al., 2004; Nagafuchi et al., 1994; Thomas et al., 2013). Le domaine intracellulaire de la E-cadhérine peut se lier à deux autres protéines : la β -caténine et la caténine p120 (Figure 21.a).



Figure 21 – a) Schéma de la structure des différents domaines des E-cadhérines composée dans sa partie extracellulaires de 5 ectodomaines, d'un domaine transmembranaire et d'une partie intracellulaire non structurée. b) Schéma des domaines extracellulaires de deux E-cadhérines en interaction en configuration trans uniquement par les domaines EC1. c) Différents modèles pour l'interaction entre les E-cadhérines : (i) configuration trans avec une interaction par les domaines EC1 selon un modèle « strand dimer », selon un modèle « X dimer », ou par différents domaines EC1 qui donnent lieu à une interaction par interdigitation ; (ii) configuration cis avec une interaction latérale des domaines EC1 et EC2 ; (iii) formation des assemblages en cluster des E-cadhérines par des interactions cis et trans (adapté de Leckband and de Rooij 2014).

La β-caténine

La β-caténine a d'abord été identifiée chez la *Drosophile* sous le nom d'Armadillo au tout début des années 1990 (Peifer and Wieschaus, 1990). La structure de la β-caténine dans les cellules épithéliales de mammifères est basée sur 3 domaines (Figure 22.a) :

- une région centrale comprenant 12 répétitions du domaine armadillo – répétitions de 3 hélices α –, tous impliqués dans l'interaction avec le domaine intracellulaire de la E-cadhérine. En effet, la queue de la E-cadhérine est non structurée sans son interaction avec la β -caténine, et la structure de l'interaction entre la β -caténine et la E-cadhérine a été étudiée par cristallographie (Huber and Weis, 2001) (Figure 22.b). La dissociation de la β -caténine de la E-cadhérine conduit à sa dégradation en faisant apparaitre la séquence PEST riche en proline, acide glutamique, serine et thréonine qui est un signal de dégradation de la E-cadhérine (Huber et al., 2001). La β -caténine peut s'associer avec la E-cadhérine directement lors de leurs synthèses dans le réticulum endoplasmique, et permet le bon adressage à la membrane de la cadhérine (Chen et al., 1999). D'autre part, ce domaine central peut interagir également avec les complexes de dégradation Axine et APC dans le cytoplasme, et dans le noyau avec les facteurs de transcription TCF/LEF.

- un domaine N-terminal, non structuré, qui permet en partie à la β -caténine de se lier à l' α -caténine, et surtout qui contient les acides aminés qui une fois phosphorylés conduisent à sa dégradation par l'ubiquitine ligase TrCP1.

- un domaine C-terminal, qui permet à la β-caténine d'interagir avec l'ADN.



Figure 22 – a) Structure de la β -caténine avec en N-terminal le domaine régulant la dégradation de la β -caténine, en bleu ciel le domaine d'interaction avec l' α -caténine et en bleu foncé les 12 domaines armadillo, b) Modèle 3D de la β -caténine et de la queue cytoplasmique de la E-cadhérine, domaines armadillo en bleu foncé, en bleu clair domaine d'interaction avec l' α -caténine, et en multi-couleurs les 5 domaines de la queue de la E-cadhérine (Issu de Huber & Weis 2001).

De nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent affecter la β -caténine. Notamment sa phosphorylation en N-terminal sur les sérines 33, 37 et 45 et la thréonine 41 conduit à sa dégradation. Les phosphorylations des tyrosines 654 et 142 conduisent respectivement à une diminution d'affinité avec la E-cadhérine et l' α -caténine. La β -caténine est également un composant majeur de la voie de signalisation du même nom et est l'effecteur nucléaire de la voie Wnt. Son implication en tant que co-facteur de transcription dans le noyau sera discutée dans la partie 2.3. Nous reviendrons, également, sur la régulation de l'interaction du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine dans la partie 2.2.

p120

p120 fait partie de la famille des caténines et interagit avec la queue de la E-cadhérine. Il contient 9 domaines armadillo qui se lient à la partie juste à côté du domaine transmembranaire de la E-cadhérine. La déplétion de p120 conduit à l'internalisation des E-cadhérines, et à leurs dégradations (Davis et al., 2003). Le rôle de p120 dans la stabilité des E-cadhérines a été étudié à différentes reprises (Xiao et al., 2007). Il a été monté qu'une partie de p120 interagit avec la E-cadhérine au niveau de sa séquence DEEGGGE (646-652) qui a été montré comme nécessaire pour l'endocytose de la cadhérine (Nanes et al., 2012). p120 permet donc de prévenir l'endocytose des cadhérines en masquant cette région de la cadhérine en interagissant avec. De plus, une autre partie de p120 interagit avec la E-cadhérine au niveau des sites Y753-Y754-Y755, qui, s'ils sont phosphorylés par Src préviennent la liaison avec p120, et permettent l'ubiquitination de la E-cadhérine par l'ubiquitine ligase Hakai (Fujita et al., 2002). Ces sites ne sont pas conservés chez les autres types de cadhérines VE ou N alors que la séquence DEEGGGE l'est. Par ailleurs, p120 est décrit comme un régulateur des signaux dépendants des Rho-GTPases (Niessen et al., 2011).

L'α-caténine

L' α -caténine est nécessaire pour le recrutement du cytosquelette aux jonctions adhérentes, et sa déplétion conduit à une diminution de l'adhésion entre les cellules (Thomas et al., 2013). L' α -caténine est une protéine qui peut se lier à l'actine filamenteuse et à la β -caténine au niveau des jonctions (Figure 23.a et b), et aussi à elle-même. Son interaction avec la β -caténine se fait via son domaine VH1, ce qui prévient sa dimérisation (Pokutta and Weis, 2000). De plus, elle peut se lier à la F-actine grâce à son domaine VH3 directement, ou indirectement grâce au recrutement d'autres protéines partenaires telles que la vinculine (Drees et al., 2005;

Weiss et al., 1998; Yamada et al., 2005), l' α -actinine (Knudsen et al., 1995), ou l'afadine (Pokutta et al., 2002) ou l'EPLIN (Abe and Takeichi, 2008). L' α -caténine se lie à la vinculine avec son domaine M1 (Ishiyama et al., 2013; Rangarajan and Izard, 2012). Le domaine M1 peut être masqué par les domaines M2 et M3 lorsque l' α caténine est en conformation fermée (Figure 23.c). L'ouverture de l' α -caténine est nécessaire pour son interaction avec la vinculine (Choi et al., 2012). L' α -caténine peut s'ouvrir sous l'application d'une force *in vitro* (Yao et al., 2014), et dans les cellules, il a également pu être mis en évidence que l' α -caténine est effectivement sous tension (Acharya et al., 2017) et peut changer de conformation (Kim et al., 2015; Yonemura et al., 2010).



Figure 23 – a) Structure de l' α -caténine avec en N-terminal son domaine de liaison à la β -caténine et puis ces domaines repliées M1-2-3 et son domaine C-terminal pouvant se lier à l'actine. b) Modèle 3D de l' α -caténine issu des données cristallographiques (issu de Rangarajan and Izard, 2012 et de Ishiyama et al., 2013). c) Activation de l' α -caténine en conformation ouverte avec dépliement de ses domaines M1 à M3 permettant le recrutement de la vinculine (adapté de Leckband and de Rooij 2014).

Complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine

La structure du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine avec p120 est reportée sur la Figure 24.a à partir des connaissances des structures 3D des interactions entre les différentes protéines *in vitro*. L'organisation moléculaire du complexe, dans les cellules, a été mise en évidence de façon détaillée en combinant l'interférométrie et une technique de super-résolution PALM comme pour les adhésions focales (Bertocchi et al., 2016). Cette structure est composée d'un premier niveau proche de la membrane plasmique comprenant la E-cadhérine transmembranaire, p120 et la β -caténine, et l' α -caténine puis un niveau regroupant différentes protéines permettant de moduler l'organisation de l'actine avec la vinculine, la zyxine, l' α -actinine, WASP ... (Figure 24.c).



Figure 24 – a) Représentation des structures 3D du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine à la membrane (issu de Takeichi 2014). b) Représentation schématique du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine lorsqu'il recrute ou non la vinculine (issu de Takeichi 2014). c) Organisation moléculaire du complexe des jonctions adhérentes en nanodomaines 3D (issu de Bertocchi et al. 2016).

De plus, ces structures peuvent s'organiser et s'assembler ensemble en agrégat ou « cluster » grâce à la partie extracellulaire de la cadhérine, mais également à sa queue cytoplasmique et ses partenaires dans le cytoplasme. Ces assemblages peuvent se former avant même la formation d'un contact cellule-cellule. Ils sont stabilisés par le lien avec le cytosquelette d'actine, et leur endocytose y est plus faible que dans les régions où les E-cadhérines ne sont pas regroupées (Strale et al., 2015; Truong Quang et al., 2013; Wu et al., 2015). Une fois les jonctions établies, les contacts peuvent « maturer », et recruter de nouveaux partenaires du cytosquelette comme la zyxine, l' α -actinine, WASP... (Figure 24.c). De plus, lorsque les jonctions sont matures, par exemple pour une monocouche confluente, la vinculine peut se lier à l' α -caténine alors en conformation ouverte et renforcer l'attachement du cytosquelette d'actine (Figure 24.b) (Takeichi, 2014). Déterminer sous quelles conditions, en fonction du type cellulaire, on peut observer des jonctions adhérentes où la vinculine est recrutée ou non, est un enjeu pour mieux caractériser la mécanique des jonctions adhérentes.

Historiquement, l'hypothèse de l'ancrage de l'actine aux cadhérines a été proposée à partir des expériences dans les cellules qui ont mises en évidence qu'un lien avec le cytosquelette était nécessaire pour assurer la formation et la stabilité des contacts cellule-cellule (Adams et al., 1998; Angres et al., 1996; Capaldo and Macara, 2007; Chu et al., 2004; Nagafuchi et al., 1994). Mais ce modèle ne rendait pas compte des interactions de l' α -caténine avec l'actine et avec la β -caténine qui apparaissaient mutuellement exclusives *in vitro*. En effet, *in vitro*, le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine n'a pas pu être isolé par des méthodes classiques par immunoprécipitation et purification, même en introduisant la vinculine ou l' α -actinine. De plus, la mobilité de l' α -caténine à la membrane est bien plus rapide que celles de la E-cadhérine ou de la β -caténine, suggérant que le lien avec l'actine n'était peut-être pas si stable (Gates and Peifer, 2005). Ce sont les résultats de 2005 issus des articles Dress et al. et Yamada et al. qui ont permis de mettre en évidence deux populations d' α -caténine en compétition. Ces deux populations d' α -caténine, dont l'interaction est basée sur le domaine VH1, sont composées d'une forme monomérique qui se lie préférentiellement à la β -caténine, et une dimérique qui se lie exclusivement à la F-actine et inhibe sa polymérisation en étant en compétition avec le complexe Apr2/3

(Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). Il aura fallu attendre 2014 pour comprendre pourquoi il était si dur de purifier ensemble toutes les protéines du complexe, avec le travail de Buckley et al. qui a montré que le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine est plus stable sous une force de 5 pN et se comporte comme catch bond – c'est-à-dire que le temps de vie de l'interaction du complexe est plus grand sous l'application d'une force que sans jusqu'à un certain seuil où le lien va se désassembler (cf 1.5.1) – (Buckley et al., 2014).

L'étude de l'organisation dynamique du cytosquelette au niveau des jonctions adhérentes a permis d'avoir une idée plus claire du fonctionnement des jonctions adhérentes proposé sur la Figure 24 (Mège and Ishiyama, 2017). Savoir s'il existe différentes sous populations d'actine qui s'associent et recrutent différents partenaires dans le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine en fonction des stimulations reste encore à approfondir pour pouvoir comprendre comment ces structures fonctionnent et soutiennent les forces mécaniques entre cellules.

1.4.2.2 Rôle comme mécanosenseur

Il y a 15 ans, l'une des premières démonstrations que les cellules peuvent exercer des forces sur elles-mêmes à travers les jonctions adhérentes a été mise en évidence lors de l'observation de billes fonctionnalisées avec des N-cadhérines mimant un contact cellule-cellule, qui pouvaient se déplacer à la surface des cellules musculaires C2 (Lambert et al., 2002). En utilisant des micropipettes doubles, il a été montré que la force nécessaire pour décrocher deux cellules augmente en fonction du temps que les cellules passent à adhérer ensemble, et se stabilise autour de 200 nN pour les cellules S180. Ce phénomène de renforcement et de maturation des contacts dépend du cytosquelette d'actine, Rac et Cdc42 (Chu et al., 2004). Plus tard, il a été montré avec le même système expérimental, que ce renforcement de l'adhésion entre deux cellules n'est possible que si l'intégrité de l' α -caténine et de la vinculine sont conservées (Thomas et al 2013). De plus, l'extension uniaxiale de doublets de cellules orthogonalement au contact cellule-cellule, conduit à un recrutement au contact de la vinculine et de la forme ouverte de l' α -caténine (Thomas et al 2013).

D'autres expériences ont également mis en lumière le rôle des forces mécaniques dans les jonctions adhérentes. Il a été montré que les cellules pouvaient transmettent des forces par leurs N-cadhérines en mesurant les forces de traction exercées sur des surfaces fonctionnalisées avec des N-cadhérines (Ganz et al., 2006), et que ces forces pouvaient s'adapter à la rigidité du substrat (Ladoux et al., 2010). Les tensions exercées sont de l'ordre de 4 à 5 nN/ μ m², similaires à celles qui ont pu être mesurées à travers les intégrines (5.5 nN/ μ m²(Balaban et al., 2001)) et augmentent en fonction de l'augmentation de la rigidité du substrat. Cela été ensuite vérifié pour les E-cadhérines (Barry et al., 2014; Tabdili et al., 2012b).

La première expérience d'ablation laser des contacts cellule-cellule, réalisée sur des embryons de *Drosophille*, a mis en évidence un phénomène de relaxation du contact dès les premières secondes, et a mise en évidence que les contacts supportent une tension (Cavey et al., 2008). Ce phénomène a été mis en évidence depuis dans de nombreux articles pour des cellules en culture, et le rôle du cytosquelette d'actomyosine, de la myosine II, de la tropomyosine, de la coronine 1B, de la formine mDia1, de la kinase Src ont été évalués dans la relaxation du contact (Acharya et al., 2017; Bertocchi et al., 2016; Caldwell et al., 2014; Huveneers et al., 2012; Michael et al., 2016; Priya et al., 2015; Ratheesh et al., 2012; Wu et al., 2014).

L'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées avec des domaines extracellulaires de E-cadhérine, a permis de montrer que la rigidité des E-cadhérines augmente linéairement avec l'augmentation de force, et dépend

du cytosquelette d'actomyosine (Le Duc et al., 2010), de la présence d' α -caténine et du renforcement par le recrutement de la vinculine (Barry et al., 2014; Muhamed et al., 2016). Mais, il a fallu attendre 2012 pour que soit mis en évidence directement par l'utilisation de senseurs de force moléculaires, que les E-cadhérines pouvaient être effectivement sous une tension constitutive de quelques pN par cadhérine grâce au recrutement du cytosquelette d'actomyosine (Borghi et al., 2012).

Néanmoins, les mécanismes en cellule vivante permettant aux jonctions adhérentes de s'adapter aux forces mécaniques ne sont pas encore totalement compris en raison de la complexité du nombre de protéines impliquées et des voies de signalisation. Mais en revanche, in vitro certaines découvertes ont permis de faire une percée majeure dans la compréhension de la réponse des complexes des jonctions adhérentes aux contraintes mécaniques grâce à l'utilisation de protéines purifiées et de techniques de spectroscopie en molécule unique. L'existence de plusieurs protéines mécanonsensibles au niveau des jonctions a été révélé avec le dépliement de l' α -caténine pour des forces autour de 5 pN (Yao et al., 2014), le renforcement du temps de vie d'interaction avec la force tel un catch bond du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine pour des forces autour de 7 pN (Buckley et al., 2014) et du dimère X des E-cadhérines extracellulaire pour des forces autour de 28 pN (Rakshit et al., 2012). Dans les cellules, le dépliement de l'a-caténine a également été démontré grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique (a18) ou d'un senseur FRET de conformation (Kim et al., 2015; Yonemura et al., 2010). Et récemment, un senseur de force moléculaire a été introduit dans l' α caténine (Acharya et al., 2017) et a permis de mettre en évidence que l' α -caténine est effectivement sous tension. Cette tension (qui n'a pas été mesurée en terme de pN car aucune calibration n'a été faite) est corrélée avec l'ouverture de la structure de l' α -caténine mise en évidence par l'anticorps spécifique de la conformation ouverte de l' α -caténine. De plus, la mesure de la tension moléculaire dans l' α -caténine est également corrélée avec la mesure de la vitesse de rétractation des contacts après ablation. Cette tension est dépendante bien évidemment de la contractilité du cytosquelette, mais également de la présence de la formine mDia1.

Dans la cellule, un des mécanismes envisagé pour expliquer les propriétés mécanosensibles des jonctions adhérentes est la capacité de recrutement de protéines partenaires du cytosquelette d'actine de manière force dépendante. C'est notamment le cas de la vinculine dont le recrutement est myosine II dépendant (Le Duc et al., 2010; Yonemura et al., 2010). Bien qu'un article ait montré que la vinculine puisse se lier la β -caténine directement (Peng et al., 2010), le mécanisme supporté par différentes équipes est que la vinculine se lie à l'acaténine lorsque celle-ci est en conformation ouverte. La vinculine est recrutée aux contacts des cellules soumises à un étirement par le substrat (Thomas et al., 2013) ou par aspiration en suspension (Barry et al., 2014). En plus de la vinculine, l' α -caténine peut recruter d'autres partenaires tels l' α -actinine (Knudsen et al., 1995), ou l'afadine (Pokutta et al., 2002) grâce à ses domaines centraux, ou l'EPLIN (Abe and Takeichi, 2008) dans sa partie C-terminale. Il serait donc intéressant de caractériser dans les cellules, en fonction de la force appliquée à l'échelle cellulaire et potentiellement mesurée également à l'échelle moléculaire avec les senseurs de force dans la E-cadhérine ou l' α -caténine, quelles sont les protéines interagissant avec le cytosquelette d'actine recrutées. De plus, la vision de l' α -caténine qui adopte une conformation ouverte lorsque le complexe est sous tension est peut-être plus compliquée. En effet, en utilisant des membranes synthétiques permettant de créer des rassemblements nanométriques de E-cadhérines, il a été montré que l'a-caténine ouverte marquée avec l'anticorps spécifique a18, pouvait se retrouver au centre de la cellule où il n'y a pas de recrutement de vinculine, ou de phospho-myosine et de contraction du cytosquelette d'actomyosine (Biswas et al., 2016). L'ouverture de l'α-caténine dans ce contexte nécessite un rassemblement en agrégats des Ecadhérines, mais ensuite aucune force mécanique n'est nécessaire pour maintenir son état ouvert. Ainsi bien que les découvertes de ces dernières années aient permis de mieux comprendre l'organisation des jonctions adhérentes, la combinaison de nouvelles techniques de mesure de force dans les cellules, à la caractérisation dynamique et en super résolution des protéines du complexe permettra sûrement d'approfondir nos connaissances.

1.4.3 Similarités entre Jonctions Adhérentes et Adhésions Focales

Les structures des jonctions adhérentes et des adhésions focales présentent des similitudes autant dans leur organisation que dans le recrutement des protéines partenaires du cytosquelette d'actine (Figure 25.a) (Han and de Rooij, 2016). Ces deux structures d'adhésions possèdent des récepteurs transmembranaires –intégrines ou cadhérines– qui transmettent des forces, et dont l'interaction est renforcée sous l'application d'une force – de 30 pN pour les intégrines et de 5 pN pour les cadhérines– (Buckley et al., 2014; Kong et al., 2009).



Figure 25 – a) Structure et organisation des complexes d'adhésion, à gauche : via les intégrines pour les adhésions focales, à droite : par les E-cadhérines pour les jonctions adhérentes. Leurs structures présentent une analogie d'organisation au niveau moléculaire et on peut diviser cette organisation avec 4 niveaux différents : les protéines transmembranaires, un niveau qui comprend les protéines pour la signalisation et l'établissement des complexes, un qui est composé des protéines permettant la transmission des forces et dont le comportement est force-dépendant, et le niveau recrutant toutes les protéines de la machinerie du cytosquelette d'actine. b) Ensemble des protéines communes aux deux complexes d'adhésion : jonctions adhérentes, et adhésions focales au niveau des kinases, des protéines adaptatrices, et des protéines qui interagissent avec le cytosquelette d'actine (adapté de Han and de Rooij 2016).

De plus, elles ont en commun les mêmes protéines régulatrices de l'actine (Figure 25.b). Par exemple, la vinculine est partagée entre les adhésions focales et les contacts cellule-cellule. La vinculine ne présente pas forcément la même conformation dans les deux complexes. En effet, lors de l'application d'une force directement sur les E-cadhérines avec des billes, la vinculine recrutée au contact cellule-cellule est phosphorylée en Y822 mais pas celle présente au niveau des adhésions focales (Bays et al., 2014). Cette forme de la vinculine semble avoir un rôle privilégié au niveau des contacts cellule-cellule.

Les jonctions adhérentes et les adhésions focales ont, également, en commun certaines kinases comme Src qui a pour cibles directes différents composants de chacun des deux complexes tels que la β -caténine, la Ecadhérine, ou p120, mais aussi la paxilline, p130cas Le rôle de la kinase FAK dans les jonctions adhérentes est plus controversé (revue (Quadri, 2012)). En effet, son rôle peut être moins direct, par exemple, dans les cellules cancéreuses, il a été mis en évidence que la phosphorylation de FAK par Src est requise pour déréguler les E-cadhérine à la membrane (Avizienyte et al., 2002). Dans les cellules endothéliales, la kinase FAK peut directement phosphoryler la β -caténine en Y142 des jonctions cellule-cellule pour conduire à leur déstabilisation à la suite de l'activation par VEGF (Chen et al., 2012). Ainsi, la connexion entre jonctions adhérentes et adhésions focales peut être plus ou moins directe avec (1) le partage de protéines communes comme la vinculine, ou Src ; mais également (2) via le réarrangement global du cytosquelette par des protéines régulatrices communes aux deux complexes, comme les Rho-GTPases ; ou encore par (3) un mécanisme à plus longue portée, comme avec FAK, où l'activation d'une protéine dans un complexe peut finalement modifier l'organisation du second en activant différents intermédiaires (pour FAK p130cas, puis Rac...). Les partenaires communs aux adhésions focales et jonctions adhérentes sont discutés dans différentes revues en fonction de leur rôle général dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Rho-GTPases...), dans le recrutement de protéines communes adaptatrices du lien avec le cytosquelette comme la vinculine ou des kinases partagées entre les deux systèmes d'adhésion comme Src ou FAK (Han and de Rooij, 2016; Mui et al., 2016).

Une communication entre les sites des jonctions adhérentes et adhésions focales est requise lorsque les cellules épithéliales migrent collectivement et créent à la fois de nouveaux sites d'ancrage au substrat tout en conservant leur adhérence entre cellules, il existe donc une connexion fonctionnelle entre ces deux sites d'adhésion (revues (Demali et al., 2014; Weber et al., 2011)). De même, cet équilibre entre les adhésions cellule-cellule et les adhésions cellule-substrat est critique pour un bon développement par exemple des muscles cardiaques (McCain et al., 2012) ou lors des mouvements de converge-extension pendant la gastrulation dans la morphogénèse du *Xenope* (Marsden and DeSimone, 2003).

D'autre part, il a été montré que le lien qui se crée entre la matrice extracellulaire à la surface de billes et les intégrines de cellules en suspension, permet de renforcer l'adhésion cellule-cellule médiée par les E-cadhérines, mesurée en termes de force de séparation dans un système de doubles pipettes (Martinez-Rico et al., 2010). De même, élever les forces de traction via les intégrines sur le substrat en modifiant la rigidité du substrat ou sa composition, augmente également la force de traction intracellulaire aux contacts de manière myosine II dépendante (Maruthamuthu et al., 2011). L'établissement de contacts via les E-cadhérines entre deux cellules S180 leurs permet un meilleur étalement sur les gels de PA avec fibronectine, et les cellules exercent une plus grande force sur les piliers de fibronectine que des cellules sans jonctions cellulaires et isolées (Jasaitis et al., 2012). Au contraire, pour des cellules S180 qui adhérent sur des substrats de taille contrôlée via leurs intégrines, et dont un contact cellule-cellule est mimé par l'application d'une bille fonctionnalisée avec des E-cadhérines, il a été montré que la rigidité et le temps de formation du contact médié par les cadhérines diminue en fonction de l'aire d'étalement des cellules sur le substrat de fibronectine (Al-Kilani et al., 2011).

Inversement, les cadhérines peuvent également moduler les intégrines. En particulier, pour une cellule cultivée individuellement sur des surfaces fonctionnalisées simultanément avec des bandes de collagène et de E-cadhérines où l'adhésion se fait respectivement avec ses intégrines ou ses E-cadhérines à la surface, leur migration et leur activité lamellipodiale sur la surface de collagène sont biaisées par les E-cadhérines (Borghi et al., 2010). Pour les cellules endothéliales, augmenter la nombre de contacts entre cellules conduit à diminuer le nombre d'adhésions focales et l'étalement des cellules (Nelson et al., 2004). De la même façon, pour des kératinocytes, les cultiver dans un milieu faible en calcium leur permet d'avoir des mouvements moins coordonnés, d'exercer des forces de traction plus fortes, distribuées sur toute la colonie de cellules ; à l'inverse des kératinocytes cultivés dans un milieu normal présentent alors des jonctions cellule-cellule plus marquées et des forces de traction sur le substrat plus faibles au total et localisées sur les bords de l'ilot (Mertz et al., 2013). Un scénario un peu similaire est observé sur des colonies de cellules souches pluripotentes hESC cultivées sur des substrats de différentes géométries et fonctionnalisées avec soit des E-cadhérines soit du Matrigel pour moduler leur adhésion (Toh et al., 2015). Une compétition s'installe pour la distribution de pMLC, et les zones enrichies en pMLC au niveau des intégrines corrèlent avec une différenciation des cellules souches.
De plus, l'application de force à travers la liaison entre E-cadhérines et des billes magnétiques sur les cellules MCF7, conduit à une augmentation des forces de traction sur le substrat, une augmentation de l'aire des adhésions focales, qui dépendent de l'activité constitutive de Src, et de l'activation de PI3K (Muhamed et al., 2016).

Ainsi, avec ces différents exemples, on se rend compte assez vite qu'un modèle considérant uniquement un report des contraintes d'un des deux complexes sur l'autre lorsqu'un complexe est désassemblé, en raison d'un équilibre global des forces dans la cellule sans dissipation, n'est pas toujours valable. La connexion fonctionnelle entre les adhésions entre cellules ou au substrat n'est pas nécessairement antagoniste, mais peut être aussi dans certaines situations coopérative, ou indépendante.

En conclusion, ces plateformes sont constituées des complexes protéiques faisant le lien entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule ou entre les cellules voisines et l'intérieur de la cellule. Par leurs positions spécifiques à l'interface, ces complexes sont à l'origine des évènements de mécanosensation, et possèdent des protéines mécanosensibles, et des protéines clés dans le déclenchement de voies de signalisation. Les deux plateformes possèdent des protéines adaptatrices communes comme la vinculine, des régulateurs communs avec certaines kinases, et des protéines modifiant l'organisation leur ancrage au cytosquelette. Elles peuvent également être connectées mécaniquement grâce notamment au fait que leur structure et leur comportement dépendent de leur connexion au cytosquelette d'actine.

1.5 Principes Généraux de la Mécanotransduction

Les cellules peuvent sentir différentes perturbations biochimiques, électriques mais aussi mécaniques de leur environnement et répondre à ces sollicitations en modifiant leur comportement et leur devenir. Nous avons vu jusqu'à présent différents exemples de contraintes mécaniques pouvant s'appliquer aux cellules, différentes voies de signalisation mécanosensibles, et présenté deux plateformes de mécanotransduction qui sont à l'interface entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule.

Dans ce dernier paragraphe, nous allons voir comment les réarrangements moléculaires des protéines permettent de transformer les contraintes mécaniques en signaux biochimiques, et comment s'intègre ces différentes preuves dans un modèle plus général de la mécanotransduction qui permet aux cellules de réagir aux sollicitions mécaniques.

1.5.1 Influence des forces mécaniques sur les protéines et exemples de mécanotransducteurs moléculaires

Dans les voies de signalisation impliquant des protéines navettes mécanoactivables caractérisées dans le paragraphe 1.3, beaucoup des mécanismes moléculaires à l'origine de la mécanosensation sont encore aujourd'hui incompris. Nous allons dans ce paragraphe, tout d'abord décrire comment les forces mécaniques peuvent modifier la fonctionnalité d'une protéine, et donc comment une protéine peut être un mécanotransducteur. Nous donnerons plusieurs exemples de protéines dont les propriétés de mécanotransduction ont été démontrées *in vitro*.

Appliquer quelques principes physiques simples est suffisant pour expliquer comment les forces mécaniques peuvent modifier la structure d'une protéine, et ainsi potentiellement déclencher la modification de voies de

signalisation dans les cellules (Pruitt et al., 2014). Les forces mécaniques peuvent modifier plusieurs paramètres, et (1) avoir un impact sur la stabilité des interactions entre deux protéines par exemple en modifiant la durée de vie d'un complexe protéique, (2) révéler un nouveau site peptidique permettant par exemple une interaction avec un partenaire ou une phosphorylation, (3) modifier les propriétés catalytiques et l'activité de la protéine, (4) réguler l'ouverture de canaux ioniques, ou encore (5) modifier le recrutement de protéines à la membrane. Nous allons revenir sur chacun de ces mécanismes ci-dessous.

 Une protéine possède un équilibre conformationnel dans lequel différents états de conformation existent, et sont peuplés en fonction de leurs énergies. Une force mécanique peut déplacer la proportion de protéines dans un état conformationnel plutôt qu'un autre en abaissant l'énergie de ce premier (Figure 26).



Figure 26 – Effet d'une force mécanique sur l'équilibre conformationnel d'une protéine. Une protéine peut avoir différentes configurations, et elle se trouve en majorité sous sa forme conformationnelle la plus stable qui correspond à une énergie minimale. Ici la protéine en conformation fermée en bleue est plus stable que sa conformation rouge et est donc majoritaire. L'application d'une force mécanique déplace les équilibres en stabilisant la conformation rouge dépliée. (Issu de Pruitt et al. 2014)

Dans la plupart des cas, une interaction entre protéines n'est pas idéale, sa durée de vie n'est pas la même quel que soit la force appliquée sur le complexe. Toutes les interactions non covalentes entre protéines ont une durée de vie d'interaction limitée. Même pour une affinité d'interaction considérée comme « forte » entre la biotine et la streptavidine, leur temps de vie d'interaction est de un jour, mais il diminue et passe de 1 minute à 0.001 seconde sous l'application d'une force statique de 5 pN ou 170 pN (Merkel et al., 1999). En général, l'application d'une force mécanique sur un complexe de deux protéines qui interagissent, accélère leur dissociation. C'est ce qu'on appelle des « slip bonds » (Figure 27). Mais, il existe aussi des complexes protéiques qui se comportent comme des « catch bond », c'est-à-dire que l'application d'une force que sans (Figure 27). Ce concept de catch bond est notamment décrit en détail dans cette revue (Thomas et al., 2008).



Figure 27 – Exemple du comportement qu'adoptent les liaisons entre deux protéines lorsqu'on les soumet à une force. On représente ici le temps de vie de la liaison en fonction de la force pour a) une liaison idéale : insensible à la force ; b) une liaison glissante « slip bond » dont l'application d'une force diminue le temps de vie de la liaison ; c) une liaison type « catch bond » dont l'application d'une force permet de stabiliser le temps de vie d'interaction entre les deux protéines.

Grâce au développement des techniques de spectroscopie de force sur molécules uniques, ce phénomène de catch bond a été mis en évidence sur différents types de molécules.

- Historiquement, avant même l'utilisation de techniques de spectroscopie, l'utilisation d'un flux sur une protéine d'intérêt ancrée à la surface d'un support de polystyrène, a permis de mettre en évidence une première protéine présentant ce comportement : la protéine FimH (Figure 28.a). Cette protéine se trouve à la pointe du pili des bactéries gram négatives, facilite leur adhésion et reconnait les sucres (Thomas et al., 2002). Plus tard, il a été montré que deux de ses domaines sous l'application d'une force peuvent s'ouvrir et ainsi augmenter son affinité avec ses ligands en stabilisant son domaine d'interaction avec le ligand (Sauer et al., 2016).
- Puis, en 2003, un AFM a été utilisé pour étirer la protéine d'adhésion des leukocytes, la P-selectine et son ligand PSGL-1 (Marshall et al., 2003). Cette liaison se comporte au début comme un catch bond, puis ensuite un slip bond en appliquant une force croissante (Figure 28.b)
- Par la suite, l'interaction entre les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et la fibronectine a également révélé ce comportement de catch bond et de renforcement de l'interaction sous tension (Kong et al., 2009). Cette interaction se renforce et passe d'une liaison faible à une liaison forte sous l'application de tension de manière cyclique (Kong et al., 2013). La durée de vie de la liaison entre les deux est augmentée de deux ordres de grandeur quand la liaison est sous une tension de 30 pN, lorsque l'on relaxe la tension, le temps de vie est diminué, le phénomène est donc réversible. De plus, ce temps de vie augmente progressivement tel un renforcement de la liaison au fur et à mesure du nombre de cycles appliqués, et puis sature au bout de quelques cycles. Là encore, un changement conformationnel, nommé « headpiece opening » a été mis en évidence dans le domaine de la chaine β de l'intégrine qui comprend une structure en deux domaines repliés qui peut s'ouvrir (Figure 28.c). Ce changement correspond à un changement de seulement 75 angströms du domaine de la chaine β , plus rigide, qui se redresse alors parallèle à la surface de la cellule, et peut ainsi créer une séparation plus large avec le domaine α (Springer and Dustin, 2012).
- Un dernier exemple est celui des E-cadhérines. Le renforcement des interactions entre les cadhérines lorsqu'on applique une force jusqu'à 30 pN, a d'abord été mis en évidence entre les cadhérines entre elles formant un dimère X par leurs ectodomaines (Rakshit et al., 2012) (Figure 28.d). Et plus récemment, l'utilisation de doubles pinces optiques a permis de déterminer que le complexe formé de la queue de la E-cadhérine, de la β-caténine, de l'α-caténine et de l'actine présente aussi les caractéristiques d'un catch bond, supposément entre l'actine et l'α-caténine (Buckley et al., 2014). Cette découverte explique l'une des grandes difficultés qu'ont eue les biochimistes en voulant purifier le complexe en entier. En effet, pour que le temps de vie du complexe soit le plus grand possible il faut que le complexe soit sous tension autour de 7 pN. Les auteurs ont proposé un modèle de catch bond à deux états, où le complexe se forme d'abord avec une faible affinité à faible force, ensuite sans force il se dissocie, mais s'il est mis sous tension la probabilité de transition vers un état du complexe plus stable est augmentée. Une fois sous tension, le complexe est comme verrouillé, plus stable et donc se dissocie moins. Par contre l'application d'une force plus forte que 10 pN réaugmente la probabilité de repasser à un complexe dans un état faible stable (Figure 28.d).



Figure 28 – Exemples de protéines présentant un comportement de catch bond suite à l'application d'une force. Pour chaque complexe protéique : en haut : schéma de la protéine et de son ligand, milieu : système d'étude expérimental : flux, AFM, pinces optiques, bas : temps de vie d'interaction du complexe en fonction de la force. a) FimH : la protéine FimH soumise à des forces suite à l'application d'un flux présente une plus grande affinité pour son ligand le mannose (Issu de W. E. Thomas et al. 2002). b) Sélectine : la protéine d'adhésion P-sélectine présente une plus grande affinité pour son ligand PSGL-1 lorsque sa conformation est ouverte à la suite de l'application d'une force autour de 10pN (Issu de Marshall et al. 2003). c) Intégrines : les intégrines $\alpha_5\beta_1$, une fois liée à son ligand la fibronectine peut se déplier sous l'application d'une force (Issu de Kong et al. 2009). c) E-cadhérines : à gauche : la liaison du dimère X dimère des parties extracellulaires de la E-cadhérine se comporte comme un catch bond autour de 30pN (issu de Rakshit et al. 2012) ; à droite : le complexe E-cadhérine/ α -caténine/F-actine est mis sous tension en appliquant une tension à l'actine par des pinces optiques et se révèle avoir une plus grande stabilité sous une force de 7pN (Issu de Buckley et al. 2016).

- (2) De plus, l'application d'une force peut permettre d'ouvrir et de révéler de nouveaux sites de liaison à des protéines partenaires. C'est le cas notamment des protéines p130cas, taline, vinculine, ou α-caténine.
 - L'une des premières démonstrations a été publiée en 2006 sur la protéine p130cas (Sawada et al., 2006). p130Cas appartient à la famille des substrats de la kinase Src et est localisée dans les cellules au niveau des complexes d'adhésion focale. Dans cet article, p130Cas est phosphorylée par la kinase Src en réponse à l'extension mécanique appliquée aux cellules. Afin de déterminer si les phosphorylations de p130cas pouvaient être dues à un changement de conformation de p130cas sous l'application d'une force, les auteurs ont attaché *in vitro* la partie substrat (CasSD) de p130Cas à des membranes déformables en latex. Ils ont pu mettre en évidence que le niveau de phosphorylation du domaine substrat CasSD était corrélé au niveau d'extension de la molécule (Figure 29.a).
 - La taline est une protéine des adhésions focales également, dont le domaine N-terminal FERM se lie à la queue cytoplasmique de l'unité β des intégrines, et donc le domaine C-terminal se lie à l'actine. Ces domaines sont connectés par un large domaine comprenant plusieurs séries d'hélices, qui en l'absence de force est relativement compact mais flexible. Lorsqu'une force est appliquée *in vitro*

avec des pinces magnétiques directement sur la taline accrochée entre une bille et une surface, les hélices entremêlés de la partie du milieu se déplient, et des sites de liaison à la vinculine sont alors accessibles (Perez-jimenez et al., 2016; Yao et al., 2015; Yao et al., 2016) (Figure 29.b). Une fois liée, la vinculine stabilise cette nouvelle conformation de la taline.

- L'α-caténine peut se lier à la vinculine, mais des études cristallographiques ont démontré que le site de liaison avec la vinculine pouvait être masqué par une conformation fermée de l'α-caténine. En utilisant des pinces magnétiques, il a été montré que sous l'application d'une force de 5 à 15 pN, l'αcaténine peut se déplier et dévoiler son site d'interaction avec la vinculine (Yao et al., 2014) (Figure 29.c).
- La protéine des jonctions serrées, Zonula occludens (ZO-1) peut changer de conformation sous l'application d'une tension (Figure 29.d). L'utilisation de pinces magnétiques *in vitro* a permis de mettre en évidence qu'une tension de 2 à 4 pN permet de maintenir ouverte sa conformation, tout en conservant ces domaines structurés intacts pour des forces inférieures à 5pN (Spadaro et al., 2017). Cette ouverture dépendante du cytosquelette d'actomyosine a été confirmée dans les cellules grâce à des techniques d'imagerie de super résolution, et est corrélée avec le recrutement du facteur de transcription DbpA.



Figure 29 – Exemples de protéines dont l'application d'une force peut permettre de révéler de nouveaux sites de liaison à des protéines partenaires. Pour chaque complexe protéique : en haut : schéma de la structure de la protéine avec ou sans force (F) ; en bas : schéma du système d'étude expérimental. a) p130Cas : dépliement de la partie non structurée de p130Cas permettant de révéler 4 tyrosines pouvant être alors phosphorylées par la kinase Src (Issu de Sawada et al. 2006). b) Taline : l'application d'une force par l'utilisation de pinces magnétiques permet d'ouvrir les domaines R1-R2-R3-R4 de la taline et l'accrochage de la vinculine sur le domaine R3 (Issu de Yao et al. 2015). c) A-caténine : de même l'application d'une force par des pinces magnétiques permet de changer la configuration de la protéine et lui permet de se lier à la vinculine par son domaine M1 dès lors révélé (Issu de Yao et al. 2014). d) ZO-1 : l'application d'une force avec une pince magnétique permet d'ouvrir la partie C-terminale de ZO-1 grâce à ses domaines non structures. (Issu de Spadaro et al. 2017).

- (3) De même, l'application d'une force peut permettre de modifier les propriétés catalytiques d'une enzyme. Beaucoup d'enzymes doivent effectuer des changements conformationnels pour modifier leur activité, mais le rôle des forces dans ces changements conformationnels n'a pas encore été beaucoup étudié à l'exception des quelques exemples ci-dessous.
 - Les simulations en dynamique moléculaire de la structure de la tyrosine kinase FAK, enzyme présente au niveau des adhésions focales, ont montré que FAK pouvait avoir un rôle de mécanotransducteur (Figure 30.a). En effet, FAK est constitué de trois domaines : un domaine FERM, un domaine kinase,

et un domaine FAT de liaison aux adhésions focales. Le domaine FERM de FAK doit être étiré pour permettre de libérer le domaine kinase, permettre son autophosphorylation en Y397 et activer l'activité kinase de FAK (Zhou et al., 2015). Son activation mécanique au niveau moléculaire reste néanmoins à démontrer *in vitro* et dans les cellules.

- De même, la titine, protéine présente dans les muscles, possède plus de 100 domaines distincts qui peuvent se déplier sous l'application d'une force, et l'un d'eux possède une activité kinase (Figure 30.b). Les études spectroscopiques en molécules uniques ont montré que le dépliement par étapes de la titine conduit à l'activation du domaine kinase en C-terminal en libérant le domaine de liaison à l'ATP (Puchner et al., 2008).
- Par exemple, certains moteurs vont diminuer leur temps d'interaction avec les filaments lorsqu'ils sont sous tension (Figure 30.c). C'est le cas de certains moteurs de myosines qui présentent une plus grande affinité avec l'ADP sous tension. Cela leur permet d'augmenter la fraction de cycles catalytiques où ils sont liés à l'actine, et ainsi passer de transporteurs de cargo à des protéines ancrées à l'actine (Chuan et al., 2011; Greenberg et al., 2012; Purcell et al., 2005).
- Moins directement, il a été montré que la formine mDia possède une vitesse d'élongation des filaments d'actine deux fois plus importante lorsque les filaments polymérisent sous l'application d'une force (Jégou et al., 2013)(Figure 30.c). Les détails moléculaires de l'activation de la formine ne sont pas encore connus.



Figure 30 – Exemples de protéines dont l'application d'une force peut permettre de modifier les propriétés catalytiques d'une enzyme. Pour chaque protéine : en haut : schéma de la structure de la protéine avec ou sans force (F) ; en bas : schéma du système d'étude théorique ou expérimental. a) FAK : d'après des simulations théoriques FAK peut s'ouvrir et donc s'autophosphoryler et s'activer sous l'application d'une force lorsque ses domaines FERM et FAT sont liés respectivement à la membrane et aux intégrines (Issu de Jing Zhou et al. 2015). b) Titine : l'application d'une force peut déplier la protéine et révéler dans son domaine kinase inhibé (Issu de Puchner et al. 2008). c) Myosin : l'application d'une force sur le moteur de myosin IC change son temps d'attachement moyen au filament d'actine et le rend plus immobile (Issu de Greenberg et al. 2012). d) Formine : l'application d'une force par l'application d'un flux permet de modifier la processivité de la formine mDia1 et son taux d'élongation d'actine qui augmente avec la force (Issu de Jegou et al. 2013).

(4) Un autre exemple de l'effet de l'application d'une force sur un complexe protéine est celui, mis en évidence il y a déjà plus de 35 ans, l'ouverture de certains canaux ioniques (Guharay and Sachs, 1984; Gustin et al., 1988). En effet, historiquement, la définition de « protéines mécanosensibles » a été donnée à ces canaux ioniques capables de s'ouvrir suite à la déformation de la membrane plasmique. Désormais, la structure et les mécanismes de ces canaux ioniques mécanosensibles sont connus à l'échelle moléculaire. Certains sont ainsi capables de s'ouvrir à la suite d'une tension appliquée sur les lipides de la

bicouche lipidique, d'autres nécessitent que les protéines soient reliées au cytosquelette pour que les forces soient transmises. Ces différents mécanismes sont décrits dans plusieurs revues (Christensen and Corey, 2007; Hamill and Martinac, 2001).



Figure 31 – Exemple de l'ouverture de canaux ioniques a) par la déformation de la membrane directement après application d'une tension mécanique ; b) à la suite de l'application d'une force par le cytosquelette par exemple ; c) à la suite d'une force appliqué sur le canal à la fois par des protéines intermédiaires intra et extracellulaires ; d) à la suite de l'activation d'une protéine secondaire qui va jouer d'intermédiaire pour activer l'ouverture du canal. (Issu de Christensen and Corey 2007).

(5) Mécanisme d'assemblage : « clustering » et regroupement de protéines

L'application d'une force mécanique à la surface de la membrane des cellules peut permettre de modifier la composition de la membrane et ainsi favoriser l'assemblage et l'agrégation de différentes protéines. Par exemple, chez la levure, la protéine d'adhésion de la paroi cellulaire Als5p forme des nanodomaines sous l'effet de l'application d'une force (Alsteens et al., 2010). Dans les cellules mammifères, ce mécanisme d'oligomérisation en fonction de la force appliquée reste à être démontrer. Mais l'assemblage des intégrines, protéines des adhésions focales, ou des cadhérines, protéines des jonctions adhérentes a été mis en évidence et quantifié à plusieurs reprises (Delanoe-Ayari et al., 2004; Roca-Cusachs et al., 2009; Strale et al., 2015; Wu et al., 2015). Finalement, sous l'application d'une force, beaucoup de complexes protéiques voient leur temps de vie diminuer, et même pour des complexes ayant un comportement de catch bond pour des forces très élevées, leur temps de vie d'interaction diminue. Alors, comment expliquer que les cellules puissent maintenir leur adhésion au substrat ou entre elles, par exemple, lorsqu'elles sont soumises à des forces ? En fait, la force n'est pas transmise à la membrane à travers une seule intégrine ou une seule cadhérine, mais par un ensemble de protéines qui peuvent s'assembler et s'organiser de manière parallèle (Figure 32). La taille de ces regroupement de protéines peut augmenter de manière force dépendante. Le temps de vie d'une liaison dans ce type d'assemblage est bien plus long que la somme des temps de vie des liaisons individuelles, car le regroupement peut être maintenu malgré les différents cycles de dissociation de liaison individuelle tant que le nombre de liaisons restent au-dessus d'un seuil critique.



Figure 32 – Exemple de liaison non covalente sous l'application d'une force. a) pour des liaisons indépendantes b) pour un assemblage parallèle de liaisons dans un agrégat, qui sont liées entre elles.

Néanmoins, des questions restent en suspens concernant la formation de ces structures en agrégats organisés : est ce que les contraintes mécaniques conditionnent leur formation ? leur assemblage dépend-il directement de la composition de la membrane plasmique ? ou est-ce seulement la conséquence d'autre mécanisme de mécanotransduction qui favorise le recrutement des protéines à

postériori de l'application de la force ? Est-ce regroupement et l'organisation spécifique en « cluster » est nécessaire à l'activation de voies de signalisation ?

Finalement, les forces mécaniques peuvent intervenir de différentes façons sur les protéines :

- o en renforçant l'interaction entre deux protéines à la manière d'un catch bond,
- en influençant l'assemblage, la stabilité ou la dynamique d'un complexe protéique en modifiant les affinités entre chaque partenaire.
- en exposant un nouveau site permettant à un partenaire d'interagir avec la protéine sous tension, et ainsi recruter de nouvelles protéines ou d'ancrer la protéine sur une structure comme une membrane,
- en causant un dépliement local ou débobinage d'une partie de la structure de la protéine et ainsi exposer des sites alors cachés et non accessibles qui peuvent réguler et contrôler une activité catalytique.
- en regroupant des molécules ou des complexes protéiques ensemble, permettant ainsi un assemblage en agrégat, ou une augmentation locale de concentration, et ainsi permettre de réguler l'activité de chaque composant de l'assemblage,
- en modifiant l'organisation ou la tension de la membrane plasmique d'une cellule, permettant ainsi l'ouverture de canaux ioniques.

En définitive, le repliement et la structure tridimensionnelle des protéines favorisent une conformation qui lui permet d'atteindre un état d'énergie minimal. Les forces mécaniques peuvent modifier ce diagramme d'énergie d'états conformationnels. Ainsi, comme la phosphorylation, ou d'autres modifications post-transcriptionnelles peuvent modifier la conformation d'une protéine, les effets des forces mécaniques sur les conformations des protéines représentent un mécanisme plus général par lequel l'activité enzymatique, les interactions avec les partenaires structuraux peuvent être modifiés. L'observation *in vitro* de mécanotransducteurs protéiques était une étape attendue dans le domaine, et prouve aujourd'hui concrètement l'existence de capteurs mécaniques moléculaires, véritables transducteurs de signaux de nature physique en signaux de nature biochimique. Ces capteurs jouent probablement un rôle clé dans la médiation de l'activation de voies de signalisation dans les cellules, mais l'intégration dans les cellules de ces connaissances acquises sur les protéines *in vitro* est maintenant nécessaire pour avoir une meilleure compréhension du phénomène.

1.5.2 Modèle général de la mécanotransduction

Le modèle générique qui émerge de l'ensemble de ces travaux sur la façon dont une cellule intègre le signal mécanique et le transforme en signal biochimique repose sur la notion que les forces mécaniques peuvent influencer les complexes protéiques en modifiant leur structure et en conséquence modifier leur intéractome, ou leur fonction.

Les mécanismes de mécanotransduction à l'échelle de la cellule se déroulent en différentes étapes, représentées sur la Figure 33 :

- Les cellules peuvent être soumises à différentes contraintes mécaniques de l'environnement extérieur
 (1) : tension, compression, cisaillement, rigidité, topologie du substrat (cf paragraphe 1.2) ;
- Certaines molécules sont sensibles aux forces par leur capacité à se déformer sous la contrainte, peuvent sentir les signaux mécaniques extracellulaires et sont les mécanotransduteurs (2). Ils vont subir une déformation suite à la perturbation mécanique. Dans le paragraphe 1.4, nous avons décrit

deux complexes protéiques qui forment ce type de plateforme de mécanotransduction : les adhésions focales et les jonctions adhérentes. Certaines protéines de ces complexes sont sous tension dans les cellules (intégrine, taline, vinculine, E-cadhérine, α -caténine), peuvent modifier leur conformation sous l'application d'une force *in vitro* (taline, p130cas, α -caténine) et augmenter leur affinité sous l'application d'une force à la manière d'un catch bond (intégrines, E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine).

- Ces déformations moléculaires permettent alors l'activation d'activité biochimique (3) spécifique telle que la phosphorylation de la protéine, le changement d'affinité avec un partenaire qui permettra alors de recruter d'autres protéines ou changer sa localisation. Cela va permettre d'activer ou inactiver une voie de signalisation biochimique à l'intérieur de la cellule. Dans le paragraphe 1.3, nous avons vu qu'il existe des voies de signalisation mécanosensibles (3). Nous avons en effet décrit certaines voies comprenant des messagers nucléaires qui peuvent se fixer sur des cofacteurs de transcription dans le noyau pour modifier l'expression génétique de la cellule à la suite d'une sollicitation mécanique, et qui sont donc des protéines navettes dont la fonction peut être multiple et selon leur localisation. Nous avons également vu que certains régulateurs du cytosquelette tels que les Rho-GTPases, et certaines kinases cytoplasmiques sont également activables lors d'une sollicitation mécanique de la cellule.
- Finalement, ces voies de signalisation vont permettre de modifier soit directement le comportement de la cellule, soit son devenir et son expression génétique (4). En retour, la cellule pourra moduler son comportement, et les forces qu'elle exerce sur son environnement.



Figure 33 – La mécanotransduction à l'échelle de la cellule, de la sensation du signal mécanique extra-cellulaire (1) par les complexes protéiques mécanotransduteurs (2) qui vont pouvoir transmettre cette information mécanique en information biochimique, et activer des voies de signalisation biochimiques (3) dans la cellule, qui vont à leur tour pouvoir modifier l'expression génétique de la cellule et donc son comportement et son devenir (4).

Ce modèle comporte encore des inconnues à différents niveaux :

 L'intégration des contraintes mécaniques des différentes échelles du macroscopique au moléculaire reste à éclaircir. Comprendre la nature des perturbations mécaniques, comment les cellules sentent et répondent de manière appropriée à celles-ci, et quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu, reste un problème complexe qui implique différentes échelles de la protéine (Å–nm) à l'organisation de la cellule (nm–µm) et pour plusieurs cellules (µm–mm–cm). Par exemple, il n'est pas vraiment compris comment les forces à l'échelle macroscopique appliquées sur un tissu entier dans le corps, sur certaines cellules de l'embryon lors de la morphogénèse, ou sur des cellules en culture sont transmises à l'échelle moléculaire aux protéines qui les composent. Quelle est la correspondance, par exemple, entre les forces de cisaillement appliquées à la surface d'une cellule, et les protéines de surface de la cellule à l'échelle moléculaire ? De même, existe-t-il -- et si oui sous quelles conditions --, une corrélation entre les forces que la cellule exerce sur son substrat et celles exercées au niveau moléculaire dans les protéines qui composent ses adhésions focales, ses jonctions adhérentes et la tension au niveau de son cytosquelette d'actine.

De même, l'échelle temporelle des mécanismes de mécanotransduction reste en partie incomprise. En principe, pour modifier l'expression génétique, un signal mécanique reçu par la cellule, doit pouvoir être propagé (1) au travers d'une série de réactions biochimiques qui vont permettre l'activation séquentielle de voies de signalisation internes, soit (2) grâce à une propagation mécanique intracellulaire (Figure 34).



Figure 34 – Activation d'une voie de signalisation qui va modifier le comportement de la cellule et pouvoir aller activer certains gènes spécifiques.

Le mécanisme (1) repose sur des réactions biochimiques qui peuvent être activées à l'échelle de la seconde. Par exemple, l'ouverture des canaux ioniques TRCP à la suite de l'étirement de la membrane des cellules conduit à une entrée de cations dans les 2.5 ms suivantes (McBride and Hamill, 1992) et l'expression d'ARNm de MRTF augmente après 15 minutes d'application d'étirement (Hanna et al., 2009). Mais parfois, le changement d'expression génétique s'étale sur plusieurs heures, jours voir mois. Par exemple, à la suite de la compression grâce à des particules magnétiques des cellules du colon de souris, on peut observer une activation rapide (30 min mais durable) de la kinase Ret, de la phosphorylation de la β -caténine mais son accumulation nucléaire n'est visible qu'au bout de 15 jours (Fernández-Sánchez et al., 2015).

Le second (2) mécanisme de propagation des contraintes mécaniques à travers le cytosquelette est en théorie plus rapide, de l'ordre de la milliseconde, et repose sur les propriétés physiques des filaments du cytosquelette. A l'échelle de la cellule, le cytosquelette d'actine peut générer et transmettre des forces, et ces forces peuvent dans certains cas se propager rapidement sur de longues distances (Wang and Suo, 2005). La propagation des contraintes mécaniques transmises par le cytosquelette peut être transmise à différents endroits de la cellule, et ce sans l'intermédiaire de cascades de réactions biochimiques impliquant d'autres protéines. Par exemple, l'activation de Src par des forces appliquées localement avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec de la fibronectine à des distances supérieures à 50 µm des billes en moins de 0.3 secondes ne peut pas être expliquée par des phénomènes de diffusion ou de translocation de protéines (Na et al., 2008). L'existence de propriétés mécanotransductrices du noyau ou des protéines de son enveloppe nucléaire, peut conduire à une modification de l'organisation de la chromatine et de la transcription des gènes. Cette hypothèse a été

proposée dans la régulation mécanique des intégrines en fonction de la rigidité du substrat qui peuvent influencer l'enveloppe nucléaire et les facteurs de transcription dans le noyau directement via le cytosquelette d'actine (Swift et al., 2013). Les nesprines du complexe LINC à l'enveloppe nucléaire (qui fait le lien entre le cytosquelette cytoplasmique et les lamines à l'intérieur du noyau), sont effectivement sous tension (Arsenovic et al., 2016), et il a été montré que les noyaux isolés peuvent moduler leur rigidité en quelques secondes lorsqu'ils sont soumis à une force (Guilluy et al., 2014). Pour démontrer que ce mode de transmission des forces joue un rôle dans la mécanotransduction, il faut maintenant pouvoir montrer que les forces transmises par les jonctions adhérentes ou les adhésions focales au cytosquelette peuvent être transmises au noyau dans les cellules, et conduire à une modification de l'expression génétique sans nécessiter de protéines intermédiaires autres que celles du cytosquelette entre l'extérieur et le noyau.

A l'échelle du tissu, ce type de propagation est aussi envisageable, et permettrait alors la propagation de signaux mécaniques à travers plusieurs cellules. Ce mode de propagation des contraintes mécaniques peut être particulièrement séduisant car il permet de transmettre une information sur de grandes distances plus rapidement qu'une signalisation par gradient de facteurs morphogènes solubles. Peut-être que les mécanismes mis en évidence de la régulation de la voie β -caténine, communs aux embryons de *Drosophile* et de poisson zèbre, sont une preuve que le premier déterminant de la différentiation du mésoderme conservé dans l'évolution n'est pas un signal biochimique mais une force mécanique (Brunet et al., 2013).

Au niveau de l'intégration dans la cellule, il existe un écart entre notre compréhension des molécules individuelles et comment ces protéines fonctionnent collectivement dans une cellule vivante. En effet, il a été démontré que certaines protéines peuvent être sensibles à la force in vitro, mais leur intégration dans un complexe multiprotéique dynamique dans la cellule vivante n'est pas encore systématiquement comprise. Ainsi identifier de nouvelles protéines sous tension ayant un rôle de mécanotransducteur, les protéines partenaires qui peuvent être recrutées en fonction de la sollicitation mécanique, et définir pour celles qui ont été identifiées leur rôle dans la perception mécanique du signal, le déclenchement de la voie et dans la mise en place de la cascade de réactions chimiques, permettra de mieux comprendre le phénomène de mécanotransduction. De plus, on peut noter que bien qu'il existe des voies de signalisation mécanosensibles apparemment bien définies, impliquant différents intermédiaires protéiques spécifiques de chaque voie, il est également possible que les conséquences de différentes perturbations mécaniques soient issues d'une régulation plus générale de la cellule, via son cytosquelette d'actine. Une meilleure compréhension de l'intégration de différents signaux mécaniques dans la régulation du cytosquelette en décrivant les modifications et les recrutements des différentes protéines qui se lient à l'actine, et comprendre comment les changements temporels de la mécanique du cytosquelette s'intègrent dans la modulation de la transduction du signal nous aidera à mieux définir les mécanismes moléculaires de la mécanotransduction. Finalement, le schéma d'une activation linéaire et séquentielle des différents partenaires reste extrêmement simplifié. Le signal mécanique peut avoir différentes cibles protéiques en parallèle, et une boucle de rétroaction entre chaque partenaire peut se mettre en place pour contrôler la réponse de la cellule.

Buts de cette étude Contexte et objectifs

Sommaire

2.1.	LA E-CADHERINE EST CONSTITUTIVEMENT SOUS TENSION	86
2.2.	REGULATION DU COMPLEXE E-CADHERINE/B-CATENINE/A-CATENINE	88
2.	2.1. Association du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine	88
	Association du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine	. 88
	Stabilisation par l'ancrage du cytosquelette d'actine au complexe	88
2.	2.2. Régulation du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine	89
	Modifications transcriptionnelles	. 89
	Modifications du renouvellement membranaire des E-cadhérines	. 89
	$Modifications \ post-traductionnelles \ sur \ le \ complexe \ E-cadhérine/\beta-caténine/\alpha-caténine$. 90
2.3.	SIGNALISATION B-CATENINE	93
2.	3.1. Homéostasie de la 8-caténine	93
2.	3.2. Perturbations et déclencheurs de la voie de signalisation	95
	(1) Modification de la dégradation de la β-caténine conduisant à l'activation de la transcription des gènes dépendant	ts
	de la β-caténine	96
	(2) Modification du niveau global de E-cadhérines conduisant à l'activation de la transcription des gènes dépendants	5
	de la β-caténine	97
	(3) Modifications post-traductionnelles affectant l'affinité du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine qui	
	conduisent à l'activation de la transcription des gènes dépendants de la β-caténine	98
	Exemple de perturbation multifactorielle : le facteur de croissance HGF	99
	Stimulations mécaniques activant la transcription des gènes dépendants de la β-caténine	101
2.4.	Modele de la mecanotransduction des cadherines dans le controle de la signalisation eta -catenine 1	.06
2.5.	QUESTIONS NOS OBJECTIFS ET NOTRE STRATEGIE	.08

2. Buts, contexte et objectifs spécifiques de cette étude

Nous avons vu dans la partie précédente que les forces mécaniques peuvent influencer le devenir et le comportement des cellules. Certains complexes protéiques ont une position et un rôle privilégiés dans l'organisation de la cellule pour détecter l'information mécanique extracellulaire et transformer cette information en signal biochimique capable de déclencher une voie de signalisation.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur un complexe permettant l'adhérence entre cellules épithéliales : les Jonctions Adhérentes. Nous allons examiner le rôle du complexe E-cadhérine/ β -caténine dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. Nous cherchons à identifier les mécanismes moléculaires de la mécanotransduction des E-cadhérines dans la modulation de la signalisation β -caténine lors de la migration des cellules épithéliales. Dans ce chapitre, nous allons développer les différents éléments qui nous ont amené à définir ce travail de thèse, et proposer différentes questions auxquelles nous voulions répondre.

2.1. La E-cadhérine est constitutivement sous tension.

Les E-cadhérines sont un élément central des jonctions adhérentes. Leur structure a été présentée dans le paragraphe précédent 1.4.2. Les domaines extracellulaires de la E-cadhérine permettent de former un lien mécanique entre deux cellules en formant des dimères intercellulaires avec les E-cadhérines des cellules adjacentes (Shapiro et al., 1995), et la partie cytoplasmique de la queue de la E-cadhérine permet un couplage mécanique entre la membrane plasmique et le cytosquelette cortical d'actine (Tabdanov et al., 2009).

L'utilisation du senseur FRET de tension moléculaire inséré dans la partie cytoplasmique de la E-cadhérine a permis de montrer directement que les E-cadhérines sont sous tension mécanique dans les cellules épithéliales MDCK en culture (Borghi et al., 2012). Dans cet article, Borghi et al. décrivent que cette tension est observable sur toute la surface de la cellule, et pas seulement aux contacts intercellulaires où les E-cadhérines sont enrichies. En effet, les mesures de l'index FRET pour la construction EcadTSMod au niveau d'un contact cellule-cellule et de la membrane libre sont plus faibles que celles mesurées pour le module TSMod seul, ou la construction EcadTSMod Δ C qui ne se lit pas au cytosquelette d'actine (Figure 35).



Figure 35 – Index FRET mesuré le senseur TSMod dans le cytoplasme, pour les cellules MDCK EcadTSMod et EcadTSMod ΔC au niveau des contacts cellule-cellule et de la membrane libre. (Adapté de Borghi et al. 2012).

Cette tension requiert le domaine cytoplasmique des E-cadhérines, l'expression de l' α -caténine, l'intégrité du cytosquelette d'actine et l'activité des myosines, comme le montrent des perturbations par expression de mutants, déplétion de protéines et perturbation pharmacologiques (Figure 36.a). De plus, cette tension augmente aux contacts intercellulaires lorsque les cellules épithéliales sont étirées (Figure 36.b).



Figure 36 – a) Index FRET mesuré pour les cellules MDCK EcadTSMod n'exprimant plus de α E-caténine par shRNA, avec ou sans traitement avec un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (10 μ M Cytochalasine B), avec ou sans un inhibiteur de la myosine II (25 μ M ML-7) aux contacts cellule-cellule et au niveau de la membrane libre. b) A Gauche : Images représentatives de cellules sous étirement uniaxial au niveau d'un contact cellule-cellule. A Droite : Index FRET mesuré u niveau du contact et de la membrane libre lors de l'étirement. (Issu de Borghi et al. 2012).

Ces données confirment directement le modèle selon lequel les E-cadhérines sont bien sous-tension générée par le cytosquelette d'actomyosine et transmise par les caténines. De plus, ces résultats révèlent que les E-cadhérines ne sont pas sous-tension qu'aux contacts intercellulaires. Ainsi, les E-cadhérines pourraient avoir une fonction mécanotransductrice dépendante de l'adhésion intercellulaire dans un contexte multicellulaire, mais aussi indépendante de l'adhésion intercellulaire peut-être en réponse à des changements de taille, forme ou activité membranaire de la cellule. Trouver de nouvelles perturbations qui pourraient changer cette tension dans les E-cadhérines est un des enjeux de cette thèse.

Par la suite, l'utilisation du senseur de force FRET dans les E-cadhérines a permis également de mettre en évidence différents rôles de la tension des E-cadhérines dans d'autres systèmes. Notamment, dans l'embryon de *Drosophile*, Cai et al. 2014 ont montré que lors de la migration collective des cellules de bordure dans le germarium, la tension des E-cadhérines est distribuée de manière asymétrique entre l'avant et l'arrière du front de migration du regroupement de cellules. Cette asymétrie de tension dépend de l'activité des récepteurs EGFR et PVR, et de l'activité de Rac, plus importante à l'avant du groupe de cellules. Dans les paires de cellules MDCK, la tension dans les E-cadhérines au niveau des contacts cellule-cellule est néanmoins insensible à la géométrie du substrat qui pourtant affecte l'aire d'étalement des cellules, et le ratio entre les forces de traction exercées sur le substrat et celles exercées entre cellules (Sim et al., 2015). Par exemple, augmenter l'aire du

substrat adhésif carré et par conséquent l'aire d'adhérence des cellules, augmente les forces de traction exercées par un doublet de cellules sur le substrat et également les forces de traction intercellulaires, en revanche les tensions dans les E-cadhérines sont les mêmes quelle que soit l'aire. De même, les forces de traction sur le substrat et intercellulaires sont plus importantes pour des cellules cultivées sur des substrats rectangulaires, que carrés, mais pour autant la tension des E-cadhérines est la même quelle que soit la géométrie. Les auteurs ont par ailleurs observé que la tension des E-cadhérines est la même tout le long du contact du doublet de cellules, même sur les bords distaux, par contre le signal est enrichi dans ces zones distales. D'autre part, il a été montré que la tension des E-cadhérines est constante lors de la division cellulaire dans l'épithélium de *Xenope* (Herbomel et al., 2017).

2.2. Régulation du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine

Le complexe cadhérine/caténine constitue l'élément structural et fonctionnel des jonctions adhérentes des cellules épithéliales. La fonctionnalité de la E-cadhérine est assurée non seulement par la reconnaissance homophilique entre les domaines extracellulaires des molécules de E-cadhérines mais également par l'ancrage du domaine cytoplasmique à l'actine via la β -caténine et l' α -caténine. La structure du complexe est présentée plus en détails dans le paragraphe 1.4.2. Dans cette partie, nous allons nous intéresser particulièrement à la régulation du complexe cadhérine/caténine. Il existe de nombreux moyens de varier l'adhérence entre les cellules, plus ou moins directement en modifiant directement les affinités entre les protéines du complexe des jonctions adhérentes, en modifiant le recyclage des cadhérines, mais aussi en changeant l'organisation du réseau d'actine, la maturation du complexe, la composition de la membrane en PIP2 par exemple ... Nous allons dans le paragraphe ci-dessous présenter les différents éléments modulant l'association du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine.

2.2.1. Association du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine

Association du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine

Tout d'abord, l'adressage et la stabilité à la membrane de la E-cadhérine dépend de sa capacité à recruter ses partenaires, dont notamment la β -caténine. En effet, cette association est essentielle car la β -caténine permet de masquer la séquence PEST (signal peptidique riche en proline, acide glutamique, serine et thréonine) de la E-cadhérine qui conduit à sa dégradation (Huber and Weis, 2001). De même, le recrutement de p120 stabilise la position de la E-cadhérine à la membrane en régulant son recyclage (Xiao et al., 2007). De plus, il a été également montré que le complexe E-cadhérine/ β -caténine est plus stable lorsqu'il est lié à l' α -caténine *in vitro* (Adams and Nelson, 1998; Pokutta et al., 2014a).

Stabilisation par l'ancrage du cytosquelette d'actine au complexe

D'autre part, une fois lié à l' α -caténine, le complexe peut s'ancrer au cytosquelette d'actine. Le couplage du cytosquelette d'actomyosine est essentiel pour stabiliser le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine à la membrane (Adams et al., 1998; Angres et al., 1996; Capaldo and Macara, 2007; Chu et al., 2004; Nagafuchi et al., 1994). Nous avons vu dans la partie 1.4.2 que ce lien entre la E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine et l'actine se comporte comme un catch bond, c'est-à-dire que la durée de vie du complexe est plus importante lorsque celui-ci est sous tension.

La réorganisation du cytosquelette cortical d'actine est contrôlée par la polymérisation de l'actine et de nombreux régulateurs tels que Cdc42, RhoA et ses effecteurs tels que les formines et ROCK, et Rac1 et ses effecteurs Arp2/3, WAVE, WASP... (Baum and Georgiou, 2011; Cavey and Lecuit, 2009). L'impact des Rho-GTPases sur la dynamique et la stabilité des jonctions adhérentes est loin d'être clair (revue (Menke and Giehl, 2012)). En effet, Rac et Cdc42 sont nécessaires au recrutement et à la polymérisation de l'actine pour stabiliser et assembler les E-cadhérines aux nouvelles jonctions, puis RhoA à l'établissement du recrutement de la myosine, nécessaire aussi à la stabilisation des jonctions (Yamada and Nelson, 2007). Mais une suractivation de RhoA ou Rac1 peut aussi conduire à les déstabiliser (Braga et al., 2000; Sahai and Marshall, 2002). L'utilisation de senseur d'activité et de force, et le contrôle par optogénétique de ces protéines permettra sûrement dans les prochaines années de mieux comprendre et décrire le rôle de chacun dans l'organisation du cytosquelette au niveau des jonctions adhérentes.

Un autre élément important dans la stabilité des jonctions, qui dépend du recrutement du cytosquelette d'actine, est l'organisation collective du complexe. En effet, nous avons vu dans la partie 1.4.2 que les Ecadhérines peuvent s'organiser et se rassembler entre elles grâce à leurs interactions extracellulaires mais également grâce à leur partie intracellulaire. Cette organisation des jonctions dépend de leur maturation et de l'organisation du cytosquelette, ainsi que des protéines partenaires recrutées, et permet de diminuer l'endocytose du complexe pour les E-cadhérines formant des agrégats (Strale et al., 2015; Truong Quang et al., 2013; Wu et al., 2015). La compréhension de ces effets collectifs sur la stabilité et la régulation du complexe aux jonctions adhérentes sont encore des effets reste à approfondir.

Ainsi, n'importe quelle perturbation conduisant à une réorganisation du cytosquelette est susceptible de modifier la stabilité du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine. Compte tenu des nombreuses façons de contrôler l'organisation et la dynamique de l'actine, le remodelage du cytosquelette d'actine apparait comme un moyen puissant de moduler l'adhésion intercellulaire.

2.2.2. Régulation du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine

Dans la suite du paragraphe, nous allons nous concentrer sur les mécanismes connus qui peuvent réguler le complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine à la membrane.

Modifications transcriptionnelles

Pour modifier l'adhérence des cellules, il est possible de modifier la quantité globale de E-cadhérines à la membrane. La régulation de la transcription de la E-cadhérine a été de nombreuses fois étudiée dans le contexte de l'EMT dont l'un des marqueurs est la diminution d'expression des E-cadhérines (Acloque et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009). L'EMT est caractérisée par le passage de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse. De nombreuses cellules cancéreuses présentent des défauts de régulation et d'expression de la E-cadhérine. Néanmoins, une régulation transcriptionnelle ne permet pas de modifier rapidement l'adhésion intercellulaire. En effet, la durée de vie de la E-cadhérine a été estimée à entre 5 et 10 heures dans les cellules (McCrea and Gumbiner, 1991; Shore and Nelson, 1991).

Modifications du renouvellement membranaire des E-cadhérines

Outre les régulations transcriptionnelles, la quantité totale de E-cadhérines à la membrane est régulée, et un échange constant s'effectue, sans modification de l'expression génétique. Par exemple, lorsque la concentration en ions calcium est réduite, les E-cadhérines sont internalisées en quelques minutes et les

contacts cellule-cellule sont perdus (Ivanov, 2003; Kartenbeck et al., 1982). Le niveau membranaire de Ecadhérines est déterminé par la balance entre l'endocytose et la dégradation du complexe - qui diminuent le nombre de E-cadhérines de la membrane -, et la synthèse et l'exocytose des cadhérines - qui augmentent le nombre de E-cadhérines disponibles-. Une fois internalisés, les endosomes avec les E-cadhérines peuvent prendre différentes routes et permettre de modifier le taux de recyclage des E-cadhérines, de les relocaliser, ou de les dégrader dans les lysosomes. Ces phénomènes sont décrits dans différentes revues (Grant and Donaldson, 2009; Kowalczyk and Nanes, 2012; Yap et al., 2007). Nous ne détaillerons pas ici tous les mécanismes de recyclages des E-cadhérines. Mais brièvement, la E-cadhérine nouvellement synthétisée est transférée du golgi à la membrane par un mécanisme d'exocytose (Yeaman, 2004), ensuite les E-cadhérines sont recyclées par des endosomes pour être soit dégradées soit réadressées à la membrane. L'internalisation des E-cadhérines peut être médiée par différents mécanismes, dépendants ou non des clathrines ou des calvéoles. Les GTPases Arf6, Rac1 ou Cdc42 sont impliquées dans la régulation de cette endocytose. L'activation de Arf6 suite à l'expression du mutant de Src constitutivement actif conduit à l'internalisation de la E-cadhérine, tandis que lorsque Rac1 et Cdc42 sont activées, cela protège les cadhérines membranaires de l'endocytose en favorisant leur association avec le cytosquelette d'actine (Izumi et al., 2004; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Palacios et al., 2002). Sous HGF, une augmentation de Arf6-GTP est observée (Palacios and D'Souza-Schorey, 2003), et l'expression d'un mutant dominant négatif de Arf6 prévient l'endocytose des E-cadhérines (Palacios et al., 2001). L'activation de Src peut conduire à la phosphorylation de certaines tyrosines de la Ecadhérine, qui une fois phosphorylées diminue l'affinité de p120 pour la E-cadhérine (Fujita et al., 2002; Ishiyama et al., 2010). Ceci conduit alors à la mono-ubiquitination de la E-cadhérine par Hakai, une E3ubiquitine ligase, favorisant ainsi son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes (Fujita et al., 2002). Il a été aussi montré qu'une surexpression de la forme constitutivement active de la kinase Src peut conduire à l'internalisation et l'ubiquitination des E-cadhérines qui vont se situer alors dans les lysosomes pour être dégradées au lieu d'être recyclées (Palacios et al., 2005). Pour des cellules épithéliales à confluence, p120 permet toutefois de protéger la E-cadhérine de son internalisation et de sa dégradation en entrant en compétition avec Hakai.

Le phénomène d'endocytose est nécessaire pour remodeler les jonctions adhérentes, créer de nouveaux contacts... en particulier pour les cellules en migration. L'inhibition de l'endocytose bloque la redistribution des E-cadhérines à la membrane (de Beco et al., 2009), et abolit la formation de nouveaux contacts impliquant la E-cadhérine (Troyanovsky et al., 2006).

Il existe également une autre façon de moduler la présence de E-cadhérines à la membrane. Les protéases transmembranaires telles que ADAM10 sont capables de dégrader de nombreux récepteurs transmembranaires dont les cadhérines en coupant leur domaine extracellulaire sur un site proche de leur domaine membranaire. Il a été montré que la surexpression des protéines ADAM10 inhibe l'adhérence intercellulaire dépendante des cadhérines (Maretzky et al., 2005). Le clivage des cadhérines par des protéases telles que la caspase3, la preseniline (les deux en intracellulaire), ou ADAM10 sur sa partie extracellulaire jute après le domaine transmembranaire, peut avoir lieu à la suite d'une blessure, d'une entrée de calcium ou d'apoptose (Ito et al., 1999; Marambaud et al., 2002; Maretzky et al., 2005; Steinhusen et al., 2001).

Modifications post-traductionnelles sur le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine

De nombreuses modifications post-traductionnelles sont susceptibles de réguler l'affinité du complexe Ecadhérine/ β -caténine et son lien avec le cytosquelette d'actine. Les interactions entre la β -caténine et ses différents partenaires moléculaires sont régulées en grande partie par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation, impliquant respectivement des kinases et des phosphatases (revue : (Pokutta and Weis, 2000; Tan et al., 2016)).

Par exemple, l'affinité du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine avec la β-caténine augmente d'un facteur 100 sous la phosphorylation de CKII (Catimel et al., 2006). En conséquence, la mutation des sites de phosphorylation Ser684, Ser686, et Ser692 de la E-cadhérine conduit à une diminution du nombres de contacts cellule-cellule (Choi et al., 2006; Lickert et al., 2000). Cette forme phosphorylée de la E-cadhérine est parfois constitutive dans les cellules et permet de stabiliser le complexe E-cadhérine-caténine (McEwen et al., 2014).

La phosphorylation de la β -caténine au niveau de certaines de ses tyrosines constitue une autre modification post-traductionnelle connue pour modifier l'affinité entre la E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine. Notamment les tyrosines 654 et 142 sont situées dans les sites d'interaction avec la E-cadhérine et l' α -caténine respectivement (Figure 37). Il a été montré, il y a plus de 20 ans, par analyse de profil de phosphorylation par western blot que l'activation de la kinase Ras conduit aussi à une augmentation de la phosphorylation des tyrosines de la β -caténine (Kinch et al., 1995). Lorsque celles-ci sont phosphorylées, la β -caténine a une plus faible affinité avec la E-cadhérine, et se retrouve moins dans la fraction où se trouve les protéines associées avec le cytosquelette. De plus, pour les cellules, la stabilité des contacts est réduite (Kinch et al., 1995). De même sous HGF, l'analyse des tyrosines phosphorylées par western blot a pu montrer que la β -caténine est plus phosphorylée sous HGF, et le niveau d'expression de la β -caténine et la E-cadhérine est le même (Shibamoto et al., 1994).



Figure 37 – Phosphorylations de la β -caténine. a) Structure cristallographique de la β -caténine avec ces 12 répétitions des domaines armadillo en jaune, du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine non structuré en rouge, et en vert de l' α -caténine. On peut voir que le premier domaine armadillo de la β -caténine change de conformation lorsqu'il interagit avec l' α -caténine. Les régions rouges en pointillées représentent les régions flexibles de la E-cadhérine. (Adapté de Huber and Weis 2001). b) Schéma de la structure de la β -caténine avec en violet la partie N-terminal de la β -caténine et ses serines et thréonines qui une fois phosphorylées conduisent à sa dégradation ; en vert les kinases Src, Abl, Fer, Fyn, cMet qui peuvent phosphoryler les tyrosines Y142 et Y654 de la β -caténine. La phosphorylation de Y142 diminue l'affinité de la β -caténine avec l' α -caténine, et la phosphorylation de Y654 diminue l'affinité de la β -caténine avec la β -caténine.

Par la suite, ces tyrosines ont pu être identifiées, et il a été montré que :

- La tyrosine 654 régule l'affinité entre la β -caténine et la E-cadhérine (Figure 37.b). Cette phosphorylation détruit la liaison hydrogène formée entre le groupe hydroxy phénol de la tyrosine 654 de la β -caténine et le résidu asparagine de la cadhérine, et diminue d'un facteur dix son affinité avec la E-cadhérine *in vitro* (Roura et al., 1999). En effet, l'affinité entre la queue cytoplasmique de la E-cadhérine et la β -caténine a été mesurée autour de Ka_{Ecad/βcat} = 10⁸ M⁻¹. Cette interaction est diminué d'un facteur 10 pour la β -caténine

phosphorylée *in vitro* par Src en Y654, ainsi que pour un mutant mimant la forme phosphorylée. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Affinity constants for binding assay of cytoEcad to $\boldsymbol{\beta}\text{-catenin}$	Ka (E-cad/b-cat) M ⁻¹
crtl	10 10 ⁷
Src Y654-phosphorylated	1,2 10 ⁷
β-catenin Y654E (phosphomimic)	0,77 10 ⁷
β-catenin Y654F (phosphorylation impaired)	10,4 10 ⁷

Table 2 – Récapitulatif des constantes d'affinité entre la partie cytoplasmique de la E-cadhérine et la β -caténine, la β -caténine phosphorylée par Src en Y654, et les mutants de la β -caténine Y654E et Y654F. (Roura et al. 1999)

Dans l'étude *in vitro* menée par Roura et al., les auteurs ont aussi testé l'effet de la phosphorylation de la β caténine en transfectant des cellules Caco-2. Ils ont utilisé un mutant de la β-caténine non phosphorylable en remplaçant la tyrosine 654 par une phénylalanine, et un mutant mimant la forme phosphorylée de la βcaténine en tyrosine 654 en mettant un acide glutamique chargé négativement. Ils ont également traité les cellules avec de l'othovanadate Na₃VaO₄, pour induire la phosphorylation de β -caténine Y654 dans les cellules (Volberg et al., 1992). Ils ont pu montrer en mesurant la quantité de E-cadhérine associée à la β-caténine par immunoprécipitation, que dans les cellules aussi, le mutant Y654E avait une affinité plus faible avec la Ecadhérine. Cette affinité est du même ordre que celle entre la β-caténine et la E-cadhérine lorsqu'on traite les cellules avec l'orthovanadate, alors que le mutant Y654F présente la même affinité avec la E-cadhérine que la β-caténine non mutée des cellules non stimulées. D'autre part, la diminution d'affinité entre la β-caténine Y654E mimant l'état phosphorylée et la E-cadhérine, a été également été confirmées in vivo avec des souris mutantes par immunoprécipitation (van Veelen et al., 2011) et dans des cellules d'hépatocytes de rat où le mutant pour la β-caténine Y654E n'est pas localisé à la membrane mais directement dans le noyau (Zeng et al., 2006). Dans certaines cellules cancéreuses de mélanome, il a été montré qu'un niveau élevé de β-caténine phosphorylée au niveau des tyrosines peut être détecté, et l'ajout de Geldanamycine déphosphoryle la βcaténine et corrèle avec une augmentation de l'affinité de la β -caténine avec la E-cadhérine par immunoprécipitation (Bonvini et al., 2001). Les auteurs ont également vérifié que la forme mutante de la β caténine Y654F coprécipite avec la E-cadhérine, et la forme Y654E en moindre quantité (Bonvini et al., 2001). Suite à l'irradiation d'UVA des cellules Hacat, le récepteur EGFR phosphoryle indirectement la β-caténine en Y654 en 5 minutes, et conduit à la dissociation détectée par immunoprécipitation de la β-caténine de la Ecadhérine (Jean et al., 2009). Les kinases Src (Piedra et al., 2001; Roura et al., 1999) et Abl (Coluccia et al., 2007) in vitro peuvent phosphoryler la β -caténine en Y654, et l'expression de Src constitutivement actif dans les cellules augmente la proportion de β -caténine phosphorylée (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993).

- La tyrosine 142 se trouve dans la région de la β -caténine entre les résidus 118 et 149 qui permettent l'interaction avec l' α -caténine (Aberle et al., 1997; Pokutta and Weis, 2000) (Figure 37.b). Le noyau aromatique hydrophobe de la tyrosine 142 permet de former des interactions de Van der Waals avec certains acides aminés de l' α -caténine. Cette interaction β -caténine/ α -caténine peut être régulée par les kinases de la famille de Src : Fyn et Fer, ainsi que cMet (Brembeck et al., 2004; Piedra et al., 2003). Et le remplacement de la β -caténine WT par le mutant Y142E mimant la phosphorylation de la β -caténine en Y142, diminue l'affinité de la β -caténine avec l' α -caténine, et prévient la formation de contacts cellule-cellule (Tominaga et al., 2008).

De plus, la phosphorylation de la β -caténine peut être réduite par différentes phosphatases. C'est le cas notamment de PTPk qui peut se lier à la β -caténine et la déphosphoryler *in vitro* (Fuchs et al., 1999) ou PTP1B qui peut déphosphoryler la tyrosine 654 de la β -caténine, et dont la déplétion conduit à une diminution de l'adhésion cellule-cellule (Balsamo et al., 1998; Xu et al., 2004).

Cependant il y a encore des débats quant à la pertinence physiologique de ces résultats *in vivo* tant pour le rôle des résidus tyrosines contrôlant l'affinité de la β -caténine avec la E-cadhérine et l' α -caténine, que les cibles directes des kinases impliquées dans la régulation de la stabilité du complexe. Par exemple, malgré le remplacement de la β -caténine WT par le mutant Y654E mimant la phosphorylation de la β -caténine en Y654, l'adhésion des cellules F9 dépourvu de β -caténine endogène, est maintenue (Tominaga et al., 2008). Même si dans l'article van Veelen et al., 2011, les auteurs ont montré une diminution d'affinité de la E-cadhérine avec le mutant Y654E de la β -caténine, ils ont observé que cette construction peut toujours être recrutée à la membrane avec la E-cadhérine (van Veelen et al., 2011). De même, l'augmentation de la forme tyrosine phosphorylée de la β -caténine a été observée dans les cellules exprimant une forme constitutivement active de Src, mais le complexe est toujours formée (Hamaguchi et al., 1993; Papkoff, 1997; Reynolds et al., 1994). De plus, l'adhésion de certaines cellules rendue possible grâce à une protéine chimère entre la E-cadhérine et l' α -caténine en absence de β -caténine peut quand même être régulée par la kinase Src (Takeda et al., 1995). Le rôle des kinases Src qui peuvent directement phosphoryler la β -caténine *in vitro*, est peut-être autre dans les cellules. D'autres expériences sont donc requises pour mieux comprendre la régulation de l'adhésion intercellulaire par les tyrosine-kinases.

En définitive, les cellules disposent de multiples possibilités pour moduler leur adhérence via leurs jonctions adhérentes :

- sur le long terme en modifiant la transcription des protéines du complexe,
- en modifiant le recyclage et l'échange dynamique des E-cadhérines à la membrane,
- en modifiant directement les affinités entre les protéines du complexe grâce à des kinases et phosphatases,
- mais aussi indirectement en changeant l'organisation du réseau d'actine. La modification de l'organisation du cytosquelette d'actine pourrait avoir de multiples cibles en permettant et favorisant les modifications post-traductionnelles sur le complexe, en favorisant le recyclage, la dégradation...

2.3. Signalisation β -caténine

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la β -caténine, par son interaction directe avec les Ecadhérines et son recrutement de l' α -caténine qui à son tour va se lier au cytosquelette d'actine, a un rôle clé dans les jonctions adhérentes. Mais, la β -caténine est également un cofacteur de transcription qui en s'association avec les facteurs TCF/LEF-1 dans le noyau peut conduire à la transcription d'un grand nombre de gènes.

2.3.1. Homéostasie de la β-caténine

La β -caténine est une protéine multifonctionnelle dont la localisation dans les différents compartiments de la cellule joue un rôle important.

Cette fonction double entre composant essentiel de l'adhésion et médiateur de voie de signalisation est observée chez les cnidaires (Broun et al., 2005) mais aussi les éponges (Lapébie et al., 2009; Nichols et al., 2012) et semble être présente depuis environ 700 millions d'années (Schneider and Bowerman, 2007). Chez le poisson zèbre, la duplication du génome a conduit à deux β -caténines dont les fonctions se recouvrent partiellement (Bellipanni et al., 2006). Chez *Caenorhabditis elegans*, la situation est encore plus extrême avec quatre versions de β -caténines qui ont divergé et évolué différemment pour certaines avec un rôle distinct dans l'adhésion (HMP-2) et d'autres uniquement dans la signalisation au noyau (BAR-1, WRM-1, SYS-1)(Phillips and Kimble, 2014).

La β-caténine peut donc jouer un rôle de messager navette entre différents compartiments : (1) membrane, (2) cytoplasme, et (3) noyau (Figure 38). Sa concentration dans chaque compartiment cellulaire est très finement régulée.



Figure 38 – Homéostasie de la 6-caténine : la 6-caténine est une protéine navette qui peut se localiser i) à la membrane en interagissant avec les E-cadhérine et pouvant être dégradée, ii) dans le cytoplasme où elle est synthétisée et est séquestrée par le complexe de dégradation Axine/APC, puis dégradée, iii) dans le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF et où elle peut être dégradée.

(1) Membrane :

Dans les cellules épithéliales, la β -caténine est principalement localisée au niveau des jonctions adhérentes où elle interagit avec les E-cadhérines. Ainsi à la membrane, la β -caténine est séquestrée par la queue cytoplasmique de la cadhérine, et puis recrute l' α -caténine, qui va ensuite ancrer le complexe au cytosquelette d'actine. La dégradation de la β -caténine peut avoir lieu dans le cytoplasme comme directement à la membrane (Maher et al., 2009).

(2) Cytoplasme :

Dans le cytoplasme, la β -caténine est constamment dégradée par la séquestration par un complexe composé des protéines APC, Axine, et des kinases CKI et GSK3 β . Ces deux kinases vont phosphoryler la β -caténine en N-terminal sur les sérines (S33 S37 et S45) et thréonine (Thr41). Ensuite, la β -caténine phosphorylée sur son domaine N-terminal peut être reconnue par l'ubiquitine ligase TrCP1 et ubiquitinée pour conduire à sa dégradation par le protéasome (revue : (Cadigan and Peifer, 2009)). Ce processus de régulation et dégradation de la β -caténine est essentiel pour les cellules, et ces mécanismes se retrouvent souvent altérés dans de nombreuses formes de cancers (carcinome colorectal, hépatique, poumon, sein, ovaire...) ou de maladies cardiaques (Morin, 1999).

(3) Noyau :

Dans certaines conditions, par exemple quand la dégradation de la β-caténine est inhibée, la β-caténine peut alors être stabilisée dans le cytoplasme sans le complexe de dégradation et s'accumuler dans le noyau où elle

active différents gènes. Les mécanismes de transport de la β -caténine vers le noyau sont encore mal compris. Mais, la β -caténine peut interagir avec la protéine BCL-9 (Sampietro et al., 2006). Cette interaction permet de faciliter son transport nucléaire (Brembeck et al., 2004; Krieghoff et al., 2006). En effet, la translocation nucléaire de la β -caténine a été étudiée dans différents articles. Il s'agit d'une protéine de 92kDa, qui ne contient pas de séquence NLS, et pourtant elle peut rentrer dans le noyau sans transporteur. En effet, la structure des domaines armadillo de la β -caténine possède des similitudes avec celle des répétitions HEAT des importines- β (Andrade et al., 2001). Une fois dans le noyau, la β -caténine peut se fixer, via ses domaines armadillo, avec les membres de la famille LEF/TCF pour former un facteur de transcription bipartie : la liaison à l'ADN est assurée par les TCFs, et la fonction d'activateur transcriptionnel est assurée par la β -caténine (Fagotto et al., 1998; Koike et al., 2004; Krieghoff et al., 2006; Suh and Gumbiner, 2003). De nombreux gènes peuvent ainsi être régulés par la présence nucléaire de β -caténine tels que cMyc, cyclinD, Axin-2, c-jun ...

2.3.2. Perturbations et déclencheurs de la voie de signalisation

L'activité de la β -caténine et sa localisation ont été très largement étudiées dans le contexte de la voie de signalisation Wnt et le développement. Néanmoins d'autres routes alternatives n'impliquant pas la voie Wnt peuvent également modifier sa localisation et son accumulation nucléaire.

Dans les cellules épithéliales, plusieurs phénomènes pourraient expliquer une accumulation nucléaire de la β -caténine (Figure 39). Si l'on reprend la représentation en 3 compartiments de l'homéostasie de la β -caténine de la Figure 38, on peut voir que la β -caténine, pour s'accumuler dans le noyau, peut provenir du réservoir cytoplasmique ou d'une libération de la membrane. Ainsi, cette accumulation pourrait avoir lieu après une modification de (1) la régulation de la synthèse ou de la dégradation de β -caténine, ce qui est notamment le cas avec le ligand Wnt, ou de (2) toutes modifications permettant la libération de la β -caténine de la membrane, par exemple en modifiant (2a) la quantité de E-cadhérines à la membrane par un contrôle transcriptionnel ou le recyclage du complexe, ou (2b) sa stabilité et son affinité avec ses partenaires dans les jonctions adhérentes à la membrane. Dans ce paragraphe, nous allons revenir sur les preuves expérimentales de la modulation de la voie de signalisation β -caténine.



Figure 39 – Schéma hypothétique des différentes possibilités pouvant conduire à une activation de la voie de signalisation β -caténine : (1) par la régulation de la dégradation de la β -caténine ; (2a) par la régulation du niveau d'expression des Ecadhérines ou de la quantité de E-cadhérines présentes à la membrane ; (2b) par la modification post-traductionnelle des tyrosines de la β -caténine qui une fois phosphorylées diminue son affinité avec les E-cadhérines et l' α -caténine. La réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau des jonctions adhérentes peut potentiellement avoir un effet sur la libération de la β -caténine de la membrane en affectant plusieurs mécanismes : le recyclage, les modifications post traductionnelles, mais aussi le regroupement en cluster, la tension dans le complexe...

Nous allons discuter, à travers quelques exemples, de l'activation de la voie de signalisation β -caténine par stimulations biochimiques ou mécaniques dans les paragraphes ci-dessous, en nous concentrons dans un premier temps sur les modifications conduisant à une diminution de la dégradation de la β -caténine. Ensuite, nous décrirons les cas démontrés de modifications de la stabilité du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine à la membrane qui conduisent à une accumulation nucléaire de la β -caténine. Ensuite, nous reviendrons sur une stimulation pléiotropique telle que l'ajout du facteur de croissance HGF, qui active la voie de signalisation de la β -caténine, possiblement en modifiant plusieurs aspects : dégradation, stabilité du complexe... Et nous finirons par discuter de différents exemples de perturbations mécaniques qui conduisent à l'activation de la voie de signalisation β -caténine mais dont les mécanismes moléculaires jouant sur la dégradation, la stabilité du complexe à la membrane... ne sont pas toujours connus.

(1) Modification de la dégradation de la 6-caténine conduisant à l'activation de la transcription des gènes dépendants de la 6-caténine

Wnt, ligand soluble

La β -caténine est un régulateur central de la voie de signalisation canonique Wnt. La voie de signalisation Wnt est très conservée dans les organismes multicellulaires et contrôle l'expression de gènes impliqués dans la régulation de nombreux processus tels que la prolifération, le destin cellulaire, la polarité et l'adhésion cellulaire à la fois dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus chez l'adulte. Une dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine a été décrite dans de nombreux cancers et autres maladies humaines dégénératives. Lorsque le ligand Wnt se fixe sur son récepteur Frizzled et recrute les corécepteurs LRP5/6 puis Dvl, l'axine et ses partenaires se retrouvent séquestrés à la membrane (Huang and He, 2008). Ainsi la dégradation de la β -

caténine est inhibée, elle peut alors être stabilisée dans le cytoplasme sans le complexe de dégradation et s'accumuler dans le noyau où elle active différents gènes (Figure 40). Ce phénomène a d'ailleurs été modélisé quantitativement à plusieurs reprises, au départ en tenant compte uniquement de la β -caténine et ses partenaires dans le complexe de dégradation (Lee et al., 2003; MacLean et al., 2015), mais également en tenant compte des E-cadhérines (van Leeuwen et al., 2007), ou du transport entre noyau et cytoplasme (Schmitz et al., 2013).



Figure 40 – Représentation schématique de la voie de transduction du signal Wnt/6-caténine (d'après Mosimann, Hausmann et al. 2009)

Nous ne discuterons pas plus de la voie Wnt ici qui a été largement décrite dans différents systèmes (revues :(Cadigan and Nusse, 1997; Clevers, 2006; Grigoryan et al., 2008)).

Hors Wnt

De même, la dégradation de la β-caténine peut être diminuée sous le contrôle de la phosphatase PP2A qui déphosphoryle les kinases CKI et GSK3β indépendamment de Wnt. Dans ce cas, la β-caténine libre qui n'est pas en interaction avec le complexe de dégradation, ni celui des jonctions adhérentes peut gagner le noyau (Seeling et al., 1999).

(2) Modification du niveau global de E-cadhérines conduisant à l'activation de la transcription des gènes dépendants de la 6-caténine

L'activation de la voie β-caténine est souvent corrélée avec la disparition du réservoir membranaire de Ecadhérines pour de nombreuses variétés de tumeurs (revue (Clevers, 2006; Giles et al., 2003; Moon et al., 2004)). De même, la disparition du réservoir membranaire de E-cadhérines et l'accumulation nucléaire de la βcaténine ont été étudiées dans le contexte de l'EMT lors du développement et de la tumorigenèse (Thiery et al., 2009). En effet, dans les cellules EMT-induites, la perte d'expression de la E-cadhérine (lors de l'ajout de facteur de croissance, ou en manipulant le niveau de E-cadhérines dans les cellules par délétion dans les cellules) favorise souvent une accumulation nucléo-cytoplasmique de la β-caténine et la transcription de gènes associés au complexe TCF/LEF (Eger et al., 2000; Heuberger and Birchmeier, 2010; Kuphal and Behrens, 2006; Onder et al., 2008; Orsulic et al., 1999). Néanmoins, la régulation uniquement par la quantité de E-cadhérines ne permet pas toujours d'induire une accumulation nucléaire de la β-caténine si cette dernière est trop rapidement dégradée (Herzig et al., 2007; Van de Wetering et al., 2002). Inversement, une surexpression des E-cadhérines peut séquestrer toute la β-caténine à la membrane et perturber la signalisation Wnt, par exemple en inhibant la formation de l'axe dorsal dans l'embryon de *Xenopus* (Heasman et al., 1994) ou en reproduisant le phénotype wingless dans l'embryon de *Drosophile* (Sanson et al., 1996). La surexpression seule de la partie cytoplasmique avec le domaine transmembranaire de la E-cadhérines est suffisante pour inhiber l'activité transcriptionnelle de la β-caténine dans les cellules (Gottardi et al., 2001).

Ainsi, dans les cellules épithéliales, la modulation du niveau total de E-cadhérines via la transcription de la Ecadhérines au noyau, est un moyen de réguler la voie de signalisation β -caténine. Mais, outre cette régulation directe de l'expression génétique de la E-cadhérine, il est possible également de modifier le niveau total de Ecadhérine à la membrane de façon plus rapide. Par exemple, le clivage de la E-cadhérine par les protéases peut conduire à la libération de la β -caténine et par conséquent à une sur-activation de la voie de signalisation. C'est le cas de ADAM10 qui est connu pour réduire l'adhésion cellulaire dans les kératinocytes et conduire à une accumulation nucléaire de la β -caténine directement dans sa partie intracellulaire, mais dans le cas de ADAM10 le clivage se fait dans le domaine extracellulaire de la E-cadhérine. On peut alors se demander pourquoi le domaine intracellulaire de la E-cadhérine ne peut plus capturer la β -caténine dans ce cas alors qu'il peut lors de la surexpression du domaine intracellulaire et transmembranaire de la E-cadhérine dans l'étude Gottardi et al. 2001.

Le niveau de E-cadhérines peut être régulé par la modulation de l'endocytose et du recyclage du complexe (comme nous l'avons vu dans la partie 2.2). Il a été montré dans certains cas, qu'une augmentation du recyclage des E-cadhérines notamment par Arf6 conduit à une augmentation de la β -caténine nucléaire et cytoplasmique quantifiée par western blot et une augmentation de la transcription des gènes dépendants de la β -caténine visualisée par le rapporteur TOPFlash (Pellon-Cardenas et al., 2013). Après stimulation par des facteurs de croissance, l'endocytose des E-cadhérines est augmentée et corrèle avec l'activation de la voie β -caténine chez différentes lignées cancéreuses stimulées avec EGF par le biais des cavéolines (Lu et al., 2003). De même, l'ajout de HGF conduit à la transcription des gènes dépendants de la β -caténine, qui n'a plus lieu lors de l'inhibition de l'internalisation des E-cadhérines (Howard et al., 2011).

(3) Modifications post-traductionnelles affectant l'affinité du complexe E-cadhérine/βcaténine/α-caténine qui conduisent à l'activation de la transcription des gènes dépendants de la β-caténine

Nous avons vu dans le paragraphe 2.2 qu'il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles susceptibles de réguler l'affinité du complexe E-cadhérine/ β -caténine et son lien avec le cytosquelette d'actine. Néanmoins, il n'a été prouvé que dans certains cas que certaines de ces modifications puissent conduire à une accumulation nucléaire de la β -caténine. En effet, nous avons vu que les phosphorylations en Y142 et Y654 de la β -caténine permettent de diminuer l'affinité de la β -caténine avec l' α -caténine et la E-cadhérine. En revanche, dans les deux publications originales, ils n'ont pas regardé l'impact de la phosphorylation sur l'accumulation nucléaire de la β -caténine (Piedra et al., 2003; Roura et al., 1999).

Par la suite, il a été montré que ces phosphorylations sont impliquées dans l'activation de la voie de signalisation β -caténine. La vérification du changement d'affinité au niveau des jonctions adhérentes n'a pas été réalisée systématiquement, et dans les articles suivants, il s'agit en fait de corrélation entre la phosphorylation de la β -caténine et son accumulation nucléaire. Par exemple, la phosphorylation de la β -caténine en Y654 a été observée en même temps que son accumulation nucléaire dans les embryons de *Drosophile* ou de poisson zèbre stimulé mécaniquement, ou chez certaines cellules cancéreuses stimulées

mécaniquement, et sous l'étirement des cellules MDCK, (Benham-Pyle et al., 2016; Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008; Whitehead et al., 2008).

Sous HGF, il a été montré que la forme phosphorylée de la β-caténine est plus abondante que sans HGF dans les cellules MDCK, interagit avec le transporteur BCL-9 et augmente la transcription des gènes (Brembeck et al., 2004). Le mutant Y142A de la β-caténine diminue l'interaction avec BCL-9 et sous HGF prévient la transcription des gènes correspondants (Brembeck et al., 2004). Dans certains cas, le mutant de la β-caténine Y654E, mimant la phosphorylation, n'est pas localisé à la membrane mais directement dans le noyau, tout comme le mutant Y142E (Zeng et al., 2006). Dans les cellules MDCK, le mutant Y654E de la β-caténine n'est pas localisé uniquement à la membrane mais dans le cytoplasme, et la transcription des gènes rapportée par le rapporteur TOPFlash est pourtant plus faible dans ce cas (Howard et al., 2011).

Dans les différents articles cités précédemment, l'affinité de la β-caténine pour la E-cadhérine n'a pas été réévaluée à la suite de l'observation des phosphorylations ou avec les mutants de phosphorylation. La corrélation entre la modification d'affinité au niveau des jonctions et l'accumulation nucléaire a été mise en évidence dans l'article Bonvini et al. 2001. En effet, il a été montré dans un premier temps que dans certaines cellules cancéreuses de mélanome, le niveau de β-caténine tyrosine-phosphorylée est élevé et corrèle avec une forte activité de la transcription des gènes dépendants de la β-caténine. L'ajout d'une drogue conduisant à la déphosphorylation de la β-caténine, augmente l'affinité de la β-caténine avec la E-cadhérine, et corrèle avec une diminution de la transcription des gènes rapportée par le rapporteur TOPFlash (Bonvini et al., 2001). De même, dans les cellules Hacat sous UVA, la β-caténine phosphorylée en Y654 est moins associée avec la E-cadhérine, et est retrouvée en excès dans le noyau et en interaction avec TCF4 (Jean et al., 2009). La quantité de E-cadhérine totale ne change pas pour autant, et l'irradiation avec les UVA n'a aucun effet sur GSK3β qui peut moduler la dégradation de la β-caténine. L'utilisation du mutant non phosphorylable de la β-caténine Y654F prévient l'accumulation nucléaire de β-caténine sous UVA.

Par contre, dans certaines conditions, il a été aussi montré que la phosphorylation des tyrosines de la β caténine n'est pas nécessaire ou suffisante pour induire une accumulation nucléaire et une transcription des gènes. C'est notamment le cas, avec les mutants Y654F et Y142F qui ne sont pas suffisants sous HGF pour prévenir la réponse proliférative des cellules ou l'accumulation nucléaire de la β -caténine (Zeng et al., 2006). Ou encore, par exemple chez la *Drosophile*, malgré l'utilisation du mutant non phosphorylable Y142F à la place du WT, la voie de signalisation β -caténine est quand même activable (Hoffmans and Basler, 2007). De même, la translocation de la β -caténine du corps dendritique aux épines des synapses lors de la dépolarisation dans les neurones est observable même avec la version non phosphorylable de la β -caténine Y654F (Murase et al., 2002). Le mutant de la β -caténine Y654E, bien que suffisant pour diminuer l'affinité avec la E-cadhérine *in vivo*, n'est pas suffisant pour prévenir tout contact cellule-cellule, et est présent à la membrane, et non directement dans le noyau (van Veelen et al., 2011).

En conclusion, nous avons vu que la modification de la synthèse et la dégradation de la β -caténine, la régulation transcriptionnelle du réservoir de E-cadhérines, le régulation par endocytose et recyclage des E-cadhérines, et les modifications post traductionnelles capables de diminuer l'affinité de la β -caténine avec la E-cadhérine et l' α -caténine, peuvent réguler la voie de signalisation β -caténine. Mais finalement, ces mécanismes peuvent aussi être interdépendants et dépendent des contextes biologiques.

Exemple de perturbation multifactorielle : le facteur de croissance HGF

Dans ce paragraphe, nous allons présenter une perturbation qui conduit à la transcription des gènes dépendants de la β -caténine, et dont les causes peuvent être multifactorielles. Bien que l'accumulation nucléaire de β -caténine ne soit pas toujours convainquante en raison de la difficulté des marquages sur cellules fixées (Brembeck et al., 2004; Howard et al., 2011; Monga et al., 2002), l'ajout de facteur de croissance, tel que HGF est connu pour activer la transcription des gènes dépendants de la voie de signalisation β -caténine dans les cellules épithéliales (Apte et al., 2006; David et al., 2008; Liou et al., 2002; Matteucci et al., 2006; Monga et al., 2002; Müller, 2002; Papkoff and Aikawa, 1998; Purcell et al., 2011; Rasola et al., 2007; Soldati et al., 2008; Zeng et al., 2006). HGF va se fixer sur son récepteur tyrosine kinase cMet, conduire à une augmentation de l'activité protrusive des cellules dès les premières minutes, puis à la déstabilisation des contacts intercellulaires dès 3-4 heures pour finalement conduire la dissociation des cellules au bout de 10 heures, et modifier le devenir des cellules épithéliales en augmentant leur prolifération, leur motilité, leur migration, leur invasion.

Par contre, les mécanismes mis en jeu conduisant à l'activation de la voie de signalisation β -caténine ne sont pas encore très bien compris dans leur globalité. Depuis longtemps, il a été mis en évidence que les facteurs de croissance à long terme conduisent à une EMT, et une diminution d'expression de la E-cadhérine. Cette diminution de la quantité de E-cadhérines membranaire passe également par une activation de la dégradation des E-cadhérines une fois internalisées (Fujita et al., 2002; Howard et al., 2011; Kamei et al., 1999; Miura et al., 2001). Malgré tout, le rôle de l'endocytose des cadhérines fait encore débat dans ce contexte, et n'est peutêtre pas le premier élément responsable de l'accumulation de la β -caténine et de la dispersion des cellules, car l'endocytose est observée après 24 ou 48 h (Miura et al., 2001), 18 h de stimulation (Kamei et al., 1999), 6 à 16 h (Howard et al., 2011), ou 4 h (Fujita et al., 2002).

D'autre part, dans certaines cellules, l'ajout de HGF conduit à une diminution de la dégradation de β -caténine, en régulant GSK3 β (Ishibe et al., 2006; Koraishy et al., 2014; Papkoff and Aikawa, 1998), mais dans d'autres non (Monga et al., 2002).

Par immunoprécipitation, il a été montré que HGF peut également augmenter la forme tyrosine-phosphorylée de la β -caténine (Liou et al., 2002; Monga et al., 2002; Purcell et al., 2011; Rasola et al., 2007; Shibamoto et al., 1994). Dans les cellules hépatocytes de rat, sous l'activation du récepteur cMet par HGF, la forme phosphorylée de la β -caténine est présente et augmentée par rapport à sans HGF (d'après les auteurs car l'immunoprécipitation ne le montre pas), et conduit à son accumulation dans le noyau (Monga et al., 2002). De plus, pour des cellules d'hépatoblastome, HGF conduit à l'augmentation de la forme phosphorylée en Y654 de la β -caténine (Purcell et al., 2011).

Une fois HGF fixé à son récepteur cMet, le récepteur va s'activer et recruter à son tour de nombreux effecteurs tels que Src, GRB2, SHC, CRK, PI3K ... (Organ and Tsao, 2011; Trusolino et al., 2010). L'activation des kinases Src a été mise en évidence pour différents types cellulaires après plusieurs heures (Chen et al., 1998; Empereur et al., 1997; Grano et al., 1996; Mao et al., 1997; Ponzetto et al., 1994; Popsueva et al., 2003; Rahimi et al., 1998), ou dans la première heure (Popsueva et al., 2003), et pourrait expliquer la phosphorylation en Y654 de la β -caténine observée dans certains types cellules sous HGF.

De plus, un changement de la structure des jonctions E-cadhérines, et de l'organisation de l'actine corticale, a été mis en évidence sous HGF (Balkovetz and Sambandam, 1999; De Rooij et al., 2005; Le Duc et al., 2010; Maruthamuthu and Gardel, 2014), mais aucun lien n'a pour l'instant été clairement établi avec une dissociation de la β -caténine des contacts cellulaires. De la même façon, Rac et Cdc42 sont activés à la suite de l'ajout de HGF et sont à l'origine de l'augmentation des protrusions observés sous HGF (Bosse et al., 2007; Zondag et al.,

2000), qui conduisent à une réorganisation du cytosquelette d'actine mais on ne connait pas vraiment les conséquences sur la signalisation β -caténine.

Tous ces évènements ont lieu à des échelles de temps différentes, tous ne se manifestent pas en fonction des types cellulaires, et il est donc difficile de conclure sur la cause première de l'activation de la voie de signalisation β -caténine lors de la stimulation par HGF.

Stimulations mécaniques activant la transcription des gènes dépendants de la 6-caténine

Comme avec HGF, l'activation de la voie de signalisation β -caténine par des stimulations mécaniques a été observée, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents mis en jeu ne sont pas entièrement compris. Dans ce paragraphe, nous allons nous concentrer sur des exemples de l'activation mécanique de la voie de signalisation β -caténine, dont nous avons très brièvement parlé dans la partie 1.3.

La localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de la β -caténine peuvent être mécaniquement induites dans divers modèles sains ou malades. En effet, cette activation mécanique de la β -caténine a été mise en évidence lors de la morphogénèse chez les embryons de *Drosophile* et de poisson zèbre, lors de la différenciation des cellules osseuses, lors du développement de certaines cellules cancéreuses, ou dans des cultures de cellules sur différents supports.

L'existence de gènes mécanosensibles dont l'expression dépend des contraintes biomécaniques du tissu a été mise en évidence pour la première fois dans l'embryon de *Drosophile* (Farge, 2003). En compressant macroscopiquement l'embryon juste avant la gastrulation, l'équipe d'E. Farge a observé que le gène Twist pouvait être exprimé ectopiquement dans toute la région dorsale de l'embryon (Figure 41.a). Cette induction mécanique de Twist repose sur l'activation mécanique de la voie de signalisation de la β-caténine et son accumulation nucléaire (Figure 41.b).



Figure 41 – a) Transcription ectopique du gène Twist rapporté par le rapporteur twist-lacZ dans les embryons de Drosophile au stade 5 en réponse à la déformation du tissu dû à une compression globale de l'embryon. b) Accumulation nucléaire de la β-caténine (homologue de Armadillo chez la Drosophile) dans l'épithélium du blastoderme de l'embryon de Drosophile suite à la compression du tissu. (Adapté de (Farge, 2003).

Ainsi, les contraintes mécaniques peuvent activer indépendamment de la voie Wnt la fonction transcriptionnelle de la β -caténine. L'équipe d'E. Farge s'est par la suite intéressée plus en détails à la gastrulation chez la *Drosophila Melanogaster* et le poisson zèbre *Danio Rerio* (Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008). Chez la *Drosophile*, ils ont montré que la déformation due à l'extension du feuillet embryonnaire régule l'expression du gène Twist. La β -caténine s'accumule dans ces cellules, est phosphorylée en Y654, et cette accumulation est Src dépendante. Ils ont reproduit des déformations mécaniques par compression à l'aide de pinces magnétiques et de ferrofluide injecté dans les cellules de l'embryon. Grâce à ces déformations 101

du même ordre de grandeur que celles générées lors de l'extension du feuillet embryonnaire, dans l'embryon ablaté, ils ont pu reproduire l'accumulation nucléaire de la β -caténine (Figure 42a. et c.) et cette accumulation est perdue dans un embryon qui n'exprime plus la kinase Src (Desprat et al., 2008).

Chez le poisson zèbre, lors de la gastrulation, la blastula composée d'une sphère de cellules, se replie sur ellemême pour créer la gastrula une structure comprenant les trois couches germinales qui donneront après différentiation différents organes lors du développement. Le repliement de la blastula requiert la contraction du cytosquelette d'actomyosine, ainsi que la phosphorylation en Y654 de la β-caténine par Src. Pour reproduire les contraintes mécaniques subies naturellement par l'embryon, les auteurs de Brunet et al. ont introduit des nanoparticules magnétiques encapsulées dans des liposomes, dans l'embryon soumis ensuite à un microaimant. Ainsi, en l'absence de contractilité endogène de l'actomyosine, l'accumulation nucléaire de la βcaténine et son activité de transcription peuvent être retrouvées en induisant une compression exogène avec ces nanoparticules magnétiques (Figure 42.b et d.). La phosphorylation de la β-caténine est elle aussi induite après stimulation mécanique, et n'est pas possible lorsque l'embryon est traité avec un inhibiteur de Src (Brunet et al., 2013).



Figure 42 – a) Marquage de la 6-caténine dans les embryons de Drosophile au stade 5 où elle est principalement membranaire, puis au stade 7 après extension du feuillet où on la retrouve au noyau. Lorsque l'embryon est ablaté et qu'il n'y a plus d'extension, aucun marquage nucléaire de la 6-caténine n'est observé. Lorsque l'embryon est ablaté et on applique une force avec un fluide magnétique, le marquage nucléaire de la 6-caténine est de nouveau présent. Ce marquage n'est plus observé dans les embryons siRNA Src. Le niveau de 6-caténine nucléaire dans les 4 conditions est représenté sur le graphe de droite. b) Marquage de la 6-caténine dans l'embryon de poisson zèbre au stade sphérique de la blastula où la 6caténine est principalement membranaire, et puis au stade suivant où la 6-caténine se trouve au noyau. Lorsque ce stade est traité avec de la blebbistatine, la 6-caténine n'est plus présente dans le noyau. Le marquage peut être retrouvé chez les embryons traités avec la blebbistatine et stimulé magnétiquement avec des billes. Le marquage est cependant perdu lorsque l'embryon est traité avec un inhibiteur de Src. Le niveau de 6-caténine nucléaire dans les 4 conditions est représenté sur le graphe de droite. c) Marquage de la 6-caténine phosphorylée en Y667 au stade 5 avec ou sans compression magnétique dans les embryons normaux ou siRNA pour Src. d) Marquage de la β -caténine phosphorylée en Y667 dans l'embryon de poisson zèbre avant et après déformation de la blastula, dans la blastula traitée avec la blebbistatine avec ou sans stimulation magnétique, avec ou sans inhibiteur de Src. (Adapté de Desprat et al. 2008 et Brunet et al. 2013.)

Outre les forces mécaniques développées lors du développement embryonnaire, plusieurs études sur la mécanotransduction des os ont montré que la voie de signalisation β -caténine est activée en réponse à une stimulation mécanique (Arnsdorf et al., 2009; Case et al., 2008; Hens et al., 2005; Kahn et al., 2009; Lara-Castillo et al., 2015; Norvell et al., 2004; Robinson et al., 2006; Santos et al., 2010; Sen et al., 2008; Sen et al., 2009; Sen et al., 2011a). Plusieurs types de stimulations mécaniques ont été utilisés pour mettre en évidence le rôle de la β -caténine dans la mécanotransduction osseuse.

Notamment, la contraction des muscles est fondamentale pour maintenir la différentiation des cellules formant les articulations. Cette modulation du destin cellulaire qui prévient la différentiation directe en chondrocytes dans les régions des articulations, est médiée par les gènes dépendants de la β-caténine. L'activation nucléaire de la β-caténine dépend de l'état de contraction musculaire, et est complètement inhibée dans les régions où il n'y a pas de contractions musculaires (Kahn et al., 2009). Pour des cellules en culture mises sous tension grâce à un système de traction, la déformation mécanique conduit à une activation de la voie β -caténine et sa localisation nucléaire pour différents types cellulaires tels que les chondrocytes, les osteoblastes et osteocytes (Hens et al., 2005). De même, l'étirement mécanique du substrat de cellules souches mésenchymateuses MSC conduit à leur différenciation grâce à l'accumulation nucléaire de la β-caténine (Figure 43.a). Cette voie de signalisation sur les MSC a été étudiée notamment par l'équipe de J. Rubin (Case et al., 2008; Sen et al., 2008; Sen et al., 2009; Sen et al., 2011a) et même si les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de cette activation ne sont pas encore bien compris, ils impliqueraient l'activation mécanique de la phosphoinositide 3-kinase PI3K, des kinases Akt et FAK, et l'inhibition de GSK3β (Lara-Castillo et al., 2015; Sen et al., 2011a). Ces résultats sur l'application de forces mécaniques activant la voie de signalisation β -caténine ont été également confirmés in vivo chez les souris et sur des cellules en culture étirées dans une autre étude (Robinson et al., 2006).

De même, l'utilisation de flux oscillant pour stimuler les MSC permet une inactivation de la kinase GSK3 β qui diminue la dégradation de la β -caténine alors stabilisée, et l'activation de la transcription des gènes dépendants (Figure 43.b) (Norvell et al., 2004). Plus tard, il a été montré que l'application d'un flux pulsatile sur les ostéocytes conduit à une accumulation de la quantité totale de β -caténine, et à l'activation de la transcription des gènes, et ces effets sont annulés lors de l'inhibition de FAK ou de la phosphoinositide 3-kinase PI3K (Santos et al., 2010). L'activation de la transcription des gènes dépendants de la β -caténine est aussi observée lors de l'application d'un flux aux cellules souches mésenchymateuses C3H10T1, mais dans ce cas la dégradation de la β -caténine n'est pas diminuée, et la transcription des gènes dépend de RhoA et de la N-cadhérine (Arnsdorf et al., 2009).



Figure 43 – a) Exemple de l'accumulation de la β -caténine dans les cellules MSC en culture après 3 jours d'application d'étirement. (Issu de Ben Sen et al. 2008). b) A droite : marquage par immunofluorescence de la β -caténine dans les cellules MC3T3-E1 ostéoblastes après 1 heure en condition statique et 1 heure sous un flux FSS laminaire de 10dynes/cm². A gauche : Rapporteur de l'activité de transcription de la β -caténine avec ou sans flux FSS grâce au reporteur TOP flash. (Adapté de SM Norvell et al. 2004).

D'autre part, l'activation mécanique de la voie de signalisation β -caténine peut être observée dans des contextes pathologiques. Les auteurs de (Armstrong and Esser, 2005) ont mis en évidence l'activation transcriptionnelle de la voie β -caténine, et son accumulation nucléaire qui ne dépend pas de GSK3 β , lors de l'induction mécanique d'une dystrophie musculaire. De même, le rôle de l'induction mécanique de la β caténine s'avère important dans certaines cellules cancéreuses (Avvisato et al., 2007; Fernández-Sánchez et al., 2015; Whitehead et al., 2008)). La pression mécanique associée à la croissance de la tumeur sur les tissus adjacents peut être responsable de l'activation mécanique de la voie de signalisation β -caténine (Whitehead et al., 2008). La déformation mécanique des explants issus du colon de souris APC déficientes conduit à une expression des gènes dépendants de la β -caténine, une accumulation nucléaire de la β -caténine et la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β-caténine. Ces trois conséquences de la stimulation mécanique sont bloquées lorsque les kinases de la famille de Src sont inhibées mais ne sont néanmoins pas la conséquence directe de la stimulation de Src. D'autre part pour les explants issus de souris saines, la stimulation mécanique ne suffit pas, très certainement car la dégradation de la β-caténine par le complexe Axine-APC est trop importante. Cette première étude a été approfondie dans Fernández-Sánchez et al. 2015, où une pression mécanique exercée par la tumeur, sur les tissus sains alentour, chez les souris n'exprimant plus APC, déclenche une hyper-prolifération de ces cellules. Les auteurs ont pu reproduire l'effet de cette pression en injectant des liposomes ultra-magnétiques dans les cellules mésenchymateuses adjacentes aux cellules de la crypte du colon. La stimulation avec un aimant induit une activation rapide de la kinase Ret, la phosphorylation en Y654 de la βcaténine, et après 15 jours va permettre l'accumulation nucléaire de la β -caténine, augmenter la transcription des gènes dépendants de la β-caténine et former de nouvelles tumeurs.

Dans une autre étude où la stimulation mécanique est moins directe, Samuel et al. ont mis en évidence le rôle mécanique de la β -caténine dans un contexte de croissance tumorale (Samuel et al., 2011). En effet, ils ont montré que l'activation de ROCK dans la peau de souris augmente la rigidité du tissu, et que la β -caténine est stabilisée dans le cytoplasme sous cette activation, ce qui conduit à une accumulation nucléaire de celle-ci, une activation de la transcription des gènes correspondants et une hyper prolifération des cellules. Cette activation de la β -caténine dans ce contexte n'est plus possible lors de l'inhibition de la contraction du cytosquelette d'actine, ou de l'inhibition de FAK. Le rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine n'a pas été étudié dans le contexte de la voie de signalisation β -caténine à l'exception de cette étude et d'une autre menée sur les kératinocytes (Hirata et al., 2017; Samuel et al., 2011). Chez les kératinocytes, l'activité du cytosquelette

d'actomyosine organisé en câbles d'actine radiaux dans les cellules confluentes, prévient la localisation nucléaire de la β -caténine et la prolifération des cellules (Hirata et al., 2017). Lorsque cette organisation est perturbée en réduisant l'expression de l' α -caténine, la β -caténine n'est plus aussi présente aux jonctions apicales et la prolifération est augmentée. De même, un traitement avec la blebbistatine qui inhibe les moteurs de myosines conduit à une accumulation de β -caténine au noyau. Inversement, quand l'activité de RhoA est renforcée, ou qu'une force est appliquée sur les E-cadhérines grâce à des billes magnétiques pour les cellules traitées avec de la blebbistatine, la β -caténine est recrutée aux contacts et la prolifération est réduite. On peut d'ailleurs noter que ce n'est pas ce qui est observé sur les embryons de poisson zèbre, traités avec la blebbistatine, qui ne présentent pas d'accumulation nucléaire de β -caténine (Brunet et al., 2013), mais dont la compression du tissu malgré le traitement avec la blebbistatine conduit à une accumulation nucléaire de β caténine. Il serait intéressant de pouvoir comprendre comment les forces sont transmises au sein des cellules pour comprendre l'origine de ces différences.

Dans un tout autre contexte, on peut citer les études faites sur des surfaces nanostructurées de polytéréphtalate d'éthylène (PET) de périodicité 1.5μm sur 300nm de hauteur, qui conduisent aussi à une accumulation nucléaire de la β-caténine et une activation des gènes correspondants (Schernthaner et al., 2012).

Finalement, plus récemment sur les cellules MDCK, il a été montré que l'application d'un étirement bidirectionnel sur une monocouche confluente peut également conduire à une augmentation de la β -caténine nucléaire et de la progression du cycle cellulaire (Figure 44.a) (Benham-Pyle et al., 2015). Cette augmentation du signal nucléaire de la β -caténine nécessite l'intégrité des adhésions cellule-cellule puisque une version tronquée de la E-cadhérine sans sa partie extracellulaire bloque l'augmentation nucléaire de la β -caténine. De plus, cette stimulation mécanique des cellules nécessite l'activité de la kinase Src, et conduit à l'augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β -caténine (Figure 44.b) (Benham-Pyle et al., 2016).



Figure 44 – a) Images représentatives de la localisation de β -caténine-GFP (en haut) et de TOPdGFP (bas) avec ou sans étirement de 15% de la monocouche pendant 16 heures. (Issu de Benham-Pyle et al. 2015) b) Images représentatives de la localisation de β -caténine-GFP, de la β -caténine phosphorylée en Y654 avec ou sans inhibiteur de Src, avec ou sans étirement de 15% pendant 8 heures. (Adapté de Benham-Pyle et al. 2016).

La Table 6 en Annexe regroupe l'ensemble de ces stimulations mécaniques susceptibles de modifier la signalisation β -caténine sous forme de tableau en fonction des différentes démonstrations : activation de la transcription des gènes dépendant de la β -caténine, présence nucléaire de la β -caténine, état de phosphorylation de la β -caténine, dépendance de Src.

En définitive, il a été mis en évidence que les contraintes mécaniques peuvent contribuer à l'activation de voies de signalisation comme celle de la β -caténine qui régule la croissance, l'invasion, la division ou la différenciation des cellules. Néanmoins, comment la force mécanique est impliquée au niveau des jonctions adhérentes est loin d'être compris, ni même comment les forces appliquées sur les tissus ou les cellules sont transmises au niveau moléculaire. De même, les mécanismes conduisant à l'accumulation nucléaire de la β -caténine n'ont pas encore été adressés en détails, et notamment la translocation de la β -caténine membranaire au noyau n'a pas encore été prouvée.

2.4. Modèle de la mécanotransduction des cadhérines dans le contrôle de la signalisation β-caténine

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que l'activation de la signalisation β -caténine peut avoir lieu à la suite d'une stimulation biochimique mais également mécanique.

Dans les cellules épithéliales, la β -caténine interagit avec la E-cadhérine et cette interaction a pour conséquence de séquestrer la β -caténine aux jonctions adhérentes. Le rôle des E-cadhérines dans la signalisation β -caténine est sûrement plus complexe qu'une simple séquestration puisqu'il a été mis en évidence que les E-cadhérines sont parfois nécessaires pour l'activation de la voie de signalisation (Benham-Pyle et al., 2015; Gottardi and Gumbiner, 2004; Howard et al., 2011). Néanmoins, dans un contexte où la stimulation mécanique est indépendante de Wnt, et où la β -caténine se trouve majoritairement au niveau de la membrane avec les E-cadhérines, pouvoir perturber cette interaction au niveau des jonctions, et l'affaiblir afin de relarguer la β -caténine de la membrane et la libérer dans le cytoplasme et dans le noyau, apparait comme un moyen d'activer la voie de signalisation β -caténine.

Les équipes d'Emmanuel Farge et James W. Nelson ont toutes deux montré, dans des systèmes différents, que la kinase Src était nécessaire pour permettre l'accumulation nucléaire de la β -caténine par stimulation mécanique. Ils ont également montré que la forme phosphorylée en tyrosine 654 de la β -caténine était plus présente lors de leurs stimulations mécaniques. *In vitro* il a été montré que l'affinité entre la β -caténine et la E-cadhérine pouvait être modulée par cette tyrosine (Roura et al., 1999).

Il émerge de ces différentes études un modèle attractif où l'induction mécanique de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine pourrait être le résultat de la translocation des jonctions adhérentes au noyau de la β -caténine. Sous stimulation mécanique, la kinase Src peut phosphoryler en Y654 la β -caténine présente à la membrane avec la E-cadhérine, ainsi diminuer son interaction avec la E-cadhérine. La β -caténine est donc libérée des E-cadhérines à la membrane, libre et en excès dans le cytoplasme et se retrouve au noyau où elle peut activer la transcription de certains gènes.

Néanmoins, il reste plusieurs zones d'ombres à ce modèle pour expliquer leurs observations et le généraliser à d'autres systèmes. On peut notamment revenir sur (1) la translocation de la β -caténine, (2) le rôle de la dégradation, (3) le rôle de la kinase Src, (4) le rôle de la phosphorylation de la β -caténine.

(1) Premièrement, aucune preuve de la translocation de la membrane au noyau de la β-caténine n'a été directement apportée. Ce n'est donc pour l'instant qu'une supposition que la β-caténine active au noyau soit celle qui ait été à la membrane. Cette hypothèse de translocation de la membrane au noyau n'a jamais été

vérifiée, et est très souvent considérée comme acquise dans la littérature. La β-caténine du noyau pourrait provenir du réservoir membranaire, mais aussi de la β-caténine nouvellement synthétisée sans qu'elle ne passe à la membrane.

(2) De plus, le rôle de la dégradation de la β -caténine n'est pas forcément discuté. En fonction des systèmes étudiés, il a été montré que pour avoir une activation mécanique de la β -caténine, il est essentiel que le niveau de dégradation de la β -caténine soit faible. C'est notamment le cas chez l'embryon de *Drosophile* où au stade de développement sur lequel a travaillé l'équipe d'E. Farge le complexe APC est très peu exprimé (Hayashi et al., 1997) ou encore chez les cellules cancéreuses issus du colon de souris qui n'expriment plus APC (Fodde and Brabletz, 2007; Smits et al., 2000; Whitehead et al., 2008). En revanche, dans les cellules MDCK, le niveau de dégradation n'a pas été évalué avec ou sans stimulation mécanique. Mais celui-ci semble permissif à la translocation nucléaire sous étirement. Et, il a été montré qu'en prévenant la dégradation de la β -caténine, il est possible d'induire une accumulation de β -caténine sans perturbation mécanique (Benham-Pyle et al., 2016).

(3) D'autre part, le rôle des kinases Src n'est pas forcément le même selon les systèmes. Cette potentielle fonction différente de Src sous perturbation mécanique a déjà été mise en évidence. En effet, l'activité kinase de Src est directement sur-activée sous la perturbation mécanique lors de la stimulation avec des billes magnétiques de fibronectine sur les cellules HUVECS (Wang et al., 2005), mais ne l'est pas lors de la stimulation avec des billes magnétiques se liant aux E-cadhérines, contrairement à la kinase PI3K (Muhamed et al., 2016). De même, l'activité de Src n'est que permissive lors du dépliement et de la phosphorylation de p130cas en étirant les cellules HEK293 (Sawada et al., 2006). Ici, lorsque les cellules MDCK sont étirées, les auteurs de Benham Pyle et al. 2016 (sans preuve directement publiée dans l'article, mais communiquée) suggèrent que l'activité de Src est déclenchée mécaniquement, alors que dans l'embryon de Drosophile ou de poisson zèbre, Src est constitutivement actif et permissif (Brunet et al., 2013). D'autre part, dans d'autres systèmes, comme dans le colon de souris c'est la kinase RET qui s'active sous la stimulation mécanique (Fernández-Sánchez et al., 2015), et dans les études menées sur les cellules osseuses la stimulation dépend d'autres kinases comme FAK (Lara-Castillo et al., 2015; Santos et al., 2010). Ceci suggère que potentiellement Src n'est pas l'effecteur premier de la stimulation mécanique, et pose la question de son rôle dans le complexe E-cadhérine/ β -caténine. Pour justifier le rôle constitutivement actif de Src, on peut imaginer que Src phosphoryle la tyrosine 654 de la β -caténine à la suite d'un changement de conformation dans le complexe E-cadhérine/ β -caténine. Ce changement de conformation, indépendant de Src, mais dépendant de la perturbation mécanique, permettrait de rendre plus accessible le site de la tyrosine 654 et une meilleure interaction de la kinase Src avec la β caténine pour la phosphoryler. Pour cela, il faut imaginer qu'une autre contribution soit nécessaire pour ouvrir ce site à la phosphorylation : l'interaction avec une nouvelle protéine non connue, un rôle direct de la force supportée par le complexe, ou une réorganisation du cytosquelette...

(4) De plus, la phosphorylation de la tyrosine 654 sur la β -caténine permet de diminuer son affinité avec la E-cadhérine *in vitro* (Roura et al., 1999) et aussi dans les cellules (Bonvini et al., 2001; Jean et al., 2009; Roura et al., 1999; van Veelen et al., 2011; Zeng et al., 2006). Mais on peut se demander si, dans tous les systèmes, ce site est vraiment suffisant à lui seul pour conduire à la dissociation du complexe E-cadhérine/ β -caténine à la membrane et activer la transcription des gènes dans le noyau des cellules. Nous avons discuté ce point dans le paragraphe précédent 2.3 en mettant en lumière notamment des articles où l'utilisant de mutant non phosphorylable de cette tyrosine (Y654F ou Y142F) peut quand même activer la voie de signalisation (Hoffmans and Basler, 2007; Murase et al., 2002; Zeng et al., 2006), et où le mutant mimant la phosphorylation (Y654E) ne peut pas l'activer à lui seul (Tominaga et al., 2008; van Veelen et al., 2011).

2.5. Questions | Nos objectifs et notre stratégie

Dans ce travail de thèse nous avons voulu analyser la possible implication mécanique des E-cadhérines dans la régulation de la signalisation β -caténine dans les cellules épithéliales MDCK en culture. Nous avons vu que l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et sa localisation nucléaire pouvait être activée par des perturbations mécaniques directes telles que l'application de contraintes de compression, d'étirement, de cisaillement, à l'échelle des cellules et des tissus, mais également lors de la migration des cellules induite par EMT. Il a également été démontré que les E-cadhérines des jonctions adhérentes sont sous tension générée par le cytosquelette d'actomyosine.

Dès lors, nous avons émis l'hypothèse qu'un lien entre l'activation mécanique de la voie de signalisation β caténine et les forces mises en jeu au niveau des E-cadhérines pouvait exister.

Le modèle émergeant des observations préalables, décrites dans le paragraphe précédent, repose sur une diminution de l'affinité de la β -caténine avec la E-cadhérine au niveau de la membrane à la suite de la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β -caténine par la kinase Src, qui conduirait à sa dissociation de la E-cadhérine, puis à sa translocation dans le noyau, lors de la perturbation mécanique.

Dans cette thèse, nous souhaitons analyser le rôle des E-cadhérines dans l'induction mécanique de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine. Pour cela, nous avons cherché à savoir:

- s'il existe des perturbations qui modifient à la fois la tension exercée sur les E-cadhérines et la signalisation β-caténine,
- (2) si la β-caténine présente à la membrane peut réellement contribuer de manière quantitative à l'accumulation nucléaire de la β-caténine,
- (3) quels sont les partenaires moléculaires de la mécanotransduction des E-cadhérines dans la modulation de la signalisation β-caténine et comment agissent-ils.



Figure 45 – Modèle et Questions

Afin de répondre à l'objectif (1), nous nous sommes intéressés à l'induction de l'EMT. En effet, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'EMT sont nombreux, complexes, et en partie incompris, mais ils interviennent dans de nombreuses situations telles que la morphogénèse (gastrulation, migration des cellules germinales le long de la ligne latérale), la différentiation des cellules souches lors de l'organogénèse, le maintien de
l'homéostasie du tissus (régénération, inflammation, cicatrisation) ou le développement de certaines maladies (cancers, métastases). Ces différents types d'EMT ne reposent pas toujours sur les mêmes mécanismes moléculaires mais permettent le passage des cellules épithéliales organisées en feuillets cohésifs en cellules plus motiles, soit toujours cohésives entre elles dans le cas de transition partielle (cicatrisation), soit en cellules mésenchymales isolées dans le cas où la transition est totale. Nous nous sommes concentrés sur deux stimulations qui induisent la migration des cellules épithéliales. La première possibilité est de convertir les cellules épithéliales MDCK en cellules fibroblastiques plus motiles suite à l'ajout de facteur de croissance tel que HGF sur les cellules (Stoker et al., 1987; Weidner et al., 1991). La seconde repose sur le phénomène de migration collective des cellules épithéliales à la suite de la blessure d'une monocouche, où elles subissent une EMT partielle (Revenu and Gilmour, 2009). Ces deux stimulations induisant la migration des cellules épithéliales ont en commun des voies de signalisation activant les protéines Rho-GTPases (Rho, Rac, Cdc42...), ainsi que la famille des tyrosines kinases Src, qui ont alors comme fonction de réorganiser le cytosquelette et les jonctions adhérentes, ainsi que de former des protrusions cytoplasmiques comme les lamellipodes.

Dans un premier temps, nous avons donc cherché à savoir si lors de ces deux perturbations sur les cellules MDCK la tension des E-cadhérines changeait, et si la signalisation β -caténine pouvait s'activer. En effet, le facteur de croissance HGF est connu pour induire l'activation de la transcription des gènes dépendants de la β -caténine pour les cellules MDCK (Howard et al., 2011), mais surtout dans d'autres cellules (Apte et al., 2006; David et al., 2008; Liou et al., 2002; Matteucci et al., 2006; Monga et al., 2002; Müller, 2002; Papkoff and Aikawa, 1998; Purcell et al., 2011; Rasola et al., 2007; Soldati et al., 2008; Zeng et al., 2006). Mais bien qu'un changement d'organisation des jonctions E-cadhérines ait été mis en évidence sous HGF (Balkovetz and Sambandam, 1999; De Rooij et al., 2005; Jang et al., 2017; Le Duc et al., 2010; Maruthamuthu and Gardel, 2014), rien n'est connu sur l'état mécanique des E-cadhérines. De même, bien que moins documentée, lors la migration des cellules après blessure de la peau de souris, il a été montré que la β -caténine se retrouve dans le noyau de certains cellules mésenchymateuses où elle active les gènes responsables de la prolifération au front de migration (Amini-Nik et al., 2014; Cheon et al., 2002; Zhang et al., 2009). Il a également été montré que chez le poisson zèbre, lors de la migration des cellules le long de la ligne latérale du primordium, la voie de signalisation β -caténine est activée dans les cellules leaders et coordonne la migration (Aman and Piotrowski, 2008).

L'objectif (2) est de déterminer si la β -caténine présente à la membrane contribue de manière significative à l'accumulation nucléaire de celle-ci. Jusqu'à présent cette hypothèse n'a pas été validée expérimentalement. En effet, le modèle suggère que puisque la kinase Src a été montrée comme nécessaire pour l'activation mécanique de la β -caténine et qu'elle peut phosphoryler la β -caténine sur la tyrosine Y654, l'hypothèse la plus directe est que le rôle de Src soit de dissocier le complexe E-cadhérine/ β -caténine. Ainsi cela conduirait à la libération de la β -caténine de la membrane, et cette β -caténine membranaire pourrait alors aller dans le noyau des cellules. Néanmoins la translocation n'a pas été mise en évidence. Le seul article ayant essayé de le faire n'est clairement pas convainquant malgré l'utilisation de l'outil adéquat avec une β -caténine photoactivable (néanmoins tronquée dans sa partie N-terminale et non dégradable). La quantification en rapportant la variation du signal de la membrane et du noyau dans le même ratio ne permet pas de conclure (Kam and Quaranta, 2009).

Notre objectif (3) est de déterminer si les kinases Src sont impliquées également lors des deux stimulations que nous avons choisies d'étudier. Si oui, comment ? La cible de Src dans le modèle précédent semble être la β-caténine, nous chercherons également à savoir si c'est le cas dans notre système ou si la cible est ailleurs. Il est également important de déterminer si Src est le premier acteur nécessaire à la perturbation, ou si son rôle

n'est que permissif. Dans ce dernier cas, cela implique la présence d'autres facteurs nécessaires au départ de la β-caténine des contacts.

Nous essayerons donc d'apporter une nouvelle lumière à ce mécanisme et intégrer dans le nouveau modèle le rôle de la tension es E-cadhérines.

Objectifs de la thèse :

Les cellules épithéliales adhèrent les unes aux autres via les E-cadhérines, molécules transmembranaires qui assurent le lien avec le cytosquelette d'actine par notamment l'intermédiaire de la β -caténine. La E-cadhérine est une protéine qui est effectivement sous tension par le cytosquelette d'actomyosine. La β -caténine, elle, est aussi un cofacteur de transcription : elle se peut se trouver dans le noyau où elle régule des gènes impliqués dans une large gamme d'activités physiologiques et pathologiques. De plus, la voie de signalisation β -caténine peut être activée mécaniquement. Dans cette thèse, nous nous intéressons au rôle de la tension des E-cadhérines sur l'activation mécanique de la voie β -caténine lors de la migration des cellules épithéliales, et nous essayerons de répondre aux questions suivantes :

(1) Est-ce que la tension exercée sur les E-cadhérines est impliquée dans la localisation de la β -caténine.

(2) Est-ce que l'accumulation de β -caténine nucléaire vient effectivement de la membrane ?

(3) Est-ce que la kinase Src est impliquée dans ce mécanisme ? Comment ? Est-ce que sa cible est directement la β -caténine ?

(4) Y-a-t-il d'autres acteurs moléculaires essentiels ?

Méthodes et Démarches expérimentales

Sommaire

3.1.	Овје	T D'ETUDE : LES CELLULES EPITHELIALES COMME SYSTEME MODELE	112
3.2.	Ѕтім	IULATIONS ET PERTURBATIONS	113
3.2	.1.	Stimulations extérieures conduisant à la migration des cellules	113
3.2	.2.	Introduction de mutants	114
3.2	.3.	Perturbations pharmacologiques	115
3.3.	Мет	HODES D'OBSERVATION	115
3.3	.1.	Observer la localisation et la dynamique des protéines	115
3	8.3.1.1.	Imagerie en cellules vivantes	116
3	3.3.1.2.	FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	116
3	3.3.1.3.	Photoconversion	118
3	3.3.1.4.	Immunofluorescence	120
3.3	.2.	Mesurer des forces	120
3	3.3.2.1.	Généralité sur la microscopie des forces moléculaires grâce au FRET	120
3	3.3.2.2.	Acquisition	124
3	.3.2.3.	Analyse	125
3.3	.3.	Mesurer une activité biochimique	127
3	3.3.3.1.	Rapporteur des gènes : TOPdGFP	127
3	3.3.3.2.	Senseurs d'activité kinase en cellules vivantes	128
3	.3.3.3.	Quantification des phosphorylations par anticorps	131
3.4.	ΑΝΑ	LYSES STATISTIQUES DES EXPERIENCES	133

3. Méthodes et Démarches expérimentales

Le propos de ce chapitre est de décrire les cellules choisies, les stimulations, ainsi que les différents instruments et techniques d'étude utilisés dans ce travail de thèse. Notre approche est essentiellement basée sur l'observation des cellules vivantes par des méthodes d'imagerie, combinée à des manipulations pharmacologiques et génétiques de protéines d'intérêt.

3.1. Objet d'étude : les cellules épithéliales comme système modèle

Ce travail de thèse a exclusivement porté sur l'étude des cellules épithéliales MDCK II qui proviennent du tube distal de l'épithélium du rein de *Canis familiaris*. Elles sont très souvent utilisées *in vitro* comme modèle. Ces cellules forment des monocouches cellulaires polarisées de manière apico-basale à confluence (Hartsock and Nelson, 2008). A basse densité elles se trouvent sous forme d'agrégats de cellules bien étalées sur la surface, plutôt plates avec une activité notable de « ruffling ». A mesure que les cellules se divisent (~16h) et que la densité augmente, elles deviennent de plus en plus hautes et moins étalées jusqu'à confluence (Dukes et al., 2011).

Brièvement, les cellules MDCK sont cultivées dans un milieu DMEM 1g/L de glucose supplémenté à 0.5% ou 10% de FBS à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂. Elles sont passées tous les 3 jours. Les lignées MDCK GFP-β-caténine, E-cadhérine-GFP nous ont été données par W.J. Nelson, celle MDCK TOPdGFP par C. Gottardi, et les MDCK EcadTSMod par N. Borghi.

Afin d'avoir les nouveaux outils nécessaires pour tester nos différentes hypothèses, nous avons créé de nouveaux plasmides et lignées exprimant nos protéines d'intérêt à partir de transfection transitoire avec les transfectants Turbofect, Lipofectamine200 ou Genecellin. Après transfection, les différentes lignées ont été cultivées avec 400mM de G418 pendant environ 15 jours, puis sélectionnées par FACS en une, ou plusieurs populations selon leur profil de fluorescence. Notamment, les cellules exprimant la β -caténine ont été sélectionnées à partir de clones qui exprimaient de bas niveaux de fluorescence pour éviter tout artefact caractérisé par une surexpression de la β -caténine dans le noyau et le cytoplasme. Nous avons donc sélectionné les nouvelles lignées MDCK E- α -TSMod, EcadTSMod Δ Cyto, mMaple- β -caténine, Kras-Src Senseur, Lyn-FAK senseur, FAK-GFP, VinTSMod, VinTL et les mutants GFP- β -caténine Y654 \rightarrow F et E, EcadTSMod Y754-Y755-Y756 \rightarrow FFF, Kras-Src Senseur YY \rightarrow FF, qui sont maintenues sous 200mM de G418.

Toutes les expériences où l'observation des cellules vivantes a été réalisée avec un microscope à fluorescence ont été faites avec un milieu d'observation spécifique (DMEM F12 : PAA Cat. No. T15-159 ne contenant pas de rouge de phénol, pas de vitamine B12, pas de riboflavine ou DMEM FluoroBrite) supplémenté avec 20 mM de tampon Hepes, 2.5mM de L-glutamine, 1U/mL de pénicilline/streptomycine et 10% ou 0,5% de FBS. Pour l'observation, les cellules sont cultivées 24h avant sur des lamelles de verre incubées préalablement avec 50µg/mL de collagène humain de type IV.

3.2. Stimulations et Perturbations

3.2.1. Stimulations extérieures conduisant à la migration des cellules

Nous avons choisi de nous concentrer principalement sur deux perturbations, le but étant d'induire la migration des cellules MDCK. L'ajout de facteur de croissance et la migration collective des cellules après blessure sont deux facteurs connus pour induire une transition épithélio-mésenchymateuse, au moins partiellement (Thiery and Sleeman, 2006).

Nous avons dans un premier temps utilisé un facteur de croissance, HGF, qui est connu pour induire l'étalement, la dispersion et la migration des îlots de cellules MDCK (De Rooij et al., 2005) et l'activation des gènes dépendant de LEF-1/TCF (Howard et al., 2011). Pour cela, les cellules sont ensemencées à basse densité (~200 000 cellules/lamelle ø32mm) pour avoir des ilots d'une vingtaine de cellules lors de la stimulation avec HGF. Les cellules, préalablement cultivées pendant 6 à 12h avec un milieu avec juste 0.5% de FBS, sont traitées avec une concentration finale de 50 ou 100 ng/mL d'HGF (Figure 46.a).

Dans un second temps, nous avons voulu observer la migration collective des cellules épithéliales au cours de la cicatrisation de blessures modèles. En effet, nous avons observé que les cellules d'une monocouche, après avoir libéré une surface libre à envahir, ou lors de la cicatrisation d'une blessure, migrent collectivement. A l'avant du front de migration, certaines cellules ont un phénotype particulier caractérisé par un large lamellipode très actif, une grande surface d'étalement, on les appelle cellule leaders (Omelchenko et al., 2003)(Figure 46.b).



Figure 46 – Cellules MDCK en migration a) sous HGF et b) lors de la migration collective de l'épithélium après libération d'une nouvelle surface. Insert Zoom : apparition de cellule leader (rouge). Echelle = HGF 20µm / Blessure 100µm.

Pour effectuer ce type blessure, les cellules sont ensemencées à confluence la veille (~2 millions cellules/lamelle Ø32mm) puis après avoir rincé avec du dPBS on utilise un cône de 200 µL pour effectuer manuellement deux blessures perpendiculaires (Figure 47.a). Il existe deux inconvénients majeurs à cette méthode. Premièrement, les cellules à l'endroit de la blessure sont détruites et donc pourraient libérer dans le milieu de nombreux facteurs pouvant modifier le comportement des autres cellules. C'est pourquoi nous rinçons abondamment après la blessure. Le second inconvénient est que la largeur de la blessure n'est pas vraiment contrôlée et reproductible à la dizaine de µm près. Dès lors, nous avons également utilisé des inserts de culture avec deux puits de chez Ibidi (Figure 47.b). Ce système est composé de deux puits de 0,82 cm² où l'on peut déposer la suspension de cellules, séparés par l'insert en silicone biocompatible d'une largeur contrôlée de 500 µm entre les deux puits. Ainsi en enlevant l'insert une fois que les cellules ont adhéré, une nouvelle surface libre est créée, et les cellules peuvent y migrer collectivement.



Figure 47 – a) Schéma d'une blessure avec un cône de pipette en mode « scratch ». b) Schéma d'une blessure par libération d'espace libre avec un stamp de PDMS ou de silicone. Exemple : chambre 2 puits Ibidi.

3.2.2. Introduction de mutants

Afin de mieux comprendre le rôle de certaines protéines, nous avons créé et utilisé des mutants de nos protéines d'intérêt. Nous avons créé des lignées stables à partir des transfections de ces mutants dans nos cellules MDCK. Il faut garder à l'esprit qu'il s'agit donc d'une expression d'une protéine mutante dans un contexte où la protéine endogène est toujours là, mais seul le comportement du mutant sera observé par fluorescence.

Nous avons travaillé notamment avec des mutants de phosphorylations des tyrosines 654 de la β -caténine et 754-755-756 de la E-cadhérine. En effet pour tester si une phosphorylation est essentielle, on peut remplacer l'acide aminé phosphorylable, ici des tyrosines, par une phénylalanine pour mimer une protéine non phosphorylée, ou par un acide glutamique afin de mimer, grâce à la charge négative introduite par l'acide glutamique, une protéine toujours phosphorylée. Nous avons également générer des versions mutantes de la kinase Src. La mutation qui remplace la tyrosine 530 (chez l'humain 527 chez le poulet) par une phénylalanine permet d'ouvrir la kinase et la rendre active. A l'inverse, la mutation de la tyrosine 419 dans la partie kinase de Src inhibe complètement son activité kinase. Nous avons également créé une version d'un senseur d'activité de Src dont les tyrosines du substrat ont été remplacées par des phénylalanine. Cette version est donc insensible à l'activité kinase de Src et sera présentée dans la partie 3.3.3. Ainsi, les plasmides des mutants de la GFP- β -caténine (Y654 \rightarrow E ou F), EcadTSMod (Y754-Y755-Y756 \rightarrow FFF) et mCherry-c-Src (Y530 \rightarrow F), mCherry-c-Src KD Y419F, Kras-Src sensor (Y662 Y664 \rightarrow FF) ont été réalisés à partir du kit Quickchange II XL site-directed mutagenesis sur les plasmides pEGFP-C1 β -caténine (Erin Schuman, Addgene # 16071), EcadTSMod, mCherry c-Src (Michael Davidson, Addgene #55002), mCherry c-Src (Michael Davidson, Addgene #55003) et Kras-Src senseur modifié.

De plus, nous avons créé une version chimère de la E-cadhérine directement liée à l' α -caténine, sans lien avec la β -caténine. Pour cela, la chimère E- α -TSMod a été construite avec le kit In-fusion HD en fusionnant les acides aminées 1 à 180 de EcadTSMod avec les acides aminés 270 à 906 de la pEGFP- α -E-catenin.

	A-cat PCR aa270-906	5' CCTGATGAAATTGGAAAC GGTACC CAGGGTGGCAGTGGCGGAGAG CTGGCATA 3'
Ecad Acat TSmod		5' GTCGCGGCCGCTTTAGTCGACGATGCTGTCCATGGCTTTGAACTCGCTCAGG 3'
LCauAcationiou	EcadTSMod PCR all	5' TTTTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCAT 3'
	except aa810-887	5' TTTGTTTCCAATTTCATCAGGATTGGCAGG 3'

Les différents primers utilisés pour ces mutants sont décrits ci-dessous :

E-cadTSMod Y754-	5' GATGACACCCGGGACAATGTTTTTTTTTTTGATGAAGAAGGAGGTGG 3'
Y755-Y756→ FFF	5' CCACCTCCTTCTTCATCAAAGAAAAAAACATTGTCCCGGGTGTCATC 3'
E-cadGFP Y754-	5' GATGACACCCGGGACAATGTTTTTTTTTTGATGAAGAAGGAGGTGG 3'
Y755-Y756→ FFF	5' CCACCTCCTTCTTCATCAAAGAAAAAAACATTGTCCCGGGTGTCATC 3'
Kras Src sensor Y662	5' CTTGGATGGAGGACTTTGACTTCGTCCACCTACAGGG 3'
Y664→FF	5' CCCTGTAGGTGGACGAAGTCAAAGTCCTCCATCCAAG 3'
mCherry-c-Src	5' CAGAGCCCCAGTTCCAGCCTGGAGAG 3'
Y530F	5' CTCTCCAGGCTGGAACTGGGGCTCTG 3'
mCherry-c-Src KD	5' GAGGACAACGAGTTCACAGCACGGC 3'
Y419F	5' GCCGTGCTGTGAACTCGTTGTCCTC 3'
Beta-catenin GFP	5' CTGCAGCTGCAAATGTTGCAACACCCTCATTCC 3'
Y654F	5' GAATGAGGGTGTTGCAACATTTGCAGCTGCAG 3'
Beta-catenin GFP	5' CCAGGAATGAGGGTGTTGCAACAGARGCAGCTGCAGTGC 3'
Y654E	5' GCACTGCAGCTGCYTCTGTTGCAACACCCTCATTCCTGG 3'

3.2.3. Perturbations pharmacologiques

Lors de nos deux types de stimulations avec le facteur de croissance HGF et lors de la fermeture d'une monocouche de cellules, nous avons également utilisé différents inhibiteurs :

- CytochalasineB à 10μM (Sigma C6762, 10 mg/mL DMSO) qui inhibe la polymérisation de l'actine en se fixant sur les extrémités + des filaments d'actine.
- PP1 à 25μM ou 75μM (Merck Chemicals 567809, 10mM DMSO) pour inhiber les tyrosine-kinases de la famille de Src.
- PF228 à 10μM (Sigma PZ0117, 10mM DMSO) pour inhiber la tyrosine kinase FAK.
- LiCl à 25mM pour inhiber le complexe GSK-3-β et ainsi conduire à une accumulation de β-caténine dans la cellule.
- Dynasore à 100μM (Ab120192, 50mM DMSO) pour inhiber les dynamines et bloquer l'endocytose.
- Y27632 à 50μM (Sigma Y0503, 50mM DMSO) pour inhiber les kinases ROCK.
- CalyculineA à 1nM (sc24000, 20μM DMSO) pour inhiber les phosphatases des sérines et thréonines.

3.3. Méthodes d'observation

La fonction d'une protéine dépend de sa conformation, mais aussi de sa localisation à l'intérieur de la cellule. La microscopie à fluorescence a conduit à de nombreuses avancées dans l'étude des complexes moléculaires. Elle a notamment permis d'étudier leurs associations et dissociations, et de quantifier leurs mouvements. En effet, si les cellules répondent aux sollicitations mécaniques de leur environnement en activant certains gènes ou voies de signalisation, cela implique la présence de protéines qui jouent le rôle de messager et donc de protéines qui changent potentiellement de localisation dans la cellule. C'est notamment le cas de la β -caténine qui est présente à la fois à la membrane et dans le cytoplasme, mais également dans le noyau où elle peut activer certains facteurs de transcription.

3.3.1. Observer la localisation et la dynamique des protéines

Afin de visualiser la β -caténine dans les cellules vivantes, nous avons utilisé la lignée β -caténine-GFP, mais nous avons créé deux nouvelles lignées β -caténine-mMaple et β -caténine-mCherry. Le plasmide mMaple- β -caténine a été généré avec du mMaple cDNA (don de M. Nolmann) et le plasmide de la GFP- β -caténine. Le plasmide mCherry- β -caténine a été généré sur le plasmide pcDNA3.1 à partir de celui de la GFP- β -caténine et mCherry-c-Src. Les primers utilisés sont listés ci-dessous :

Beta-catenin	PCR sur mCherry-c-Src	5' GGACTAGTGNGATCCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3' 5' CGGCATGGACGAGCTGTACAAGatggcaacccaagct 3'
mCherry	PCR sur pEGFP Beta- catenine	5' GACGAGCTGTACAAGatggcaacccaagctgacttg 3' 5' TTTAAACTTAAGCTTGGTACCttacaggtcagtatcgaaccaggcc 3'
Beta-catenin	PCR sur pEGFP Beta- catenine	5' CAGCAGTCATATCTGGACTCT 3' 5' AAACATAATGAGGACCTACAC 3'
mMaple	Ouverture mMaple	

3.3.1.1. Imagerie en cellules vivantes

Afin de localiser la β -caténine à la membrane, dans le cytoplasme ou au noyau, lors de nos stimulations avec HGF et lors de la migration collective des cellules après blessure, les cellules ont été principalement imagées avec microscope plein champs Leica DMI6000, avec un objectif 20x à sec HCX PL Fluotar. Les images de transmission nous ont servi à déterminer le contour de la cellule ou du noyau.

Néanmoins, la visualisation de la GFP ou toute protéine fluorescente ne nous renseigne que sur la localisation de la protéine dans la cellule à un instant donné, mais ne nous permet pas de visualiser sa mobilité directement, ou son transport et sa translocation entre différents compartiments. Pour cela, nous avons utilisé deux autres techniques d'imagerie en fluorescence qui sont le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et la photoconversion. Ces deux techniques ont l'avantage de nous donner des renseignements sur les déplacements de la protéine.

3.3.1.2. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Une technique très utilisée en biologie pour estimer la mobilité d'une molécule fluorescente est de mesurer le retour de fluorescence après photoblanchiment (Fritzsche and Charras, 2015). Le photoblanchiment est le phénomène d'extinction irréversible de l'émission de fluorescence par une molécule après qu'elle ait émis un certain nombre de photons. Seule l'arrivée (par exemple par diffusion) de nouvelles molécules issues de l'extérieur de la zone photoblanchie permettra de récupérer la fluorescence dans la zone noire photoblanchie. Ainsi, cette technique simple permet l'étude dynamique de protéines marquées avec des fluorochromes en cellules vivantes. Les courbes de FRAP informent sur le comportement de la fraction de protéines mobiles dans la zone de photoblanchiment. Indirectement, la fraction immobile peut être estimée lorsqu'un plateau est atteint, et la vitesse de retour de fluorescence permet d'avoir une estimation de la vitesse de transport des molécules dans l'échantillon (Figure 48).



Figure 48 – Représentation schématique théorique d'une expérience typique de FRAP. A t=0 la fluorescence de la zone d'intérêt est photoblanchie, le retour de fluorescence dû aux mouvements des molécules toujours fluorescentes adjacentes est mesuré au cours du temps. Adapté de Fritzsche & Charras 2015.

Dans notre étude, nous avons suivi la dynamique grâce au marquage avec la GFP de la β -caténine et de la Ecadhérine ou de leurs mutants respectifs sous différentes stimulations. Nous avons utilisé un microscope confocal spinning disc Leica DMI6000 équipé d'une caméra EMCCD Photometrics QuantEM et d'un objectif 63x/1.2, afin d'avoir une idée qualitative du comportement moyen d'une population de molécules fluorescentes dans notre zone d'intérêt telle que la membrane, le cytoplasme, ou le noyau. La tête spinning disk Yogogawa CSU22 Roper Scientific permet avec une diode laser à 473 nm (100mW) de photoblanchir (100% de la puissance laser) notre zone d'intérêt. L'acquisition des images se fait avec un laser à 491nm (50mW 30%) toutes les secondes pendant 5 secondes avant le photoblanchiment, puis toutes les secondes pendant 30 secondes, puis toutes les 10 secondes pendant 120, et 30 secondes pendant 400 secondes. Il est important de remarqué néanmoins que sur des temps longs de plusieurs minutes, il peut y avoir une transformation de l'objet observé. Par exemple, la membrane peut se déplacer de la zone photoblanchie, mais également se dilater ou se contracter. Dans ces cas, nous avons choisi d'exclure cette zone d'intérêt car modifier la zone introduit beaucoup d'artefacts.



Figure 49 – Exemple d'expérience de FRAP sur la E-cadhérine GFP à la membrane au niveau d'un contact cellule-cellule. a) Images représentatives d'un îlot de cellules E-cadhérine GFP au cours d'une acquisition lors d'une expérience de FRAP avec en bleu les zones photoblanchies, en jaune la zone de référence non photoblanchie, et en rose le fond de fluorescence. b) Intensité de retour de fluorescence normalisée à 1 pour avant le FRAP pour 20 différents contacts au cours du temps. En

rouge foncée : fit et SEM issu de l'ajustement de l'ensemble des différentes courbes avec un modèle mono-exponentiel. Echelle=20μm.

Après l'acquisition, les images sont analysées avec ImageJ et Matlab. Pour chaque image, on soustrait l'intensité moyenne de fluorescence du fond (zone rose sur la Figure 49.a), puis on corrige l'éventuel photoblanchiment en se servant de la mesure de l'intensité de fluorescence dans une région non photoblanchie dans une autre cellule (zone jaune sur la Figure 49.a), on normalise toutes les courbes avec la moyenne des intensités des points pris avant le photoblanchiment. Pour chaque région photoblanchie, les intensités sont donc corrigées et normalisées de la sorte :

$$F_{b}(t) = F(t) - background(t)$$

$$F_{b,corr}(t) = F_{b}(t) * \frac{F_{ref}(0) - background(0)}{F_{ref}(t) - background(t)}$$

$$F_{b,corr,norm}(t) = \frac{F_{b,corr}(t)}{mean(F_{b,corr}(preFRAP))}$$

On peut alors ajuster l'ensemble des données pour chaque condition avec un modèle de simple exponentielle $F = F_0 + F\tau (1 - exp(-t/\tau))$, où F_0 représente la fluorescence dès le premier point de temps, $F\tau$ la fluorescence de la partie mobile caractérisée par le temps τ . Il faut noter que pour la β -caténine ou la E-cadhérine, la dynamique est telle qu'il faut attendre plusieurs minutes pour atteindre le plateau (Figure 49.b), mais la membrane est un compartiment très dynamique. Il n'est alors pas rare que la zone d'intérêt préalablement photoblanchie se déplace, ou bien se déforme en se dilatant... Dans ces cas, nous avons choisi d'exclure la région de nos analyses. Dans la partie Résultats nous utiliserons principalement le temps de demi retour est $t_{1/2} = \tau . ln2$ pour discuter des différences entre les conditions.

Lors de ce travail, nous avons également utilisé cette technique de FRAP pour avoir accès à un autre type d'information : la synthèse de la β -caténine. En effet, on peut avoir accès au taux de synthèse de la protéine marquée avec une GFP en cette fois ci photoblanchissant toute la cellule. Ainsi le retour de fluorescence est dû à la synthèse de nouvelles protéines. Cette technique permet d'avoir accès de manière quantitative au taux de synthèse d'une protéine à l'échelle de chaque cellule.

3.3.1.3. Photoconversion

Grâce au FRAP, nous pouvons avoir accès à un taux « apparent » d'association de notre protéine dans une région choisie de la cellule. Néanmoins, certaines informations de dynamique peuvent nous manquer pour décrire notre système. En effet, nous n'avons pas accès avec cette technique au taux de dissociation de la protéine, ou encore à la translocation entre différents compartiments, ou bien encore le taux de dégradation de la protéine.

Pour cela, ont été développés de nouveaux fluorochromes. Ces fluorochromes sont dit photoconvertibles c'està-dire qu'une illumination UV peut induire un changement de structure sélectif et irréversible du fluorophore. Il va ainsi, au lieu d'émettre dans le vert, émettre désormais dans le rouge (Figure 50.a). Ces fluorophores permettent ainsi de suivre le devenir d'une sous-population de protéines photoconverties rouges parmi les vertes qui ne seront pas photoconverties.



Figure 50 – Photoconversion avec le fluorophore mMaple. a) Haut : Structure de mMaple avant et après photoconversion dans son êtat vert et puis rouge. Spectres d'excitation (poitillé) et d'émission (plein) de mMaple en vert avant photoconversion et en rouge après photoconvertion. Adapté de A L. McEvoy et al. 2012 b) Images représentatives de la 6-caténine mMaple avant photoconversion (panel du haut) et après photoconversion avec le laser 405nm au niveau des contacts de deux cellules (panel du bas). Echelle=20µm.

Dans notre travail, nous avons choisi le fluorophore mMaple qui dans son état « vert » s'excite à 489nm et émet autour de 505nm, et une fois photoconverti dans son état « rouge » est excité à 566nm et émet autour de 583nm (McEvoy et al., 2012) (Figure 50.a). Dans nos expériences, la photoconversion a été réalisée avec un laser 405nm à 20% de sa puissance laser, avec 20 répétitions pour environ 3.15µs/pixel sur la région sélectionnée pour la photoconversion, avec le microscope confocal Zeiss LSM710 ou 780. Nous avons, ici encore, réalisé deux types d'expériences.

La première consiste à photoconvertir la β -caténine aux contacts membranaires et suivre le devenir du signal rouge (Figure 50.b). Pour cela, les images sont acquises dans le canal vert et rouge toutes les minutes après la photoconversion d'un contact. On a ainsi accès à deux informations. La première est un taux global de dissociation de la β -caténine, qui est définie de la même façon que le taux d'association lors des expériences de FRAP grâce à l'ajustement des courbes de déclin de fluorescence au contact avec un modèle exponentiel. On parlera du temps de demi-vie $t_{\pi} = \tau$.In2 issu de cet ajustement dans la partie Résultats pour comparer les différentes stimulations. Avec ce type d'expérience, nous avons également accès au devenir hors de la membrane de la bête-caténine photoconvertie en rouge, et ainsi suivre l'éventuel changement de compartiment de la β -caténine en fonction de nos conditions.

De plus, de la même sorte que nous avons avec le FRAP sur cellule entière accès au taux de synthèse de la protéine, avec la photoconversion de toute la cellule, on peut suivre le devenir du signal rouge au cours du temps toutes les 20min. Celui-ci va diminuer au cours du temps à mesure que la protéine photoconvertie en rouge va être dégradée. En mesurant le signal rouge au cours du temps, nous pourrons en extraire le taux de dégradation de la β -caténine et son temps de demi-dégradation t_d .

En conclusion avec ces deux techniques nous pouvons avoir accès à des constantes globales concernant la β -caténine :

- $t_{1/2}$ in : temps de demi-vie pour entrer à la membrane / d'association
- $t_{1/2}$ out : temps de demi-vie pour sortir de la membrane / de dissociation
- s : taux de synthèse
- t_d: temps de demi-dégradation

3.3.1.4. Immunofluorescence

Quantification du réseau d'actine : phospho Myosin Light Chain

Pour la visualisation de différentes protéines avec des anticorps spécifiques, les cellules, après être rincées plusieurs fois avec du PBS, sont fixées pendant 10min à 4°C avec une solution de PFA à 4%. Elles sont ensuite perméabilisées en utilisant une solution de PBS contenant 0.5% Triton X100 pendant 5min, puis incubées 5min avec une solution de 50mM de NH₄Cl et bloquées avec une solution de PBS avec 1% de BSA, et 1% de sérum de chèvre et d'âne pendant 30min à température ambiante. Les protéines ciblées sont finalement marquées en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte. Dans ce cas, on utilise un anticorps primaire venant se lier spécifiquement à la protéine d'intérêt pendant 60min à température ambiante. On utilise ensuite un anticorps secondaire polyclonal couplé à un fluorophore ayant une haute affinité pour l'anticorps primaire pendant 45min. Les anticorps utilisés sont les suivants :

- anti β-catenin (ECM Biosciences CM1181),
- anti-myosin light chain phospho S20 pMLC (Abcam ab2480)
- anticorps secondaires Dylight 480 ou 650

L'actine est marquée avec la toxine phalloidin-Alexa550 (Molecular Probes). Ensuite les lamelles avec les cellules sont montées dans un milieu Fluoromount (Sigma) et les acquisitions des images ont été prises sur un microscope confocal LSM780 ou 710 avec un objectif 63x/1.4NA à immersion.

Sous ImageJ, le fond de fluorescence est soustrait des images brutes, puis un seuillage est appliqué autour de 5% de la gamme de 12bits, et les fibres de stress sont comptées manuellement dans chaque cellule. Pour quantifier la densité de phospho-Ser20 MLC, les zones d'intérêt représentant le cortex et au niveau des fibres de stress sont déterminées à partir du marquage de la β -caténine membranaire au niveau des contacts cellule-cellule et du marquage avec la phalloidine en évitant le chevauchement avec le marquage de la β -caténine et le bord libre des îlots cellulaires. La densité en pMLC est définie comme la moyenne de l'intensité du marquage pMLC dans chacune des régions d'intérêt suivantes cortex ou fibre de stress.

3.3.2. Mesurer des forces

L'un des principaux buts de ce travail de thèse est d'approfondir notre connaissance sur la mécanotransduction des E-cadhérines et comprendre comment peut varier la tension des E-cadhérines dans les cellules en migration. Pour cela, notre principal outil est le senseur de force TSMod génétiquement inséré dans la E-cadhérine. Le senseur TSMod a été décrit dans la partie 1.2.1.2 et les résultats obtenus précédemment avec la construction EcadTSMod sont décrits dans la partie 2.1.

Dans ce paragraphe, nous allons tout d'abord revenir sur quelques généralités concernant les mesures de forces moléculaires grâce au FRET, en détaillant le principe du FRET, les différentes techniques de mesure, puis les précautions et calibrations nécessaires avant d'utiliser de tel senseur. Ensuite, nous décrirons la méthode utilisée au laboratoire, applicable à tout senseur FRET de force ou d'activité.

3.3.2.1. Généralité sur la microscopie des forces moléculaires grâce au FRET

Les senseurs de forces moléculaires sont des outils qui permettent de mesurer des forces directement dans les cellules vivantes ou les organismes à l'échelle de la molécule, spécifiquement dans une molécule d'intérêt. Nous avons vu qu'il en existe 6 versions différentes stFRET, TSMod ,sstFRET, HP35, cpstFRET et 12aa.

Techniques instrumentales pour mesurer le FRET

Ces senseurs de force rapportent leur déformation à travers le transfert FRET entre les deux fluorophores. Le FRET est un phénomène de transfert d'énergie non radiatif entre deux dipôles, ici les deux fluorophores. Lorsque le fluorophore donneur est dans son état excité, il peut transférer une partie de son énergie à l'autre fluorophore accepteur. Le taux de transfert d'énergie k_t dépend de l'environnement (*n* index de réfraction) et des propriétés intrinsèques des fluorophores : *J* le chevauchement des spectres d'émission et d'excitation du donneur et de l'accepteur et k_f le taux de fluorescence du donneur. Le taux de transfert FRET dépend de la distance *r* et de l'angle (ou facteur d'orientation κ) entre les deux fluorophores. L'efficacité FRET *E* est donnée par le ratio suivant : $E = \frac{k_t}{k_f + k_{n-r} + k_t}$ avec $k_t \sim n^{-4} J k_f \cdot \frac{\kappa^2}{r^6}$ taux de transfert d'énergie, k_f taux de fluorescence du donneur, k_{n-r} taux de transfert non radiatif de désexcitation.

Quand un fluorophore donneur est excité en présence d'un accepteur, le donneur se désexcite grâce au transfert FRET en plus de sa désexcitation par fluorescence et par les phénomènes non radiatifs. Ainsi son temps de vie de fluorescence est plus court, et son rendement de fluorescence est plus faible que celui du même fluorophore donneur en l'absence d'accepteur. En même temps, le fluorophore accepteur va lui aussi se désexciter. De plus, si le donneur est excité de manière polarisée, l'émission de l'accepteur est plus dépolarisée que l'excitation directe du donneur et de l'accepteur. Ainsi le FRET peut être mesuré avec différentes techniques permettant de mesurer le temps de vie de fluorescence, les ratios d'intensités ou l'anisotropie.

Nous n'allons pas discuter ici en détails des différentes techniques pour mesurer le FRET, mais elles sont décrites dans notre revue brièvement (Gayrard and Borghi, 2016) ou sinon dans cette revue (Jares-Erijman and Jovin, 2003). Nous allons présenter très brièvement la technique que nous avons utilisée lors de ce travail de thèse.

- Mesure par l'intensité de fluorescence

L'efficacité FRET *E* peut également s'écrire en fonction du ratio entre les intensités de fluorescence de l'accepteur et du donneur. En effet, *E* peut s'écrire comme le ratio suivant : $E = \frac{I_{AD}}{I_{AD} + \gamma I_{DA}}$, avec I_{AD} intensité de l'accepteur corrigé du chevauchement des spectres du donneur et de l'accepteur et de l'excitation directe de l'accepteur, I_{DA} celle du donneur en présence de l'accepteur, et le coefficient γ . Ce coefficient γ peut être déterminé par photoblanchiment car $\gamma = \frac{I_{AD}}{I_D - I_{DA}}$ avec I_{AD} corrigée du chevauchement des spectres et évaluation du niveau d'accepteur (en mesurant I_{AA} ie l'émission de l'accepteur après son excitation directe). En pratique, comme les fluorophores dans les senseurs sont dans une stœchiométrie 1:1 il est possible de ne pas corriger le chevauchement des spectres, et la quantité d'accepteur par rapport au donneur. On peut alors mesurer ce que l'on nommera l'index FRET : $\frac{I_{AD}}{I_{AD} + I_{DA}}$ (Figure 51).

Sensitized emission





Nous reviendrons dans les paragraphes suivants 3.3.2.2 et 3.3.2.3 sur la manière dont nous avons analysé le signal FRET dans ce travail de thèse.

Précautions à prendre

Insérer génétiquement le module de force dans la protéine d'intérêt nécessite de vérifier plusieurs points. Par exemple le senseur TSMod nécessite d'insérer environ 60kDa dans la protéine d'intérêt et cela peut affecter sa fonctionnalité. De même la structure de la protéine d'intérêt peut elle-même altérer le repliement du senseur. Il est donc conseiller de vérifier les points suivants :

- la fonctionnalité de la protéine doit être idéalement testée dans une lignée cellulaire ou un organisme dépourvu de protéine endogène dont on peut vérifier la viabilité. Les propriétés de la protéine telles que sa localisation, son renouvellement dans les structures où elle est localisée, ainsi que l'interaction avec ses différents partenaires peuvent être testés.
- la photostabilité des fluorophores donneur et accepteur peut être affectée par l'insertion dans la protéine d'intérêt et peut être vérifiée en mesurant le spectre de chacune des fluorophores seuls.

Afin de confirmer que les potentielles variations de FRET correspondent à un changement de force sur la protéine, plusieurs constructions contrôles peuvent être utiles (Figure 52) :

- le senseur seul,
- un contrôle sans force avec le senseur de force inséré en N ou C terminal de la protéine, ou sur la protéine tronquée, ou encore une protéine dont le site de liaison à l'actine, aux microtubules ou tout autre ancrage connu est muté.
- un contrôle du potentiel FRET intermoléculaire en exprimant dans la cellule à la fois la protéine avec le fluorophore donneur et la même protéine avec le fluorophore accepteur.



Figure 52 – Résumé des différentes constructions utiles. a) Le senseur inséré dans la protéine d'intérêt. b) Constructions contrôles Zéro Force : avec le senseur seul, le senseur dans une protéine tronquée ou muté, ou en C ou N terminus de la protéine qui n'est plus sous tension. c) Construction contrôle pour la fonctionnalité de la protéine et du senseur : protéine avec juste le fluorophore accepteur ou donneur.

Calibration des senseurs

Afin d'estimer la force exercée sur les senseurs, il est important de les calibrer, et de relier le changement de transfert FRET observé à la déformation et à la force appliquée pour observer cette déformation (Figure 53). Pour les senseurs stFRET, sstFREt, cpstFRET, et 12aa, aucune calibration en tant que telle n'a été publiée. Néanmoins, pour mettre en évidence leur sensibilité à la force, les senseurs purifiés stFRET, sstFREt, cpstFRET ont été liés à de simples brins d'ADN de 60 bases d'environ 20nm dont la longueur de persistance est de l'ordre de 1 à 4 nm (Figure 53.a). Ils ont été ensuite incubés avec le brin complémentaire, or la longueur de persistance de l'ADN double brin est de 50 nm, ce qui génère une force de l'ordre de 5 à 7 pN d'après la littérature (Tseng et al., 2009; Zocchi, 2009). La mesure de FRET montre bien une diminution suite à l'hybridation de l'ADN.

En revanche, les senseurs TSMod et HP35 ont été caractérisés en spectroscopie de molécule unique *in vitro* dès leur publication originale grâce à l'application de forces par pinces optiques (Austen et al., 2015; Grashoff et al., 2010). Ces courbes de calibration permettent de relier la force et la mesure de l'efficacité FRET (Figure 53.b et c).



Figure 53 – Calibration des senseurs de force FRET. a) avec l'hybridation d'un brin d'ADN qui exerce sur le senseur entre 5-7pN. b) avec des pinces optiques en exerçant de manière cyclique des forces allant de 0 à 20 pN. c) Schémas théoriques de l'efficacité FRET en fonction de la distance des fluorophores où $R_0^6 \sim n\tau^4/k_f \kappa^2 \tau_0$ et de la distance en fonction de la force pour un ressort de rigidité connue, la combinaison des deux donnant la courbe de calibration entre la force et l'efficacité FRET.

Dès la première utilisation du senseur, les 40 acides aminés du senseur TSMod ont été purifiés avec deux fluorochromes organiques (pour permettre une meilleure photostabilité) et attachés entre une surface et une bille grâce à des brins d'ADN pour pouvoir appliquer des forces quantitatives avec des pinces optiques (Figure 54.a). L'étirement cyclique de la construction avec les pinces optiques a permis de mettre en évidence son caractère réversible lors de l'étirement et la relaxation (Figure 54.b). Le senseur est sensible à des forces allant jusqu'à 7 pN. Le senseur TSMod a été caractérisé un peu plus tard en 2016 avec comme ressort le TSMod avec 40 acides aminés, 25 ou 50 acides aminés (Brenner et al., 2016). Ils ont montré que le senseur se comporte comme un ressort linéaire en raison de sa structure compacte où chaque répétition se déplie sans influencer la répétition suivante (Figure 54.c). Finalement, pour les différentes longueurs de 25, 40, et 50 acides aminés, les senseurs TSMod ont été calibrés entre la force en pN et la mesure d'efficacité FRET (Figure 54.d).



Figure 54 – a) Schéma du montage avec le senseur TSMod purifié avec deux fluorochromes organiques dont une extrémité est reliée d'une part à une surface, et de l'autre à une bille pour la caractérisation spectroscopique en molécules uniques. b) Mesures individuelles lors des cycles d'étirement et de relâchement de l'intensité de Cy3 et Cy5 pour TSMod25, TSMod40 et TSMod50. c) Courbe d'extension en fonction de la force montrant que TSMod se comporte comme un ressort linéaire. d) Efficacité FRET en fonction de la force appliquée pour TSMod25, TSMod40 et TSMod50. (Adapté de Brenner et al., 2016(Brenner et al., 2016)).

La caractérisation en spectroscopie en molécules uniques sur les molécules HP35 et sa version stabilisée HP35st ont été réalisés avant même d'être inséré dans le senseur et dans la taline (Žoldák et al., 2013). Néanmoins, les auteurs de Austen et al. ont, avant de l'insérer dans la taline, confirmé leurs propriétés lorsque les ressorts HP35 et HP35st sont insérés entre les deux fluorophores Ypet et mCherry. Ils ont donc purifié les senseurs avec les fluorophores protéiques pour réaliser la calibration entre la force et la mesure FRET. Ils ont ainsi reconfirmé les propriétés de repliement de HP35 et HP35st avec une transition entre l'état replié/déplié autour de 7.4 pN pour HP35 et autour de 10.6 pN pour HP35st (Figure 55.a).



Figure 55 – a) Calibration entre la force et l'efficacité FRET pour le senseur TSMod (40aa), HP35 et HP35st. b) Sensibilité des senseurs TSMod, HP35, et HP35st en fonction de la force. (Adapté de (Freikamp et al., 2015)).

En conclusion, le senseur TSMod est sensible à des forces entre 0 et 7pN, alors que les senseurs HP35 et HP35st ont des sensibilités plus restreintes autour d'une valeur de force et peuvent permettre de mettre en avant des transitions de forces autour de respectivement 7.4 pN et 10.6 pN (Figure 55.b).

3.3.2.2. Acquisition

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le senseur TSMod inséré dans la partie cytoplasmique de la Ecadhérine pour mesurer les forces dans les E-cadhérines dans les différentes situations. Pour avoir accès à la tension dans la E-cadhérine nous devons donc mesurer le transfert FRET entre la mTFP1 et la EYFP au cours de nos différentes stimulations. Nous utilisons la construction EcadTSMod Δ C en tant que contrôle ne supportant aucune force du cytosquelette d'actine.

Sur la plateforme ImagoSeine de l'IJM, nous avons utilisé un microscope confocal CarlZeiss LSM 710 muni d'un détecteur spectral, d'un objectif 63x/1.4NA à immersion avec un laser argon 30 mW. Nous avons ainsi utilisé la raie laser 458 nm du laser argon pour exciter la mTFP1 et récupéré le spectre d'émission de fluorescence dans la gamme entre 470-600 nm sur le détecteur spectral avec une résolution de 9.8 nm (Figure 56.a). On peut ainsi détecter le spectre d'émission de la mTFP1 et de la EYFP sur le senseur EcadTSMod, et on peut également les comparer à celui de la mTFP1 seule sur EcadTSModΔEYFP ou celui de la EYFP seule sur EcadTSModΔTFP (Figure 56.b et c). Pour ces acquisitions de FRET, il est important de noter que l'intensité du pic de la EYFP dépend du taux de transfert FRET entre la mTFP1 et la EYFP, mais un certain pourcentage de l'intensité totale du pic est dû à l'excitation directe de la EYFP avec le laser 458 nm et surtout à la queue du spectre d'émission de la mTFP1 dans les canaux de la EYFP. Néanmoins, nous considérerons dans la suite que ce pourcentage est le même quel que soit les conditions puisque nous sommes en condition stochiométrique 1:1 pour les deux fluorophores.



Figure 56 – a) A gauche : Image représentative des cellules MDCK exprimant la construction EcadTSMod. A droite : Spectre d'émission de EcadTSMod pour une excitation à 458nm avec le pic d'émission de la mTFP1 autour de 495nm et celui de la EYFP autour de 530nm. b) Image de EcadTSMod Δ EYFP et spectre d'émission correspondant c) Image de EcadTSMod Δ TFP et spectre d'émission correspondant pour une excitation à 521nm. Echelle=20µm.

Typiquement, une expérience pour mesurer la tension de EcadTSMod lors d'une stimulation avec HGF comprend une dizaine de positions avec une mosaïque de 2x2 images 512x512 avec une acquisition toutes les 20 min pendant 15 heures. Pour une expérience de cicatrisation après blessure, on enregistre souvent qu'une seule position et une mosaïque de 10x10 images pour avoir les deux bords de la blessure pendant environ 15 heures.

3.3.2.3. Analyse

Les images sont analysées avec ImageJ et le plugin PixFRET. Pour chaque canal, est soustrait le fond de fluorescence, puis un filtre gaussien (rayon=1pixel) est appliqué pour lisser le bruit de l'image et enfin un seuillage (>3-5% du maximum 4095 possible pour une image de 12bits) est utilisé pour ne sélectionner que les zones d'intérêt où le signal est suffisamment fort. Ensuite l'index FRET est calculé pour chaque pixel comme le ratio I_{EYFP}/(I_{mTFP1}+I_{EYFP}) où I_{mTFP1} correspond au canal où l'intensité d'émission de la mTPF1 est la plus importante (canal n°3 autour de 495nm) et I_{EYFP} correspond à celui pour l'émission de la EYFP (canal n°6 autour de 530nm).

Il est donc possible d'avoir une carte représentant les index FRET pour chacun des pixels (Figure 57.b).Ces cartes d'index FRET donne accès au ratio FRET, mais en conséquence l'intensité de l'image n'est plus représentée. Pour la quantification, les zones d'intérêt sont toujours choisies sur les images d'intensité, puis reportées sur l'image de la carte des index FRET. Ainsi, l'index FRET est mesuré à travers la moyenne des valeurs d'index pour différents régions. Ces régions, choisies sur l'image d'intensité du canal d'émission de la EYFP par exemple, permettent de déterminer les contacts cellule-cellule. Toutes les mesures ont été faites sur des contacts cellule-cellule, sauf lorsqu'il est précisé qu'il s'agit de mesures sur les cellules leaders où dans ce cas nous avons choisi de mesurer le FRET dans les E-cadhérines du lamellipode à l'avant. L'index FRET pour différentes cellules et différentes conditions est alors représenté sous forme de box-plot où chaque point représente un contact mesuré, et ensuite la moyenne et l'écart à la moyenne (SEM) sont représentés sur la distribution.

On peut vérifier que l'index FRET de la construction EcadTSMod est bien plus faible que celui de la construction contrôle EcadTSMod Δ C, ce qui signifie bien que la construction EcadTSMod est sous tension (Figure 57.c).



Figure 57 – a) Images représentatives des cellules MDCK exprimant la construction EcadTSMod (en haut) et EcadTSMod ΔC (en bas) b) Carte d'index FRET calculée grâce au plugin PixFRET pour EcadTSMod (haut) avec des jonctions cellules-cellules plutôt orange correspondant à un index FRET de 46 et EcadTSMod ΔC (bas) avec des jonctions plus claire représentant un index FRET autour de 55. c) Moyenne de l'index FRET mesuré pour environ 300 contacts pour des cellules confluentes pour EcadTSMod et EcadTSMod ΔC .

Afin de calibrer la mesure d'index FRET pour la relier à l'efficacité FRET, nous avons utilisé deux constructions mTFP1-TRAF-Venus et mTFP1-5aa-Venus caractérisées précédemment par R.N. Day (Figure 58.a et b)(Day et al., 2008). En effet, les efficacités FRET de 5aa et de TRAF sont respectivement de 55 et 11 et nous servent de référence haut et bas FRET (Figure 58.c). Une interpolation linéaire entre ces deux valeurs est utilisée pour relier les efficacités FRET aux valeurs d'index FRET mesurées dans nos expériences (Figure 58.d).



Figure 58 – a) Images représentatives des cellules MDCK exprimant la construction TRAF (haut) et 5aa (bas) b) Spectre d'émission de TRAF (haut) et 5aa (bas) pour une excitation à 458nm. c) Carte d'index FRET calculée grâce au plugin PixFRET pour TRAF (haut) et 5aa (bas). d) Courbe de calibration de l'index FRET en efficacité FRET grâce aux standards d'efficacité FRET connus 5aa (55) et TRAF (11).

Lors de la publication du premier senseur utilisant le TSMod, l'équipe de Grashoff a calibré, *in vitro*, l'efficacité FRET en fonction de la force appliquée à l'aide de pinces optiques sur le senseur TSMod (GPGGA)₆. Grâce à cette calibration par pinces optiques, l'efficacité FRET peut être reliée à la force exercée sur le TSMod inséré dans la E-cadhérine (Figure 59). L'index FRET mesuré pour les E-cadhérines des cellules MDCK à confluence est

autour de 46.8 (Figure 57.c). D'après la calibration avec les références d'efficacité FRET, cela correspond à une efficacité FRET de 15. On peut alors déduire que dans ces conditions la E-cadhérine est sous une tension d'environ ~ 5 pN.



Figure 59 – Calibration de la force à partir de la mesure de l'efficacité FRET pour TSMod. Courbe de calibration expérimentale de la calibration entre l'efficacité FRET et la force adaptées de Grashoff et al. 2010.

3.3.3. Mesurer une activité biochimique

Si nous reprenons la définition de la mécanotransduction il s'agit de convertir un signal mécanique en signal biochimique qui, à travers différentes voies de signalisation, peut modifier le programme génétique de la cellule. Dans le paragraphe précédent nous avons discuté comment avoir accès à la mesure des forces mécaniques exercées sur la E-cadhérine. Maintenant, il nous faut également avoir des outils pour mesurer les modifications des voies de signalisation. La voie β -caténine, lorsqu'elle est activée, joue un rôle important dans la transcription de différents gènes tels que l'Axine, cMyc, cyclinD... et il existe un rapporteur de l'activation de la voie de signalisation appelé TOPdGFP, qui sera présenté ci-dessous.

De plus, très souvent, le statut et le profil des modifications post-traductionnelles des protéines révèlent leurs différentes fonctions dans la cellule. Ainsi en ayant accès à l'observation des modifications post-traductionnelles des protéines, nous pourrons mieux comprendre leur fonction. Nous nous sommes concentrés notamment sur la détection de l'activation des kinases Src et FAK qui dépend de l'état de phosphorylation de certaines tyrosines présentes dans ces protéines, de la phosphorylation de la β -caténine, et de la phosphorylation de la chaine légère de la myosine MLC.

3.3.3.1. Rapporteur des gènes : TOPdGFP

Afin de mesurer l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, nous avons une lignée MDCK exprimant le rapporteur TOPdGFP. Ce rapporteur est constitué de la séquence du gène d'intérêt étudié, ici : la répétition de quatre fois le domaine du promoteur où interagissent les facteurs de transcription LEF-1/TCF, fusionné avec la séquence d'un gène rapporteur qui produit une GFP déstabilisée (Figure 60). Cette GFP déstabilisée permet une visualisation rapide, précise et quantifiable pour mesurer l'activité du promoteur. En effet, lorsque la β -caténine se fixe avec les facteurs de transcription LEF/TCF, elle va permettre l'activation de la transcription du gène rapporteur ici la GFP déstabilisée. Ainsi la cellule va produire la protéine GFP qui pourra être détectée par fluorescence. Le signal GFP est proportionnel à l'importance de l'activation par la β -caténine, et est réversible grâce au temps de demi-vie de 2 heures de cette GFP.



Figure $60 - Principe de fonctionnement et structure du rapporteur TOPdGFP et image typique des cellules MDCK TOPdGFP en ilots. Echelle=20<math>\mu$ m.

Ce rapporteur a été utilisé dans différentes études, notamment la première fois dans le développement de l'embryon de poisson zèbre (Dorsky et al., 2002). Il a été notamment utilisé avec succès dans les cellules MDCK (Benham-Pyle et al., 2016; Maher et al., 2009) pour visualiser l'activation de la voie β -caténine sur des cellules en ilots ou des cellules étirées. On peut noter également qu'il existe un autre rapporteur de l'activité des gènes dépendants de la β -caténine, le rapporteur TOPFlash (Molenaar et al., 1996). Celui-ci est basé sur le même principe, seule la manière de détection change, au lieu de la production de dGFP, les cellules produisent quand la voie est activée de l'enzyme luciférase. L'inconvénient est qu'il est nécessaire de lyser les cellules pour quantifier la production de luciférase. En effet, *in vitro* cette enzyme peut catalyser l'oxydation de la luciférine qu'utilisé très largement par la communauté scientifique pour rapporter l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, il a été montré que celui-ci pouvait aussi être activé indépendamment de la β -caténine mais grâce au cofacteur de transcription ATF2 dans certaines cellules tumorales (Grumolato et al., 2013).

3.3.3.2. Senseurs d'activité kinase en cellules vivantes

L'équipe de Yingxio Wang a développé des outils pour observer l'activité des kinases, notamment des tyrosinekynases Src et FAK dans les cellules vivantes. Plutôt que d'utiliser des techniques plus classiques basées sur l'utilisation d'anticorps que nous développerons plus bas, ils ont créé des biosenseurs génétiquement encodés exprimés par la cellule et dont la mesure du transfert FRET permet de nous renseigner sur l'activité endogène des kinases Src ou FAK en dynamique.

Le principe de fonctionnement de ces deux senseurs est le même : le senseur est constitué d'une sous-unité régulatrice SH2 qui reconnaît une séquence protéique phosphorylée, substrat de Src (WMEDYDYVHLQG dérivé de p130cas) ou de FAK (ETDDYAEIIDE), elle-même incorporée au senseur (Figure 61. a et b). Lorsque la séquence substrat est phosphorylée par Src ou FAK, le senseur change de conformation, comme le SH2 reconnait la tyrosine phosphorylée. Cette construction comprend également un fluorochrome donneur, et un accepteur, de part et d'autre du senseur. Quand Src ou FAK sont inactifs, le substrat du senseur est déphosphorylé, le senseur est en conformation repliée, les deux fluorochromes sont proches, le transfert FRET est maximum. Lorsque le substrat du senseur est phosphorylé par Src ou FAK, le senseur est en conformation dépliée, écartant les deux fluorochromes, le transfert FRET est minimal. Ainsi, en mesurant le transfert FRET entre les deux fluorochromes, on peut avoir accès à l'état d'activation des kinases Src ou FAK. Plus la kinase endogène est active, moins le transfert de FRET sera élevé, plus l'index FRET, mesuré de la même façon que pour les senseurs de force, sera faible.



Figure 61 – Fonctionnement général d'un biosenseur tyrosine kinase basé sur le FRET, composé d'un substrat spécifique de la kinase, de deux fluorophores un donneur et un accepteur et d'un domaine SH2. Quand le substrat est phosphorylé par la kinase active, le domaine SH2 reconnait la tyrosine phosphorylé et se lie au substrat. Ce changement de configuration intramoléculaire conduit à une diminution du transfert FRET entre les deux fluorophores. a) Biosenseur FRET de l'activité kinase de Src, séquence substrat de Src (WMEDYDYVHLQG). b) Biosenseur FRET de l'activité kinase de FAK, séquence substrat de FAK (ETDDYAEIIDE). Echelle=20µm.

Le premier senseur d'activité crée par l'équipe de Yingxio Wang a été celui dont le substrat avait été développé spécifiquement pour la kinase Src (Wang et al., 2005). Ce senseur est adressé à la membrane grâce à la séquence dérivée de Lyn suivante MGCIKSKRKDNLNDDE en N terminus et les deux fluorochromes utilisés sont ECFP/Citrine (Figure 62). Dans un autre article (Na et al., 2008), ils décrivent un second senseur, cette fois ci ancré à la membrane grâce une séquence de prénylation Kras (KKKKKSKTKCVIM) en C terminus afin d'éviter les rafts lipidiques, et avec les fluorophores suivants : ECFP/Ypet. Nous avons choisi d'utiliser dans ce travail de thèse le senseur Src adressé à la membrane avec la séquence de Lyn dans les rafts lipidiques décrit dans Seong et al. 2011.



Figure 62 – Stratégie d'adressage à la membrane des biosenseurs d'activité kinase grâce au tag Lyn qui s'ancre dans les radeaux lipidiques ou au tag Kras à l'extérieur de ces domaines. (Illustration de Seong et al. 2011)

Pour ces deux senseurs, nous avons choisi de modifier le fluorochrome du donneur par la mTFP1 afin de pouvoir mieux exciter le donneur avec les lasers à notre disposition sur la plateforme ImagoSeine et avoir une intensité d'émission du donneur du même ordre que celle de l'accepteur (Figure 63). Les senseurs d'activité de Src et FAK ont donc été adaptés des senseurs préexistant Lyn-FAK et Kras-Src issus du laboratoire de Yingxiao Wang. Le fluorochrome CFP a été remplacé par mTFP1 grâce au kit de clonage In-fusion HD. Les primers utilisés sont listés ci-dessous :

	DCD mTED1 on TSMod	5' CGACGATGACGATAAGGATCCCATGGTCTCGAAAGGCGAAGAAACAAC 3'	
Kras- Src biosensor	PCR IIITP1 ON ISIVIOU	5' ATACCAATGCATGCGGGCCTTGTAAAGTTCATCCATTCCAT 3'	
mTFP1-YPet		5' GCCCGCATGCATTGGTATTTTGGG 3'	
	PCR UII SIC PINAS 2008	5' GGGATCCTTATCGTCATCGTCGT 3'	

Lyn- FAK biosensor	PCR mTFP1 sur TSMod	5' ACGGCGTGGACATGAAGACC ATGGTCTCGAAAGGCGAAGAAACAAC 3' 5' ATACCAATGCATGCGGGCCTTGTAAAGTTCATCCATTCCAT 3'
mTFP1-EYFP	PCR sur le senseur FAK	5' GCCCGCATGCATTGGTATTTTGGG 3'
	Lyn	5' GGTCTTCATGTCCACGCCGT 3'

Ensuite, nous avons utilisé un microscope confocal CarlZeiss LSM780 muni d'un détecteur spectral, d'un objectif 63x/1.4NA à immersion avec un laser argon 30 mW. Nous avons ainsi utilisé la raie laser 458nm du laser argon pour exciter la mTFP1 et récupérer le spectre d'émission de fluorescence dans la gamme entre 470-600 nm sur le détecteur spectral avec une résolution de 8.9 nm.



Figure 63 – a) Image et spectre d'émission représentatif des cellules MDCK Kras-Src Senseur avec ECFP/YPet issu de Na et al. 2008, b) Image et spectre d'émission représentatif des cellules MDCK Kras-Src Senseur avec mTFP1/YPet modifié et utilisé dans ce travail de thèse. Echelle=10μm.

Comme nous avons effectué quelques modifications dans le senseur, il s'avère important de valider que celuici fonctionne en tant que rapporteur de l'activité kinase de Src. En effet, plusieurs facteurs peuvent moduler la sensibilité du senseur. Un excès de senseur pourrait masquer l'activité de Src en maintenant un transfert de FRET trop élevé, alors qu'un défaut en senseur pourrait donner l'effet inverse, ou tout simplement pas suffisamment de signal. On peut également utiliser une version contrôle du senseur où le FRET ne doit pas changer en fonction de l'état de la kinase Src. Pour cela, les tyrosines de la séquence substrat WMEDYDYVHLQG sont remplacées par des phénylalanines (F).

Ainsi, nous avons vérifié que l'index FRET pour cette construction contrôle est bien plus haut que celui du senseur Src (Figure 64.a) et qu'il n'est pas sensible à l'inhibition de Src par ajout de l'inhibiteur PP1, contrairement au senseur Kras-Src non muté (Figure 64.a). Nous avons vérifié également que nos ajouts de milieu avec inhibiteur contenant du DMSO ou tout changement de milieu n'a pas d'impact sur l'index FRET mesuré (Figure 64.b). De plus, en transfectant une forme active de la kinase Src : le mutant Src Y530F mCherry nous avons pu vérifier que le senseur est capable de mesurer une activation de Src puisque l'index FRET de Kras-Src diminue proportionnellement à la quantité de Src actif dans la cellule (Figure 64.c).



Figure 64 – a) A droite : représentation schématique du biosenseur FRET Kras-Src muté dans la séquence substrat en Y662F/Y664F \rightarrow FF et donc non phosphorylable par Src. A gauche : Index FRET mesuré pour le biosenseur Kras-Src et Kras-Src YY \rightarrow FF avec ou sans l'inhibiteur de Src PP1 (25µM). b) Index FRET mesuré pour Kras-Src en fonction de différentes stimulations : ajout de DMSO, changement ou ajout de milieu, ou ajout de l'inhibiteur PP1. Seul l'ajout de PP1 fait varier l'index FRET et inhibe bien l'activité kinase de Src. c) Variation de l'index FRET de Kras-Src en fonction de la quantité de mutant constitutivement actif (Src Y530F mCherry) transfecté et exprimé dans les cellules.

3.3.3.3. Quantification des phosphorylations par anticorps

L'une des quantifications les plus utilisées en biologie pour avoir accès aux modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité des protéines, telle que la phosphorylation des tyrosines est celle des anticorps spécifiques. Ces anticorps sont utilisés principalement dans deux types d'expériences : soit sur des lysats protéiques des cellules en western blot, soit en immunofluorescence directement sur les cellules fixées.

Western blot pour la détection des phosphorylations de la β-caténine, et des kinases Src et FAK

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de la β-caténine sur la tyrosine Y654, au sein du site d'interaction avec l'E-cadhérine. De plus, afin de quantifier l'activité kinase de Src et FAK, nous nous sommes intéressés au profil de phosphorylation des kinases FAK et Src. En effet leur conformation, et notamment l'état de phosphorylation de certaines tyrosines, nous permet de savoir si la kinase est active ou non.

Pour déterminer les profils de phosphorylation, nous disposons de plusieurs anticorps qui sont spécifiques de certaines tyrosines présentes sur la séquence de la β-caténine, de Src ou de FAK, ou alors d'un anticorps spécifique des tyrosines phosphorylées quel que soit la protéine. Nous avons notamment utilisés les anticorps suivants :

	β-catenin	Mouse	ECM Biosciences CM1181
β-caténine	p-β-catenin y654	Rabbit	ECM Biosciences CP4021
	p-β-catenin y654	Mouse	Abcam ab24925
S r c	Src clone 327	Mouse	Abcam 16885
510	p-src y416p	Rabbit	Cell Signaling Technologie D49G4
	FAK	Mouse	BD Sciences (610088)
EAK	р-FAK Y397	Rabbit	Santa Cruz (11765)
FAN	p-FAK Y576/577	Rabbit	Cell Signaling (3281P)
	p-FAK Y861	Rabbit	Invitrogen (44626)
Yp	p-tyrosine clone 4G10	Mouse	Merck 05321
Secondaire	Anti-mouse HRP	Goat	Invitrogen 62-6520
Secondalle	Anti-rabbit HRP	Goat	

Table 3 – Anticor	os primaires	et secondaires	utilisés pour l	es différents	western blots.
10.010 0 10.0001			0.0000000000		

Le protocole pour avoir accès à la quantification de protéines par western blot est le suivant :

Les cellules cultivées sur des boîtes 60x15mm sont rincées au PBS puis lysées avec 100µL de tampon de lyse (RIPA Buffer, 1 tablette d'inhibiteur de protéases et une de phosphoSTOP, 1mM d'orthovanadate) à 4°C durant 20 minutes. L'extrait protéique est récupéré à l'aide d'un râteau et est centrifugé à 11000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant des différents échantillons est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (NuPAGE 4-12% Bis-Tris). A un volume de 26µL de surnageant protéique sont ajoutés 10µL de tampon de charge LDS 6X et 4µL d'agent réducteur 10X, ensuite l'échantillon est dénaturé à 90°C pendant 10min dans ce tampon LDS-RA (120 mM Tris/Cl pH 6.8; 20% glycerol; 4% SDS, 0.04% bromophenol blue; 10% β-mercaptoethanol). Les échantillons sont soumis à une migration à voltage constant à 110V pendant 1h20 environ. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane nitrocellulose (Whatman 3MM CHR) avec un tampon de transfert avec 15% d'éthanol pendant 1h10 à 110V. La membrane est ensuite saturée pendant environ 1h dans un tampon TBST (25mM Tris-Base, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) contenant 5% de lait. La membrane est ensuite incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt (cf ci-dessus Table 3). Après cette incubation, la membrane est rincée trois fois 10min par du tampon TBST, puis incubée 1h heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase de Raifort, dirigé contre l'anticorps primaire et dilué dans le TBST contenant 5% de lait. Finalement, après trois lavages, la membrane est révélée en utilisant le kit de révélation Super Signal PicoWest (Thermo Scientific) sur la station FUJIFILM LAS-4000mini. L'intégrale des intensités lumineuses des différentes bandes correspondant au poids moléculaire de nos protéines d'intérêt sont mesurées sur ImageJ. On peut alors mesurer le ratio pour chaque échantillon entre la protéine phosphorylée et la protéine totale.

Immunoprécipitation avant western blot pour l'analyse des tyrosines phosphorylées de la β-caténine

Pour utiliser l'anticorps anti-tyrosine phosphorylée, il convient préalablement de pouvoir sélectionner dans l'extrait protéique après la lyse des cellules, notre protéine d'intérêt. Dans notre cas, nous avons choisi de réaliser une immunoprécipitation avec des anticorps anti-GFP sur le lysat des cellules MDCK β-caténine GFP. Le protocole pour isoler la β-caténine GFP dans l'extrait est au départ le même que celui pour une analyse par western blot. Les cellules cultivées sont rincées au PBS puis lysées avec 100µL de tampon de lyse à 4°C durant 20 minutes. L'extrait protéique est récupéré à l'aide d'un râteau et est centrifugé à 11000 rpm pendant 15 min à 4°C. Il est ensuite incubé avec des billes magnétiques GFP-Trap[®]-MA (ChromoTek), préalablement équilibrées, pendant 2 heures à 4°C sous agitation. Les billes magnétiques sont ensuite lavées trois fois avec un tampon de

lavage (10 mM Tris/Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA), puis éluées dans un tampon de charge LDS-RA 2X, et chauffées 10 minutes à 95°C. Ensuite, il s'agit de réaliser une analyse classique par western blot.

Il est quand même important de noter qu'il existe un inconvénient à cette technique. Nous n'avons accès qu'au profil de phosphorylation de toutes les tyrosines présentes sur la β-caténine. Or il en existe 17. Deux ont été caractérisées et conduisent au phénomène de dissociation de la β-caténine des jonctions qui nous intéresse: les tyrosines Y142 et Y654. Les tyrosines Y64, Y331, Y333 sont des cibles de la kinase PTK6 (Palka-Hamblin et al., 2010) et aussi de Src pour la tyrosine Y333 (Yang et al., 2011). La tyrosine Y86 est une cible de CSK et Abl (Coluccia et al., 2007; Piedra et al., 2001), et les autres n'ont pas été caractérisées.

3.4. Analyses statistiques des expériences

De manière générale, les données représentées sont les moyennes avec en barre d'erreur l'erreur type de la moyenne (+/- SEM). Les p-values sont calculées dans le logiciel GraphPad Prism V, à partir du test statistique non paramétrique, non apparié Mann-Whitney pour tester l'hypothèse selon laquelle la distribution des données est la même dans deux groupes, ou partir du test statistique non paramétrique, non apparié Krusal-Wallis pour comparer la distribution entre différents groupes.

Le nombre de répétitions indépendantes des expériences, ainsi que le nombre de cellules analysées au total par condition en fonction des figures sont indiqués dans la table suivante :

Figure		Cell lines	Treatment	Numbers of independent experiments	Numbers of cells analyzed
Figure 49	b	Ecad GFP	Ctrl	3	62
Figure 57	с	EcadTSMod / EcadTSMod∆C	Ctrl High Density (HD)	4/2	287/364
Figure 58	d	TRAF/5aa	-	1	7/20
51 64	а	Kras Src Sensor YY → FF / Kras Src Sensor	Ctrl/+PP1	2/3	FF : 56/52 81/78
rigui e 04	С	Kras Src Sensor	Ctrl /+PP1	1	18
	d	Kras Src Sensor	-/+ Src Y530F mCherry	2	76/66
Figure 65	с	EcadTSMod / EcadTSMod∆C	Low Density (LD)/High Density (HD)	3/3 ∆C :2	145/422 ∆C :364
	а	EcadTSMod	Wound Healing	4	12
Figure 66	b	EcadTSMod	Wound Healing (Leaders/back)	4	315/420
	С	EcadTSMod∆C	Wound Healing (Leaders/back)	2	83/364
Figure 67		EcadTSMod	Wound Healing (Leaders/back)	3	28/28
Figure 68	а	β –catenin GFP	Wound Healing (Leaders/back)	7	32/120
liguie 00	b	TOPdGFP	Wound Healing (Leaders/back)	4	20/21
Figure 69	а	EcadTSMod	Wound Healing (Leaders/back)	2	13/18
Figure 70	b	-	- HGF/+HGF	1	10/12
Figure 71	а	EcadTSMod	- HGF/+HGF	5/4	73/173
inguie / I	b	$EcadTSMod\Delta C$	- HGF/+HGF	5/4	175/136
Figure 72		β –catenin GFP	- HGF/+HGF	5/5	47/42

Table 4 – Nombre d'expériences indépendantes répétées, et de cellules analysées au total par condition en fonction des figures.

Figure 74		$EcadTSMod + \beta \text{-}cate$	+HGF	2	15	
		nin mCherry		_		
Figure 75	b,c	β –catenin mMaple	- HGF/+HGF/leaders	3/4/4	14/23/18	
	а	β –catenin mMaple	leaders	4	42	
Figure 76	b	GFP/ β -catenin GFP/ E-cadherin GFP	GFP/LiCl/ Ctrl	1/1/3/3	1/15/84/49	
Figure 78		β –catenin GFP	- HGF/+HGF	3/3	47/47	
Figure 79		EcadTSMod	+HGF	1	40	
Eiguro 80	a,b	β –catenin mMaple	WH (Leaders/back)/+HGF/-HGF	4/4/3	61/61 65/65	
Figure ou	С	β –catenin mMaple	-HGF/-HGF+LiCl/HD/HD+LiCl	3/4/4/3	61/65/65/49	
	a,c	β –catenin GFP	- HGF/+HGF	4/3	63/63	
Figure 81	b,c	β –catenin mMaple	- HGF/+HGF	5/3	22/22	
	а	β–catenin GFP/ E- cadherin GFP	Crtl LD Lamellipode/Contact	2/4 3/3	62/63 62/62	
Figure 82		0 astaria CED/E	GFP/LiCl/	1/1 1/2/2/2	1/15	
	b	p-catenin GFP/ E-	LD contact/HD	1/1 4/2/2/2	63/38/62/18	
		cautienti GFP	contact/Lamellipode/Basal	5/5/5/2	62/50/62/19	
Figure 8/	С	β –catenin mMaple	LiCl	4	37	
i igui e o4	d	EcadTSMod	LiCl	1	41/123	
Figure 85	b	β –catenin GFP	+HGF+PP1/+PP1	2/2	24/25	
	С	EcadTSMod	+HGF+PP1/+PP1	2/3	29/43	
	а	β –catenin GFP	Wound Healing -/+PP1	2/3	107/117	
Figure 86	b	β –catenin GFP	Wound Healing -/+PP1 (Leaders/back)	2/3	43/116 69/114	
U U	C	EcadTSMod	Wound Healing -/+PP1	2/2	68/49 122/104	
				(Leaders/back)	,	
	а	а	0 setenin CED	Wound Healing -/+PP1 75µM/+PP1	2/2/2	107/117/20
Figuro 87			p–catenin GFP	25μΜ	2/3/2	107/117/50
Figure 67			Wound Healing PP1 25µM			
	С	EcadTSMod	(Leaders/back)	2	4/9	
			-HGF/+HGF/+PP1/+SrcY530/+HGF		99/105/62/113/6	
Figure 90	b	Kras-Src-Sensor	10h	3/3/3/2/2	5	
Figure 01		Kras-Src-Sensor / Kras	Wound Healing -/+PP1	2/2 EE · 1	80/114 45/42	
Inguic 51		Src Sensor YY $ ightarrow$ FF	(Leaders/back)	2/2 11.1	FF : 38/60	
			-HGF/HGF/+PP1/Na ₃ VO ₄	1	-	
Figure 92		β –catenin GFP Y-E /		_		
-		Y-F	-	2	-	
Figure 94	b	β-catenin GFP Y-E / Y-F	+HGF/-HGF	4/4/4/4	F:52/40 E:77/77	
Figure 95		β -catenin GFP Y-E / Y-F	+HGF/-HGF	E:2/2 F:2/2	E :29/48 F :34/32	
Figuro 06	b	EcadTSMod YYY-FFF	+HGF/-HGF	3/4	47/96	
Figure 30	С	EcadTSMod YYY-FFF	Wound Healing (Leaders/back)	4	218/349	
Fig. 00	b	EcadTSMod	-/+Src Y530F	1	86/26	
Figure 98	с	β –catenin GFP	-/+Src Y530F	2	408/89	
Figure 99	b	Lyn-FAK-Sensor	-HGF/HGF/+PP1/+PF228	6/4/6/6	593/183/455/39	

Figure		Lvn-FAK-Sensor	Wound Healing -/+PF228	3/1	130/226 58/81
100			(Leaders/back)		
Figure 101		-	HGF /+HGF+PP1/+HGF+PF228	7	-
	b	β -catenin GFP	PF228 /+ HGF+PF228	3/3	43/37
Figure	с	EcadTSMod	PF228 /+ HGF+PF228	3/3	99/110
102	d	β –catenin GFP	Wound Healing -/+PF228	2/2	107/121
Figure			-HGF/+HGF	2	00/147/00/50
103	С	-	/+HGF+PP1/+HGF+PF228	2	99/14//08/50
			-HGF/+HGF		
Figure	b	-	/+HGF+PP1/+HGF+PF228/back/lea	2	2/2/2/2/2/2
104			ders		
			-HGF/+HGF		C . 40/45//C1/107
Figure	b	-	/+HGF+PP1/+HGF+PF228	2	C:40/45//61/10/
105			Contact/StressFiber		5:26/20//35/33
Figure 107	b	E-α–TSMod	+/- CytoB	1	77/95
Figure	а	E-α–TSMod	Wound Healing (Leaders/back)	6	135/245
108	b	E-a–TSMod	+HGF /-HGF	3/3	46/45
		FAKTSMod/ FAKTS		2	22/22/21
Figure	d	mutant / FRNK	-	2	32/23/21
122	b	FAKTSMod	Wound Healing (Leaders/back)	2	28/26
	С	FAKTSMod	+ HGF	1	7
Figuro	b	VinTS/VinTL	FA :LD/HD // AJ	TS:2	TS: 60/46//94
123				TS : 2	TS : 72/88
	С	VinTS/VinTL	Wound Healing (Leaders/back)	TL:2	TL : 40/62
Figure 125	b	β –catenin GFP	ablation	1	3
Figure	b	EcadTSMod	ablation	1	9
126	С	EcadTSMod	-/+ ablation	1	30/9
Figure	а	EcadTSMod (HaCaT)	Réservoir/leader/adhèrent/suspen du	3	696/49/707/595
129	b	EcadTSMod (HaCaT)	Front/back perp/parallèle	3	151/116 101/142
	С	EcadTSMod (HaCaT)	leaders	1	10
Figure 131		EcadTSMod	Border/stretched/triangle	3	81/101/15

Résultats

Sommaire

4.1.	LA R	ELAXATION DE TENSION DES CADHERINES CORRELE AVEC L'ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION B-CATE	ENINE.
	138		
4.1.	.1.	Lors de la migration collective après blessure de l'épithélium	139
4.1.	.2.	Lors de la stimulation avec le facteur de croissance HGF	143
4.2.	LA B	-CATENINE PRESENTE A LA MEMBRANE CONTRIBUE MAJORITAIREMENT A L'ACCUMULATION DE CELLE-CI DAN	S LE
NOYAU	J		147
4.2.	.1.	Quantification de la translocation membrane/noyau de la 6-caténine.	147
4.2.	.2.	Différents paramètres peuvent influencer l'accumulation de la 6-caténine dans le noyau	149
1	5.2.1	Modèle cinétique	150
1	5.2.2	Mesures expérimentales des différentes contributions	152
4.2.	.3.	Est-ce que la translocation de la 6-caténine est spécifique aux cellules en migration ?	158
4.3.	LA R	ELAXATION DES CADHERINES ET LA TRANSLOCATION DE LA B-CATENINE DEPENDENT D'UNE VOIE DE SIGNALISA	ATION
IMPLIQ	UANT	LES KINASES SRC ET FAK	160
4.3.	.1.	L'activité de Src est nécessaire mais ses cibles ne sont ni la cadhérine ni la 8-caténine	161
а)	Nécessité de l'activité kinase de Src	161
b)	Activation de la kinase Src	163
c)	La β -caténine comme cible de Src	166
d	I)	La E-cadhérine comme cible de Src	170
4.3.	.2.	Src active FAK qui est nécessaire pour la relaxation des cadhérines et la translocation de la	в-
cate	énine		171
а)	FAK est une cible de Src	171
b)	Activation de la kinase FAK	173
c)	Nécessité de l'activité kinase de FAK	175
4.4.	LA R	EORGANISATION DU CYTOSQUELETTE EST SUFFISANTE POUR INDUIRE UNE RELAXATION DES CADHERINES	177
4.4.	.1.	Description de la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine dépendante de Src-FAK	177
4.4.	.2.	Relaxation de tension des E-cadhérines et lien avec le cytosquelette	181

4. Résultats

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des mécanismes moléculaires de la mécanotransduction des E-cadhérines dans la modulation de la signalisation β -caténine lors de la migration de cellules épithéliales. En effet, nous avons cherché à comprendre s'il existait un lien entre la tension exercée sur les E-cadhérines, et la translocation nucléaire et l'activité de la β -caténine. Nous allons décrire dans ce chapitre les principaux résultats concernant ces deux évènements.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une corrélation entre la relaxation de tension des Ecadhérines et l'activation de la voie de signalisation β -caténine lors de la migration collective des cellules après blessure de l'épithélium et lors de l'ajout du facteur de croissance HGF. Ensuite, nous nous sommes intéressés plus précisément à l'hypothétique translocation au noyau de la β -caténine présente à la membrane. Nous avons quantifié cette translocation de la membrane au noyau qui est spécifique aux cellules en migration, et évalué les différents paramètres pouvant influencer l'accumulation nucléaire de β -caténine. Et enfin, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires sous-jacents en s'intéressant aux kinases Src, FAK et à la réorganisation du cytosquelette – intermédiaire entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales. Nous avons montré que la relaxation des E-cadhérines et la translocation de la β -caténine dépendent d'une voie de signalisation impliquant les kinases Src et FAK. En effet, l'activité de Src est nécessaire mais ses cibles ne sont ni la cadhérine ni la β -caténine, mais la kinase FAK. De plus, la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine, dépendante de Src et FAK, est suffisante pour induire une relaxation de tension E-cadhérines.

4.1.La relaxation de tension des cadhérines corrèle avec l'activation de la voie de signalisation β-caténine.

Pour déterminer s'il existe une relation entre la tension exercée sur les E-cadhérines et l'activation de la voie β -caténine, nous avons cherché des conditions où tension des E-cadhérines et localisation de la β -caténine pouvaient changer simultanément. La tension dans les E-cadhérines est mesurée à l'aide du senseur TSMod avec la lignée MDCK EcadTSMod et la localisation et l'activation de la β -caténine est suivie grâce aux lignée β -caténine GFP et TOPdGFP. Nous nous sommes intéressés à deux stimulations qui induisent la migration des cellules épithéliales : l'une à partir d'ilot d'une dizaine de cellules qui vont se dissocier pour migrer individuellement à la suite de l'ajout du facteur de croissance HGF, et l'autre collective après blessure de la monocouche de cellules.

Il s'avère que l'état initial de nos stimulations n'est pas le même pour les cellules MDCK. Elles se trouvent en ilots à basse densité avant d'être incubées avec le facteur de croissance HGF, et elles forment une monocouche confluente à haute densité avant la blessure. Les cellules en ilots forment des jonctions adhérentes entre cellules, et le cytosquelette d'actine se compose essentiellement d'un réseau cortical soutenant ces jonctions au niveau des contacts cellule-cellule, d'un réseau très dense au niveau des bords libres de l'îlot, et d'un réseau formant des fibres de stress à l'intérieur de la cellule qui relient les adhésions focales (Figure 65.a). Le cytosquelette des cellules à confluence est, lui, composé de fibres de stress au niveau de la membrane basale (non montré ici) reliées aux adhésions focales des cellules, et d'un cortex très enrichi au niveau des jonctions cellule-cellule sur toute la hauteur des cellules (Figure 65.b). Nous nous sommes alors intéressés à la tension des E-cadhérines dans ces deux situations grâce aux cellules EcadTSMod. L'index FRET mesuré aux contacts dans les cellules à confluence est plus bas que celui des cellules en ilots (Figure 65.c). Néanmoins, les deux index FRET sont plus bas que celui des cellules portant la construction EcadTSMod Δ C tronquée de la E-cadhérine en C terminale et ne recrutant pas le cytosquelette d'actine. Ces résultats mettent en évidence que les Ecadhérines des cellules en ilots et des cellules à confluence sont sous tension générée par le cytosquelette d'actine, mais les E-cadhérines des cellules confluentes sont plus sous tension comparées à celle des cellules à basse densité.



Figure 65 – a) Image typique d'un ilot de cellules MDCK à basse densité, marquées avec la β -caténine (488nm) et la phalloidine (550nm). b) Image typique d'un ilot de cellules MDCK à confluence, marquées avec la β -caténine (488nm), la phalloidine (550nm). c) Index FRET mesuré au niveau des contacts cellule-cellule pour les MDCK EcadTSMod à basse densité (LD bleu ciel), et à confluence (HD bleu foncé), ainsi que pour les cellules MDCK EcadTSmod Δ C. Echelle =20 μ m.

Nous allons maintenant perturber les cellules en induisant leur migration, et découvrir si cela peut modifier la tension des E-cadhérines et la signalisation β -caténine.

4.1.1. Lors de la migration collective après blessure de l'épithélium

Dans un premier temps, nous avons effectué des expériences de blessure de monocouche épithéliale confluente afin d'observer une migration collective des cellules qui vont envahir l'espace libre. Nous avons observé, comme il a été montré précédemment (Petitjean et al., 2010; Poujade et al., 2007), que les cellules proches des bords s'étalent et migrent activement sur la surface de manière à envahir celle-ci. On peut ainsi définir une vitesse moyenne de migration du bord. Mais en regardant plus précisément, bien que partant d'une ligne de bord au départ parfaitement rectiligne, on obtient quelques heures plus tard des cellules en avant, plus larges, et avec un lamellipode important vers la surface libre. Ces cellules dites leaders ont des caractéristiques toutes particulières. Une fois la blessure fermée quand les deux bords se rejoignent ces cellules leaders redeviennent indiscernables des autres.

Grâce à l'utilisation des cellules MDCK EcadTSMod, nous avons montré au cours de cette migration collective qu'il existe un gradient d'index FRET en fonction de la distance au bord de la blessure, diminuant de l'avant à l'arrière (Figure 66.a). Ce gradient indique qu'il y a donc un gradient de tension dans les E-cadhérines. Il est important de noter que la mesure de l'index FRET, et donc de la tension, est mesurée au niveau des contacts cellule-cellule, à l'exception du premier point qui correspond à la membrane libre dans le lamellipode des cellules leaders. Nous avons vu précédemment (cf partie 2.1) que la tension dans les E-cadhérines est la même au niveau des contacts cellules-cellules qu'au niveau de la membrane libre dans des petits ilots de cellules (Borghi et al., 2012).

Ici, les cellules leaders à l'avant possèdent un fort index FRET et donc une faible tension, alors que les cellules à l'arrière ont un index FRET plus bas indiquant donc une tension plus importante dans les E-cadhérines. Cette différence de tension entre cellule leader et cellule à l'arrière à environ 500 μ m du bord, après 10 heures de migration, est significative (Figure 66.b). Cette différence de tension n'est pas observée lorsque la même expérience de migration collective est réalisée sur les cellules MDCK EcadTSMod Δ C qui expriment la construction contrôle avec une E-cadhérine tronquée en C terminale et qui ne peut pas se lier au cytosquelette (Figure 66.c).



Figure 66 – a) Index FRET mesuré pour les cellules MDCK EcadTSMod lors de leur migration collective après blessure de la monocouhe, en fonction de la distance au bord du front de migration. Insert : Profil typique d'index FRET sur la même distance entre l'avant et l'arrière du front de migration. b) Index FRET mesuré sur les EcadTSMod à l'arrière du front de migration (~500µm) et à l'avant dans des cellules leaders après 10 heures de migration. c) Top : schéma de la construction EcadTSMod Δ C tronquée en C terminale et qui ne peut pas recruter le cytosquelette d'actine. Bas : Index FRET mesuré sur les EcadTSMod Δ C à l'arrière du front de migration (~500µm) et à l'avant dans des cellules leaders après 10 heures de migration. Echelle=100µm.

En observant la migration des cellules au cours du temps, nous avons pu montrer que l'index FRET augmente au cours du temps, et ce dès les premières heures de migration, puis se stabilise lorsque les cellules leaders sont formées et stables, et enfin diminue pour retrouver la valeur des cellules loin de la blessure, lorsque les deux bords de l'épithélium se rencontrent à la fin de la cicatrisation (Figure 67). Ainsi, ces résultats indiquent que la migration collective des cellules épithéliales après blessure, conduit à une relaxation réversible de la tension des E-cadhérines, dépendante de son lien avec le cytosquelette d'actine, avec une tension faible dans les cellules leaders du front par rapport à l'arrière.



Figure 67 – a) Profil typique d'index FRET au cours de la migration de monocouche. b) Index FRET mesuré pour les cellules EcadTSMod dans les cellules leaders et des cellules plus à l'arrière lors de la migration collective de l'épithélium. 'Contact' marque le moment où les deux fronts de migration de la blessure se rejoignent. Echelle=100 μ m.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la localisation de la β -caténine. Pour cela, nous avons réalisé le même type de blessure sur les cellules β -caténine GFP. Nous avons observé que la β -caténine GFP est localisée au niveau des contacts cellule-cellule à la membrane comme prévu, et est enrichie dans le noyau des cellules au front (Figure 68.a). En effet, après 10 heures de migration, les cellules leaders au front présentent un niveau de β -caténine GFP dans leur noyau 5 fois plus élevés que les cellules à l'arrière (Figure 68.a). Pour confirmer que cette localisation nucléaire de β -caténine est accompagnée d'une augmentation de la transcription de gènes dépendants de la β -caténine, nous avons utilisé la lignée MDCK TOPdGFP qui exprime une GFP déstabilisée sous le contrôle du promoteur LEF-1/TCF (Dorsky et al., 2002; Maher et al., 2009). Nous avons dès lors observé un gradient d'expression de la GFP en fonction du bord de migration. Les cellules leaders expriment le double de GFP que les cellules à l'arrière (Figure 68.b). Ainsi, ces résultats montrent que la migration collective des cellules épithéliales après blessure, conduit à une accumulation nucléaire et une activation de la transcription des gènes dépendants de la β -caténine après blessure, cellules leaders.

4. Résultats | 4.1 La relaxation de tension des cadhérines corrèle avec l'activation de la voie de signalisation βcaténine.



Figure 68 – a) A gauche : Image typique de la localisation de la β -caténine- GFP lors de la migration collective d'une monocouche après blessure. A droite : Intensité relative de la GFP dans le noyau des cellules leaders par rapport aux cellules à l'arrière du front de migration (~500µm) après 10 heures de migration. b) A gauche : Image typique d'un front de migration exprimant TOPdGFP. A Droite : Intensité relative de GFP dans les cellules leaders à l'avant comparé aux cellules à l'arrière du front (~500µm) après 10 heures. Echelle=100µm.

Dans un second temps, nous avons voulu étendre nos observations à un système de perturbation légèrement différent. En effet, les expériences montrées ci-dessus ont été réalisées sur des monocouches confluentes de cellules MDCK où la blessure a été réalisée à l'aide d'un cône de pipette (cf Méthodes 3.2.1). Bien que les cellules soient rincées plusieurs fois, il pourrait être possible que cette migration collective des cellules soit la conséquence de la blessure et de la libération dans le milieu de certains facteurs, et pas seulement de leur capacité à envahir un nouvel espace libre. On peut, en effet, permettre aux cellules d'envahir un nouveau substrat, sans perturber les cellules, en utilisant les séparateurs Ibidi (cf Méthodes 3.2.1). Dans ces conditions, après avoir enlevé le séparateur en PDMS, les cellules migrent collectivement pour envahir le nouvel espace, des cellules leaders apparaissent. Nous avons pu vérifier que dans ce cas également la tension dans les E-cadhérines des cellules leaders est plus faible que les cellules à l'arrière du front (Figure 69.a), et que ces cellules leaders présentent une accumulation nucléaire de β -caténine (Figure 69.b).



Figure 69 - a) Index FRET mesuré sur les EcadTSMod à l'arrière du front de migration (~500µm) et à l'avant dans des cellules leaders après 7 heures de migration. b) Image typique de la localisation de la β -caténine-GFP lors de la migration collective d'une monocouche après avoir enlevé le support Ibidi. Echelle=100µm.

Ainsi, nous avons pu montrer qu'une accumulation nucléaire de β-caténine corrèle avec la relaxation de tension dans les E-cadhérines observée également dans les cellules leaders.

4.1.2. Lors de la stimulation avec le facteur de croissance HGF

Pour mieux comprendre si cette corrélation entre la relaxation de tension des E-cadhérines et la localisation nucléaire de la β -caténine était valable sous d'autres conditions, nous avons décidé d'utiliser le facteur de croissance HGF pour induire la migration des cellules. En effet, HGF est connu pour induire la dispersion des cellules MDCK (De Rooij et al., 2005), et activer l'expression de gènes dépendant de la voie de signalisation β -caténine (Howard et al., 2011). En effet, dans ce dernier article, les auteurs ont mis en évidence, sur les cellules MDCK, que la stimulation par HGF conduit bien à l'activation des gènes dépendants de la β -caténine grâce au rapporteur TOPFlash. Cette activation par HGF a été mise en évidence également sur d'autres types cellulaires (Apte et al., 2006; David et al., 2008; Liou et al., 2002; Matteucci et al., 2006; Monga et al., 2002; Müller, 2002; Papkoff and Aikawa, 1998; Purcell et al., 2011; Rasola et al., 2007; Soldati et al., 2008; Zeng et al., 2006). Néanmoins, la preuve d'une présence de la β -caténine dans le noyau sous HGF n'est pas toujours montrée de manière claire, notamment dans l'article Howard et al. sur les MDCK, et il est aussi vrai que le rapporteur TOPFlash n'est pas uniquement sensible à la β -caténine (Grumolato et al., 2013).

Dans cette partie, nous avons d'abord vérifié que HGF induit bien sur des cellules MDCK, cultivées à basse densité en ilots, d'abord un étalement des cellules (après quelques minutes), puis la dissociation des contacts (à partir de 3h pour les premiers « trous » jusqu'à 6h), et la migration individuelle des cellules qui deviennent mésenchymateuses (Figure 70.a). Nous avons mis en évidence que sur les trois premières heures, l'aire des cellules est multipliée presque par un facteur deux (Figure 70.b). La vitesse instantanée des cellules n'est pas pour autant augmentée (Figure 70.c).



Figure 70 – a) Images en transmission représentatives des cellules MDCK traitées avec HGF (50ng/ml) pendant 0,1,2,3,4, 6 ou 10h. Les flèches bleues correspondent à l'apparition des premiers trous entre cellules, les pointillés bleus délimitent l'aire de l'ilot de cellules. b) Aire normalisée par rapport à l'aire initiale des cellules à t=0h et pendant 3 heures avec ou sans HGF. c) A droite : images représentatives des noyaux marqués avec du Hoechst des cellules MDCK avec ou sans HGF à t=0h et après t=12h. A gauche : vitesse instantanée entre t et t+20min au début et après 12h avec ou sans HGF en µm/h. Echelle=50µm.

De plus, nous avons observé, au niveau des contacts cellule-cellule, avec la lignée EcadTSMod que l'index FRET augmente sous l'effet de HGF, de telle sorte que les cellules ayant été traitées avec HGF après 5 heures, avant même la rupture de toutes les jonctions cellule-cellule, possèdent un index significativement plus haut que celui des mêmes cellules non traitées par HGF (Figure 71.a). Par contre, il n'y a aucune différence d'index FRET entre les cellules possédant la construction EcadTSMod∆C qui ont été traitées avec ou sans HGF (Figure 71.b). Nous avons choisi dans ce cas de normaliser l'index FRET par rapport à l'index FRET à t=0 pour chaque cellule. En effet, d'une cellule à l'autre et surtout en fonction de la densité des ilots, il peut exister une différence d'index FRET. Nous avons vu, au début de ce chapitre, que l'index FRET des EcadTSMod peut varier en fonction de la densité cellulaire, et même si nous avons essayé de toujours ensemencer les cellules à la même densité, il est plus facile de révéler une variation en normalisant les différences en fonction de l'index FRET de départ des cellules au tout début du traitement avec HGF.

En conclusion, ces expériences soutiennent que la dispersion des cellules sous HGF induit une relaxation de la tension des E-cadhérines supportée par le cytosquelette d'actine.



Figure 71 – a) A droite : carte typique d'index FRET pour les cellules MDCK EcadTSMod avec ou sans HGF (50ng/ml). A Gauche : Changement d'Index FRET mesuré sur EcadTSMod normalisé par la valeur de l'index FRET à t=0 avec ou sans HGF (50ng/ml) après 5 heures. b) Changement d'index FRET mesuré sur EcadTSMod Δ Cyto avec ou sans HGF (50ng/ml) après 5 heures. Echelle=20µm.

D'autre part, nous avons également montré que dans nos expériences avec HGF nous pouvions observer la β caténine au noyau. Pour cela, nous avons utilisé les cellules MDCK β -caténine GFP, et nous avons pu montrer que sous HGF il y avait bien une accumulation significative de la β -caténine au noyau. En effet, l'intensité de fluorescence de la β -caténine GFP dans le noyau comparée à celle du cytoplasme dans les cellules traitées pendant 5 heures avec HGF est deux fois plus importante que pour les cellules non stimulées, où celle-ci se trouve principalement à la membrane (Figure 72).


Figure 72 – A gauche : B-caténine GFP dans les cellules avec ou sans HGF (50ng/ml) après 7 heures. A droite : Intensité de GFP dans le noyau par rapport au cytoplasme après 5 heures avec ou sans HGF. Echelle= 20µm.

Ainsi ces résultats démontrent qu'il existe une corrélation entre la relaxation de tension dans les E-cadhérines, et l'accumulation nucléaire de la β -caténine communes aux deux stimulations que nous avons utilisées pour induire la migration des cellules.

Afin de mieux comprendre cette corrélation, nous pouvons nous intéresser à la temporalité des deux évènements. Un départ de la β -caténine du complexe E-cadhérine/ β -caténine à la membrane implique forcément une relaxation de tension sur la E-cadhérine, car sans la β -caténine la E-cadhérine ne peut plus recruter le cytosquelette d'actine, ainsi nous pourrions toujours expliquer une diminution de la tension des E-cadhérines par un départ de la β -caténine de la membrane. Il faut quand même noter qu'à ce stade, nous n'avons observé qu'une accumulation de la β -caténine au noyau et le départ de la β -caténine reste à prouver. La β -caténine au noyau pourrait provenir uniquement de celle nouvellement synthétisée par exemple.

Pour pouvoir mieux comprendre qui est la cause ou la conséquence de la relaxation de tension des E-cadhérines et de l'accumulation nucléaire de la β -caténine, nous pouvons essayer de savoir temporellement comment ces deux évènements se situent l'un par rapport à l'autre. En effet, si la relaxation survient avant l'accumulation de la β -caténine, nous pourrions exclure que la relaxation de tension pourrait être causée par l'accumulation de la β -caténine. Malheureusement, dans le contexte des expériences décrites plus haut, il nous a été impossible de montrer que l'un des évènements ait lieu avant l'autre pour plusieurs raisons. La première est que la réponse à HGF des cellules MDCK est très hétérogène (Figure 73). Certaines cellules vont s'activer plus vite dans le temps que d'autres, certaines pas du tout. De plus, les mesures qui ont été faites jusqu'ici ont été réalisées dans deux lignées différentes : EcadTSmod pour la tension des E-cadhérines, et β -caténine GFP pour la β -caténine.



Figure 73 – a) Exemple de cellules MDCK β -caténine GFP sous HGF. b) Exemple de profils de variation de l'intensité relative de GFP présente dans le noyau par rapport au cytoplasme pour différentes cellules pour en fonction du temps sous HGF (50ng/ml). La courbe bleu en triangle en bas montre que la cellule ne réagit pas, certaines s'activent dès le début avec un pic à 3 heures, d'autres plus tard et restent activées. Echelle=40 μ m.

Afin d'avoir accès à l'information sur la tension des E-cadhérines et la localisation de la β-caténine à l'échelle de la même cellule, nous avons utilisé une lignée MDCK EcadTSMod avec la β-caténine mCherry. Le taux de transfection de la β-caténine mCherry est très faible dans les cellules exprimant déjà la construction EcadTSMod. Néanmoins, nous avons réussi à observer quelques cellules (Figure 74.a). Grâce aux cellules doublement marquées, nous avons pu corréler dans le temps, l'intensité de fluorescence de la β-caténine mCherry dans le noyau, et le changement d'index FRET normalisé par la valeur de l'index FRET à t=0 qui représente la relaxation de tension dans les E-cadhérines (Figure 74. b).



Figure 74 – a) Images représentatives de cellules EcadTSMod (haut) transfectées avec la β -caténine mCherry (bas). b) Corrélation sous HGF (50ng/ml) de l'intensité normalisée de la β -caténine mCherry présente dans le noyau en fonction de l'index FRET normalisé par la valeur de l'index FRET à t=0 mesuré dans les cellules EcadTSMod – β -caténine mCherry. Le temps est codé en couleurs. c) Coefficient de corrélation entre la β -caténine mCherry dans le noyau et le changement d'index FRET en fonction du temps. Echelle=20µm.

Nous avons mis en évidence que la corrélation entre les deux évènements est plus grande après 2 à 5 heures de stimulation sous HGF (Figure 74. c). Il n'y a pas encore de corrélation entre les deux évènements entre 0 et 2 heures où le niveau de β -caténine nucléaire est encore faible et où la tension des E-cadhérine est encore la même que celle avant l'ajout de HGF. Pour les temps longs (6-7h) où on peut toujours mesurer des contacts cellule-cellule, il semblerait que la tension des E-cadhérines soit plus faible que pour 2-3-4 heures sous HGF, mais que le niveau de β -caténine nucléaire soit toujours en partie élevé. En général, après 6-7 heures de stimulations, les cellules ont perdu un nombre important de contacts intercellulaires, ce que l'on observe ici, sous ceux qui sont toujours formés, ou ceux qui se sont reformés à la suite d'une rencontre avec une autre cellule. Ce sont des résultats qui mériteraient d'être approfondis, mais cela supposerait que la chute de tension observée dans les E-cadhérines est un évènement ponctuel plus court que l'accumulation nucléaire de β -caténine, et qu'après la relaxation de tension dans les E-cadhérines, soit la tension reste faible et les contacts finissent par être désassemblés, soit de nouveaux contacts se forment et avec cette fois-ci une tension semblable à celle avant la stimulation par HGF.

4. Résultats | 4.2 La β -caténine présente à la membrane contribue majoritairement à l'accumulation de celleci dans le noyau.

En Bref :

résumé de la partie 4.1

Lors de la migration collective après blessure de l'épithélium et lors de la stimulation avec le facteur de croissance HGF, nous avons mis en évidence que (1) la β -caténine s'accumule dans le noyau et active la transcription des gènes dépendant de la β -caténine, (2) la tension des E-cadhérines diminue. Ces deux évènements sont concomitants.

Nous avons donc mis en évidence une corrélation entre la relaxation de tension des E-cadhérines et l'accumulation au noyau de la β -caténine.

4.2. La β-caténine présente à la membrane contribue majoritairement à l'accumulation de celle-ci dans le noyau.

Dans cette partie, nous nous intéressons particulièrement à l'hypothétique transport de la β -caténine et aux différents échanges entre compartiments : membrane/ cytoplasme / noyau. En effet, un mécanisme possible pouvant expliquer la concomitance entre la relaxation de tension des E-cadhérines et l'accumulation nucléaire de la β -caténine serait une translocation de la β -caténine membranaire au noyau en même temps qu'une relaxation de tension de tension sur les E-cadhérines.

4.2.1. Quantification de la translocation membrane/noyau de la β -caténine.

Afin de tester l'hypothèse de translocation de la β -caténine membranaire au noyau, nous avons créé une lignée MDCK avec une β -caténine portant le fluorophore mMaple qui est photoconvertible du vert au rouge après photoconversion dans l'UV. Plus de détails sont donnés sur la photoconversion avec mMaple dans la partie 3.3.1.3 Méthodes et Démarches expérimentales. Nous pouvons donc suivre le transport intracellulaire de la β -caténine lors de l'induction de la migration de nos cellules par HGF ou par blessure.

Après 3-4 heures de stimulation avec HGF, la β -caténine présente à la membrane aux contacts cellule-cellule est photoconvertie en rouge. On peut alors suivre son devenir, et observer qu'après quelques minutes celle-ci se retrouve dans le noyau (Figure 75.a). Quantitativement, environ 50% de la β -caténine mMaple photoconvertie à la membrane en rouge entre dans le noyau après 5 min post-photoconvertion pour les cellules stimulées avec HGF, alors que ce ratio n'est pas de plus de 20% pour les cellules non stimulées (Figure 75.b et d). De plus, lors de la migration des cellules après blessure, jusqu'à 60% de la β -caténine mMaple photoconvertie et présente dans le lamellipode des cellules leaders se relocalise dans leur noyau (Figure 75.c et d.).



Figure 75 – a) Localisation de la β-caténine photoconvertible mMaple en fonction du temps dans les cellules après 4 heures de traitement avec HGF. Les pointillés délimitent la zone photoconvertie avec le laser 405nm au niveau des contacts à t=0. La flèche indique l'accumulation nucléaire de la β-caténine mMaple photooncvertie en rouge à la membrane à t=0 après 10 minutes. b) B-caténine photoconvertie dans le noyau en fonction du temps (intensité du canal rouge au temps t sur l'intensité rouge photoconvertie à t=0 pour des cellules leaders, des cellules stimulées 4 heures avec HGF ou sans (contrôle). c) Localisation de la β-caténine photoconvertible mMaple en fonction du temps dans les cellules leaders après 5 heures de migration. Les pointillés délimitent la zone photoconvertie avec le laser 405nm au niveau du lamellipode à t=0. La flèche indique l'accumulation nucléaire de la β-caténine mMaple photoconvertie en rouge à la membrane à t=0 après 20 minutes. d) Fraction de β-caténine mMaple photoconvertie à t=0 dans le noyau après t=10 min dans les cellules non stimulées, 4 heures après ajout d'HGF et dans les cellules leaders. Echelle=20μm (HGF) et 100μm (leaders).

D'ailleurs, le départ plutôt lent de l'ordre de la minute de la β -caténine photoconvertie suggère que la β caténine présente dans le lamellipode est liée à la membrane plutôt que libre dans le cytoplasme (Figure 76.a). Pour vérifier que c'est le cas, nous avons mesuré par FRAP le temps caractéristique d'entrée de la β -caténine GFP $t_{1/2}$ in dans le lamellipode des cellules leaders, celui de la E-cadhérine GFP, de la GFP seule, ainsi que celui de la β -caténine cytoplasmique présente dans les cellules traitées avec LiCl (un inhibiteur de GSK3 β l'un des composants du complexe de dégradation de la β -caténine). Les résultats montrent que le taux d'entrée de la β -caténine GFP dans le lamellipode des cellules leaders est du même ordre de grandeur que celui de la Ecadhérine GFP (Figure 76.b). Ce temps est en effet bien plus long que celui de la GFP ou de la β -caténine GFP cytoplasmique (Figure 76.b).



Figure 76 – a) Gauche : Déclin de fluorescence après photoconversion de la β -caténine mMaple dans le lamellipode de cellules leaders en migration. Droite : moyenne du temps de demi-déclin représentatif du temps caractéristique de sortie de la β -caténine du lamellipode. b) Gauche : Retour de fluorescence après FRAP de la β -caténine GFP, de la E-cadhérine GFP au lamellipode de cellules leaders, ainsi que de la GFP seule cytoplasmique, et de la β -caténine GFP cytoplasmique (sous LiCl). Droite : moyenne des temps de demi-retour représentatif, pour la β -caténine GFP et la E-cadhérine GFP ce temps est caractéristique de l'entrée dans le lamellipode.

Ainsi ces résultats montrent que sous HGF ou lors de la migration collective des cellules après blessure d'une monocouche, plus de la moitié de la β-caténine présente à la membrane peut se déplacer au noyau en quelques minutes, et cette proportion est deux ou trois fois plus élevée que dans des cellules non stimulées.

En définitive, il existe une corrélation entre la relaxation de tension des E-cadhérines et la translocation de la β -caténine de la membrane au noyau qui permet son accumulation.

4.2.2. Différents paramètres peuvent influencer l'accumulation de la βcaténine dans le noyau.

Afin de comprendre comment la β -caténine s'accumule dans le noyau des cellules dans nos deux stimulations, nous avons essayé de tenir compte de tous les évènements pouvant conduire à accumulation nucléaire. En principe, outre la dissociation du complexe E-cadhérine/ β -caténine, un changement du ratio noyau-membrane N/M de la β -caténine pourrait résulter également d'un changement du taux de synthèse de la β -caténine ou de sa dégradation, ou encore du niveau de E-cadhérines disponibles à la membrane. En effet, la dégradation de la β -caténine peut avoir lieu dans le cytoplasme comme directement à la membrane (Maher et al., 2009). Nous avons vu dans la partie 2.3.1 que les processus de régulation et dégradation de la β -caténine sont essentiels, et font intervenir différentes protéines qui vont phosphoryler la β -caténine sur sa partie N-terminale sur ses serines et thréonines pour conduire à son ubiquitination et sa dégradation.

Ainsi pour prendre en compte ces différentes possibilités, nous avons construit un modèle phénoménologique décrivant trois réservoirs pour la β -caténine, où celle-ci peut, après avoir été synthétisée dans le cytoplasme, s'échanger entre la membrane et le noyau, et être dégradée dans tous ces différents compartiments indépendamment (Figure 77).



Figure 77 – Modèle cinétique de la B-caténine avec trois compartiments : membrane, cytoplasme, et noyau. Les flèches représentent les échanges entre compartiments, la synthèse et la dégradation de la 6-caténine avec leur taux correspondant (k) et les constantes d'équilibre thermodynamique (K) lorsqu'elles peuvent être définies.

1.5.2.1 Modèle cinétique

Nous avons donc considéré les concentrations de β-caténine suivantes C, M et N dans le cytoplasme, à la membrane et dans le noyau, respectivement. Si le réservoir de la membrane n'est pas saturé, c'est-à-dire s'il y a assez de E-cadhérines à la membrane pour interagir avec la β-caténine, les différentes équations cinétiques s'écrivent :

$$\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}t} = s - k_{\mathrm{cd}}C - k_{cm}C + k_{\mathrm{mc}}M - k_{\mathrm{cn}}C + k_{\mathrm{nc}}N,$$
$$\frac{\mathrm{d}N}{\mathrm{d}t} = -k_{\mathrm{nd}}N + k_{\mathrm{cn}}C - k_{\mathrm{nc}}N,$$
$$\frac{\mathrm{d}M}{\mathrm{d}t} = -k_{\mathrm{md}}M + k_{\mathrm{cm}}C - k_{\mathrm{mc}}M,$$

Avec s taux de synthèse de la β -caténine, k_{xd} taux de dégradation et k_{xy} taux apparent d'échange où x,y=m membrane, n dans le noyau et c dans le cytoplasme.

A l'équilibre, les solutions s'écrivent :

Ν

$$cn s (k_{mc} + k_{md})$$

 $\frac{k_{\rm cn} s \left(k_{\rm mc} + k_{\rm md}\right)}{k_{\rm mc} k_{\rm cd} k_{\rm nd} + k_{\rm cd} k_{\rm nd} k_{\rm cn} + k_{\rm md} k_{\rm cd} k_{\rm cn} + k_{\rm md} k_{\rm nd} k_{\rm cm} + k_{\rm mc} k_{\rm cd} k_{\rm nc} + k_{\rm cd} k_{\rm md} k_{\rm nc} + k_{\rm md} k_{\rm cm} k_{\rm nc}}$ С

$$(k_{\rm mc} + k_{\rm md})(k_{\rm nd} + k_{\rm nc})$$

 $\frac{s (k_{\rm mc} + k_{\rm md})(k_{\rm nd} + k_{\rm nc})}{k_{\rm mc}k_{\rm cd}k_{\rm nd} + k_{\rm cd}k_{\rm nd}k_{\rm cn} + k_{\rm md}k_{\rm cd}k_{\rm cn} + k_{\rm md}k_{\rm nd}k_{\rm cm} + k_{\rm mc}k_{\rm cd}k_{\rm nc} + k_{\rm cd}k_{\rm md}k_{\rm nc} + k_{\rm md}k_{\rm cm}k_{\rm nc}}$ М

 $\frac{k_{\rm cm} s (k_{\rm nc} + k_{\rm nd})}{k_{\rm mc} k_{\rm cd} k_{\rm nd} + k_{\rm cd} k_{\rm nd} k_{\rm cn} + k_{\rm md} k_{\rm cd} k_{\rm cn} + k_{\rm md} k_{\rm nd} k_{\rm cm} + k_{\rm mc} k_{\rm cd} k_{\rm nc} + k_{\rm cd} k_{\rm md} k_{\rm nc} + k_{\rm md} k_{\rm cm} k_{\rm nc}}$

Le ratio de la β-caténine dans le noyau et à la membrane s'écrit alors :

$$\frac{N}{M} = \frac{k_{\rm cn} \ (k_{\rm mc} + k_{\rm md})}{k_{\rm cm} \ (k_{\rm nc} + k_{\rm nd})}$$

Dans le cas d'un taux de dégradation faible ($k_{\rm md}, k_{\rm nd} \ll k_{\rm mc}, k_{\rm nc}$):

$$\frac{N}{M} = \frac{K_{a,n}}{K_{a,m}}, \qquad \text{où } K_{a,m} = \frac{k_{cm}}{k_{mc}} \text{ et } K_{a,n} = \frac{k_{cn}}{k_{nc}}.$$

De plus, si la membrane est saturée, dans ce cas les équations s'écrivent :

$$M = M_{\text{max}}$$
$$\frac{dC}{dt} = s - k_{\text{cd}}C - k_{\text{cn}}C + k_{\text{nc}}N$$
$$\frac{dN}{dt} = -k_{\text{nd}}N + k_{\text{cn}}C - k_{\text{nc}}N$$

Les solutions à l'équilibre sont les suivantes :

$$M = M_{\text{max}}$$
$$N = \frac{k_{\text{cn}} s}{k_{\text{cd}} k_{\text{nd}} + k_{\text{nd}} k_{\text{cn}} + k_{\text{cd}} k_{\text{nc}}}$$
$$C = \frac{s(k_{\text{nc}} + k_{\text{nd}})}{k_{\text{cd}} k_{\text{nd}} + k_{\text{nd}} k_{\text{cn}} + k_{\text{cd}} k_{\text{nc}}}$$

Le ratio de la β -caténine dans le noyau et à la membrane s'écrit alors :

 $\frac{N}{M} = \frac{k_{\rm cn} s}{M_{\rm max}(k_{\rm cd}k_{\rm nd} + k_{\rm nd}k_{\rm cn} + k_{\rm cd}k_{\rm nc})}.$

Dans le cas d'un taux de dégradation faible on a :

$$\frac{N}{M} = \frac{K_{\mathrm{a,n}}}{M_{\mathrm{max}}} K_{\mathrm{p}}$$
, avec $K_{\mathrm{p}} = \frac{s}{k_{\mathrm{cd}}}$.

Les ratios N/M des différents modèles sont présentés dans la Table 5 ci-dessous :

$\frac{N}{M} =$	Significant degradation rate	Slow degradation rate
Non- limiting membrane reservoir	$\frac{k_{\rm cn}(k_{\rm mc}+k_{\rm md})}{k_{\rm cm}(k_{\rm nc}+k_{\rm nd})}$	$\frac{K_{\rm a,n}}{K_{\rm a,m}}$
membrane reservoir saturation	$\frac{k_{\rm cn} s}{M_{max}(k_{\rm cd}k_{\rm nd} + k_{\rm nd}k_{\rm cn} + k_{\rm cd}k_{\rm nc})}$	$\frac{K_{\rm a,n}}{M_{\rm max}}K_{\rm p}$

Table 5 – Ratio noyau-membrane N/M en fonction des différents modèles avec une faible ou importante dégradation de la 6-caténine, et une quantité de E-cadhérines saturée ou non à la membrane.

Ainsi, on a accès au ratio N/M selon différentes hypothèses et nous avons pu montrer que ce ratio ne peut changer en fonction de la capacité de la membrane, du taux de dégradation ou de synthèse que si on considère que les taux de dégradation sont significativement importants face aux taux apparents d'échange ou si la saturation de la membrane est atteinte. Nous avons donc essayé de mesurer ces différents paramètres dans notre système expérimental.

1.5.2.2 Mesures expérimentales des différentes contributions

<u>Synthèse</u>

Pour tester les différents modèles, nous avons d'abord mesuré la synthèse de la β -caténine en mesurant le retour de fluorescence de la β -caténine GFP après le FRAP total du signal GFP sur cellule entière. Bien que sous le contrôle d'un promoteur exogène la synthèse de la β -caténine GFP peut connaitre des régulations transcriptionnelles (Song et al., 2015). Nous avons pu montrer que le temps nécessaire pour le retour au niveau initial de fluorescence avant le FRAP est supérieur à 5 heures, et surtout ne semble pas être différent avec ou sans HGF (Figure 78).



Figure 78 – A gauche : Images représentatives du retour de fluorescence de la β-caténine GFP au niveau de la cellule entière après photoblanchissement des cellules non stimulées. A droite: Fraction de β-caténine GFP de retour après le FRAP au cours du temps pour des cellules non stimulées et stimulées pendant 4 heures avec HGF. Echelle= 20µm.

En conclusion, la variation de la synthèse *s* de la β -caténine ne peut pas expliquer l'accumulation de β -caténine au noyau.

Saturation à la membrane

Nous avons également évalué si la saturation des E-cadhérines à la membrane pouvait expliquer l'accumulation de β -caténine dans nos conditions. La diminution du niveau total de E-cadhérines est un marqueur du phénotype mésenchymateux. Elle a été observée chez les cellules MDCK où en effet après 12h, la quantification par western blot révèle que l'expression de E-cadhérines est plus faible (Kamei et al., 1999). Néanmoins, dans notre étude avec HGF, nous nous intéressons au début du phénomène sur les premières heures, il est donc peu probable que le niveau de E-cadhérines change sur cette durée. En effet, ces régulations transcriptionnelles du niveau de E-cadhérines sont lentes, car la durée de vie de la E-cadhérine dans les cellules est de 5 à 10 heures (McCrea and Gumbiner, 1991; Shore and Nelson, 1991), donc le changement de niveau d'expression de la E-cadhérine ne peut pas expliquer les modulations rapides de l'adhésion cellule-cellule. De plus, plusieurs études ont montré que pour les cellules MDCK sous HGF sur des temps courts, la quantité de E-cadhérines est constante (De Rooij et al., 2005; Loerke et al., 2012; Maruthamuthu and Gardel, 2014; Weidner et al., 1991). Nous avons donc vérifié que lors de notre stimulation avec HGF, la densité totale de E-cadhérines dans les cellules reste la même pendant au moins 10 heures (Figure 79).



Figure 79 – Intensité totale de EYFP de EcadTSMod normalisée pour chaque cellule par son niveau initial au cours du temps pour des cellules traitées avec HGF.

En conclusion, la régulation des E-cadhérines sous HGF n'est pas suffisante pour justifier l'accumulation de β -caténine dans le noyau dans les premières heures.

Dégradation

Dans certains contextes, la diminution de la dégradation de la β -caténine s'avère suffisante pour induire une accumulation de la β -caténine dans la cellule et au noyau (cf 2.3.2). L'étude de la dégradation de la β -caténine est très documentée pour différents types cellulaires dans le contexte de la voie de signalisation Wnt, mais finalement n'a pas été spécifiquement examinée dans les cellules MDCK sous HGF à l'exception de l'étude de Howard et al. 2011, et jamais lors de la migration collective des cellules MDCK après blessure.

Nous avons donc mesuré le taux de dégradation de la β -caténine en mesurant le déclin de fluorescence dans la cellule entière de la β -caténine mMaple photoconvertie en rouge dans nos différentes conditions pour voir si nous pouvions observer une différence.

Tout d'abord, sans même regarder si les cellules sont stimulées avec ou sans HGF, sont des cellules leaders ou à l'arrière de la migration de la monocouche, on peut observer que les taux de dégradation de la β -caténine mMaple sont de l'ordre de plusieurs heures (Figure 80.a). Cet ordre de grandeur de l'heure est bien plus important que celui des taux d'entrée ou de sortie de la β -caténine à la membrane.



Figure 80 – a) Haut: Images représentatives du déclin de fluorescence de la β -caténine mMaple photoconvertie en rouge à t=0 pour toutes les cellules au cours du temps. Bas : Déclin de fluorescence de la β -caténine mMaple photoconvertie en rouge au cours du temps pour les cellules traitées avec ou sans HGF pendant 4 heures, ainsi que pour des cellules leaders ou à l'arrière du front de migration. b) Moyenne du temps de demi déclin t_{1/2} caractéristique du taux de dégradation en fonction des différentes conditions. c) Moyenne du temps de demi déclin t_{1/2} caractéristique du taux de dégradation pour les mêmes conditions cellules non stimulées en ilot (-HGF) ou confluentes (back) avec ou sans LiCl (30µM). Echelle=20µm.

De plus, la dépendance du taux de dégradation en fonction de la stimulation avec HGF ou de la position des cellules dans la monocouche en migration après blessure est incompatible avec son potentiel rôle dans l'accumulation au noyau de la β -caténine. En effet, les cellules loin de la blessure (en gris) ont un taux de dégradation de la β -caténine bien plus faible que celui des cellules leaders à l'avant alors qu'elles n'ont pas de β -caténine au noyau (Figure 80.b). Nous pouvons voir que sous HGF le taux de dégradation est plus faible qu'en son absence, ce qui est compatible avec ce qui a pu être montré sur d'autres systèmes (Ishibe et al., 2006; Koraishy et al., 2014; Papkoff and Aikawa, 1998). Néanmoins, encore une fois, cette différence ne peut pas être à l'origine de l'accumulation dans le noyau de la β -caténine car pour des cellules confluentes la dégradation est encore plus faible. Nous avons également vérifié, en utilisant un inhibiteur de la dégradation de la β -caténine : LiCl – inhibiteur de GSK3 β – que le taux de dégradation pour des cellules en ilots ou confluentes, est moins important (Figure 80.c).

Nous n'observons pas non plus de différence de dégradation dans les différents compartiments, et les taux d'échange entre compartiments sont beaucoup plus rapides que la dégradation de la β -caténine. Pour confirmer cela, nous avons également mesuré le temps caractéristique d'entrée et de sortie de la β -caténine à la membrane, respectivement noté $t_{1/2 in}$ et $t_{1/2 out}$. Globalement, ces temps d'entrée ou de sortie sont de l'ordre de quelques minutes donc beaucoup plus courts que le temps caractéristique de dégradation (Figure 81.a b et c). C'est également le cas pour les temps caractéristiques d'entrée et de sortie du noyau de la β -caténine (Krieghoff et al., 2006).



Figure 81 – a) Retour de fluorescence de la β -caténine GFP membranaire après photoblanchiment pour des cellules non stimulées ou stimulées 4 heures avec HGF. b) Déclin de fluorescence de la β -caténine mMaple membranaire après photoconvertion en rouge pour des cellules non stimulées ou stimulées 4 heures avec HGF. c) Temps caractéristique de demi retour (t_{in}) et demi déclin (t_{out}) pour la β -caténine GFP et mMaple avec et sans HGF.

Donc nous semblons bien être dans un régime où la dégradation de la β -caténine peut être négligée face aux échanges entre compartiments.

Notre hypothèse est que l'accumulation de la β -caténine dans le noyau peut être due à un changement d'affinité entre la E-cadhérine et la β -caténine avec ou sans HGF. En effet, si on considère être dans un régime où la dégradation est négligeable face aux échanges rapides, le ratio N/M s'exprime comme suit : $\frac{N}{M} = \frac{K_{a,n}}{K_{a,m}}$. Pour changer ce ratio sous HGF, nous supposons que la constante d'affinité $K_{a,m}$ de la E-cadhérine/ β -caténine change avec HGF.

Dès lors : pourquoi n'observons nous pas de différence sous l'effet de HGF pour les temps caractéristiques mesurés à la membrane par FRAP ? Pour cela, nous devons prendre en considération ce qui se « cache » sous la constante apparente d'échange membrane – cytoplasme de la β -caténine. En effet, cette constante apparente tient compte de plusieurs mécanismes : la constante d'affinité entre la E-cadhérine et la β -caténine en fait partie, mais également tout type de transport ou recyclage du complexe à la membrane (de Beco et al., 2009). Si l'on regarde plus attentivement les courbes d'entrée et de sortie de la β -caténine à la membrane, la plus grande différence observée est celle entre le temps caractéristique $t_{1/2}$ mesuré au niveau du lamellipode des cellules leaders et celui au contact cellule-cellule des cellules à l'arrière (Figure 82.a). Il s'avère que cette différence est en réalité plus globalement observable entre le $t_{1/2}$ d'entrée d'une membrane libre où la partie extracellulaire de la E-cadhérine n'est pas engagée avec une autre E-cadhérine (lamellipode d'une cellule leader, ou membrane basale de n'importe quelle cellule) et celui d'une membrane engagée dans un contact cellule-cellule pour une cellule en ilot ou à confluence (Figure 82.b).



Figure 82 – a) Retour de fluorescence de la β -caténine GFP (bleu) et de la E-cadhérine GFP (rose) après photoblanchiment au niveau d'un contact cellule-cellule à confluence (HD) ou au niveau du lamellipode pour une cellule leader. b) Temps caractéristique $t_{1/2}$ en fonction du % de fraction mobile issus du fit des courbes de retour de fluorescence, pour les différentes conditions : la β -caténine GFP et la E-cadhérine GFP au niveau d'un contact cellule-cellule à confluence (HD) ou en ilots (LD), de la membrane basale, du lamellipode des cellules leaders, ainsi que de la β -caténine GFP cytoplasmique sous LiCl et la GFP libre.

Ces différences de $t_{1/2}$ d'entrée de la β -caténine ou de la E-cadhérine à la membrane libre comparée à un contact reflète très certainement le phénomène d'endo/exocytose qui explique pourquoi l'échange à la membrane de la β -caténine ou de la E-cadhérine est plus grand quand le complexe n'est pas engagé dans un contact cellule-cellule, comme sur la Figure 82. En effet, les E-cadhérines sont immobilisées à la membrane qu'elles soient engagées ou non dans une interaction avec le domaine EC1 d'une autre cadhérine mais n'ont pas la même dynamique (Erami et al., 2015).

Ainsi pour expliciter à la fois l'affinité entre la E-cadhérine et la β -caténine lors des évènements d'association/dissociation, mais également les phénomènes d'endo/exocytose du complexe, nous pouvons réécrire le modèle comme sur la Figure 83.



Figure 83 – Modèle cinétique de la β-caténine tenant compte des évènements d'endo-exocytose. Les flèches représentent les échanges entre compartiments, la synthèse et la dégradation de la β-caténine avec leur taux correspondant (k) et les constantes d'équilibre thermodynamique (K) lorsqu'elles peuvent être définies. B, N, M et C représentent respectivement les concentrations de la β-caténine libre dans le cytoplasme, dans le noyau, du complexe β-caténine/E-cadhérine à la membrane, et dans le cytoplasme.

On peut réécrire les lois cinétiques comme suit :

$$\frac{dN}{dt} = k_{cn}B - k_{nc}N,$$

$$\frac{dB}{dt} = s - k_{cd}B - 2k_{+}B + k_{-}(M+C) - k_{cn}B + k_{nc}N,$$

$$\frac{dC}{dt} = k_{+}B - k_{-}C + k_{endo}M - k_{exo}C,$$

$$\frac{dM}{dt} = k_{+}B - k_{-}M - k_{endo}M + k_{exo}C,$$

avec *B*, *M* et *C* les concentrations de la β -caténine libre dans le cytoplasme, du complexe β -caténine/Ecadhérine à la membrane, et dans le cytoplasme et $k_{+,-}$ la constante d'association/dissociation du complexe et $k_{\text{exo,endo}}$ la constante d'exo/endocytosis...

A l'équilibre, les solutions s'écrivent :

$$N = \frac{s \ k_{cn}}{k_{cd} \ k_{nc}} = K_{p} K_{a,n,}$$

$$B = \frac{s}{k_{cd}} = K_{p},$$

$$C = K_{p} K_{a,Ecad} \left(\frac{k_{-} + 2k_{endo}}{k_{-} + k_{endo} + k_{exo}} \right),$$

$$M = K_{p} K_{a,Ecad} \left(\frac{k_{-} + 2k_{exo}}{k_{-} + k_{endo} + k_{exo}} \right),$$
Avec $K_{a,Ecad} = \frac{k_{+}}{k_{-}}.$

Ainsi le ratio noyau/membrane de la β-caténine s'écrit :

$$\frac{N}{M} = \frac{K_{a,n}}{K_{a,Ecad}} \left(\frac{k_{-} + k_{exo} + k_{endo}}{k_{-} + 2k_{exo}} \right)$$

Si $k_{exo}, k_{endo} \gg k_{-}$, alors $\frac{N}{M} = \frac{K_{a,n}}{K_{a,Ecad}} \cdot \frac{1}{2} \cdot (1 + K_{exo/endo})$, avec $K_{exo/endo} = \frac{k_{exo}}{k_{endo}}$,
alors, $\frac{N}{M} = \frac{K_{a,n}}{K_{a,Ecad}}$.

Ainsi, entre les taux d'association/dissociation et d'endo/exocytose, c'est le phénomène le plus lent qui va apparaitre dans la constante apparente d'échange lors des expériences de FRAP. Ainsi les phénomènes d'endo/exocytoses masquent dans nos expériences de FRAP l'accès à la constante $K_{a,Ecad}$ si nous ne sommes pas dans un régime d'échange endo/exo très rapide (k_{exo} , $k_{endo} \gg k_{-}$), ce qui semble être le cas.

En conclusion, nous ne pouvons pas mesurer le changement d'affinité entre la E-cadhérine et la β-caténine lors de nos perturbations, même s'il survient. Par ailleurs, l'accumulation de la β-caténine dans le noyau ne peut pas être expliquée par un changement de taux de dégradation ou de synthèse de celle-ci, ni par une chute du niveau de E-cadhérines à la membrane.

4.2.3. Est-ce que la translocation de la β -caténine est spécifique aux cellules en migration?

Dans nos stimulations sous HGF et lors de la migration collective des cellules après blessure, nous avons montré que l'accumulation de β -caténine ne peut s'expliquer ni par une différence de taux de synthèse ou de dégradation de la β -caténine, ni par une saturation des E-cadhérines à la membrane. Notre hypothèse suppose qu'une translocation de la β -caténine de la membrane au cytoplasme peut permettre une accumulation de celle-ci dans le noyau. Ce changement de translocation pourrait être dû à un changement d'affinité entre la Ecadhérine et la β -caténine lors de nos stimulations qui induisent la migration des cellules. Nous n'avons pas pu mesurer directement ce changement d'affinité, mais nous avons pouvons tester si cette translocation de la membrane au noyau est un phénomène caractéristique des cellules en migration, ou s'il s'agit d'un processus générique dès que la β -caténine est présente au noyau.

Pour tester cette hypothèse, et comme la dégradation n'est pas responsable de cette translocation, nous avons observé les cellules MDCK β -caténine mMaple sous LiCl, un inhibiteur de la dégradation de la β -caténine. Ce traitement induit une accumulation de la β -caténine partout dans la cellule et notamment au noyau sans induire la dispersion ou la migration des cellules (Hedgepeth et al., 1997)(Figure 84 .a).



Figure 84 – a) Cellules MDCK β-caténine GFP traitées 5 heures avec LiCl (30mM). b) Localisation de la β-caténine photoconvertible mMaple en fonction du temps dans les cellules après 5 heures de traitement avec LiCl. Les pointillés délimitent la zone photoconvertie avec le laser 405nm au niveau des contacts à t=0. c) Fraction de β-caténine mMaple photooconvertie initialement à la membrane dans le noyau après 10 minutes pour les cellules non stimulées, stimulées 4 heures avec HGF, 5 heures avec LiCl, et des cellules leaders. d) Changement d'index FRET pour les cellules MDCK EcadTSMod traitées pendant 5 heures avec LiCl (30mM). Echelle=20μm.

Nous avons donc photoconverti en rouge la β-caténine mMaple présente à la membrane après 4-5 heures de traitement avec LiCl et suivi le transport membrane/noyau du signal rouge (Figure 84.b). La quantité de β-caténine mMaple photoconvertie à la membrane qui entre dans le noyau n'est pas significativement différente de la celle des cellules non stimulées (Figure 84.c). Elle ne dépasse pas les 30% après 5 minutes, alors qu'elle est bien plus élevée pour les cellules leaders ou traitées avec HGF.

De manière intéressante, il s'avère que l'index FRET mesuré dans les cellules MDCK EcadTSMod traitées pendant 5 heures avec ou sans LiCl, est le même, ce qui signifie que l'on n'observe pas de relaxation de tension dans les E-cadhérines (Figure 84.d). Malgré l'accumulation de β-caténine dans le noyau sous LiCl, la tension dans les E-cadhérines est la même que celle des cellules non stimulées.

Ces résultats montrent que (1) la translocation de la membrane au noyau de la β -caténine est spécifique aux cellules qui ont été stimulées pour migrer et où il y a une relaxation de tension dans les E-cadhérines et que (2) la relaxation de tension observée dans les E-cadhérines n'est pas une conséquence de l'accumulation de β -caténine au noyau.

En Bref :

résumé de la partie 4.2

- La β -caténine présente à la membrane contribue à l'accumulation nucléaire de la β -caténine.

- Pour les cellules en migration sous HGF ou après blessure d'une monocouche, l'accumulation nucléaire de la β -caténine est une conséquence du départ de la membrane de la celle-ci, et est concomitant avec une relaxation de la tension dans les E-cadhérines.

- Cette accumulation n'est ni due à un changement de le taux de dégradation ou de synthèse de la β-caténine, ni à une saturation à la membrane des E-cadhérines, mais pourrait être expliquée par un changement d'affinité de la E-cadhérine avec la β-caténine (ce qui n'est pas mesurable par photomanipulation).

- La relaxation de tension des E-cadhérines n'est pas une conséquence de l'accumulation de β -caténine au noyau.

4.3. La relaxation des cadhérines et la translocation de la β -caténine dépendent d'une voie de signalisation impliquant les kinases Src et FAK.

Nous avons mis en évidence qu'il existe une corrélation entre la relaxation de tension des E-cadhérines, et l'activation de la voie de signalisation β -caténine lorsque les cellules sont en migration après traitement avec HGF, et lors de la fermeture d'une blessure sur la monocouche. Ces deux évènements sont concomitants. De plus, la β -caténine membranaire contribuer majoritairement à l'accumulation nucléaire de la β -caténine. Pour l'instant, nous ne pouvons pas savoir si le départ de la β -caténine de la membrane est la cause de la relaxation de tension des E-cadhérines, ou si au contraire, la relaxation de la tension des E-cadhérines permet de libérer la β -caténine de la membrane. Nous avons pu montrer en manipulant le niveau total de β -caténine avec LiCl que ce n'est pas parce que la β -caténine se trouve dans le noyau que la tension des cadhérines est plus faible. La relaxation de tension des E-cadhérines n'est donc pas une conséquence à long terme de l'accumulation nucléaire de la β -caténine et de la transcription de certains gènes qui à leur tour modifieraient la tension des E-cadhérines.

Afin de pouvoir mieux comprendre cette corrélation, nous nous intéressons aux potentiels partenaires et voies de signalisation qui pourraient intervenir lors de la stimulation avec HGF et la migration collective des cellules après blessure. Dans cette partie, nous allons particulièrement décrire le rôle des kinases Src et FAK. L'activité de la kinase Src a déjà été mise en évidence comme une nécessité pour l'activation mécanique de la β-caténine. Nous souhaitons savoir si c'est le cas aussi dans nos stimulations, si la kinase Src est nécessaire également pour la relaxation de tension des E-cadhérines ou non, et si son rôle est de phosphoryler la β-caténine pour la détacher des E-cadhérines.

4.3.1. L'activité de Src est nécessaire mais ses cibles ne sont ni la cadhérine ni la β -caténine.

Dans de nombreux systèmes modèles, la localisation nucléaire de la β -caténine, ainsi que son activation à la suite d'une stimulation mécanique nécessite l'activité de la kinase Src (Benham-Pyle et al., 2016; Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008; Whitehead et al., 2008). Src peut phosphoryler la tyrosine 654 de la β -caténine *in vitro*, ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité de la β -caténine pour la E-cadhérine, et est également considéré comme suffisant pour dissocier le complexe E-cadhérine/ β -caténine dans les cellules (Bonvini et al., 2001; Jean et al., 2009; Roura et al., 1999; van Veelen et al., 2011; Zeng et al., 2006)(Roura et al., 1999). Dans ce paragraphe, nous nous intéressons donc au rôle de Src dans notre système et en particulier concernant la relaxation de tension de E-cadhérines.

a) Nécessité de l'activité kinase de Src

Afin de tester la nécessité de l'activité kinase de Src, nous avons choisi d'utiliser PP1 un inhibiteur pharmacologique des kinases de la famille de Src dans nos stimulations avec HGF et lors de la blessure de monocouches.

Sur les ilots de cellules MDCK traités avec HGF, l'inhibition de Src par 25μ M de PP1 est caractérisée par une diminution de l'étalement des cellules, une diminution de leur dispersion ainsi que de l'accumulation nucléaire de la β -caténine (Figure 85.a et b). De plus, elle s'accompagne d'un arrêt de la relaxation de tension des E-cadhérines, comme on peut le voir sur la Figure 85.c où l'index FRET mesuré est bien plus bas pour les cellules traitées avec HGF et PP1 simultanément même après 5 heures que pour les cellules traitées avec HGF. Ces résultats sont donc compatibles avec une nécessité de l'activité kinase de Src pour induire la dispersion, l'accumulation nucléaire de la β -caténine et la relaxation de la E-cadhérine.



Figure 85 – a) Images représentatives de la β -caténine GFP dans les cellules traitées avec ou sans HGF (50ng/ml) et PP1 (25 μ M). b) Intensité de la β -caténine GFP dans le noyau comparé au cytoplasme après 5 heures de stimulation avec ou sans HGF et PP1. c) Changement d'index FRET mesuré après 5 heures pour les cellules EcadTSMod avec ou sans HGF et PP1.Echelle=20 μ m.

Dans le cas de la migration des cellules après blessure, l'ajout de 75µM de PP1 prévient la migration de la monocouche, comme il avait été montré dans Matsubayashi et al. 2004 (Matsubayashi et al., 2004). La vitesse de migration est mesurée à partir de la distance moyenne parcourue par le front pendant une heure au cours des 15 heures d'observation. Celle-ci est considérablement diminuée quand les cellules sont traitées avec 161

 75μ M de PP1 où elles n'avancent quasiment plus au début et où il n'y a presque plus de formation de cellules leaders au front (Figure 86.a et b). Si l'on quantifie la présence de β -caténine GFP dans le noyau des cellules au front (à défaut de trouver des cellules leaders au front), on observe une chute drastique du niveau de β caténine mesuré dans le noyau (Figure 86.b). De même, on n'observe pas de relaxation de tension des Ecadhérines au front (Figure 86.c).



Figure 86 – a) Top : Images représentatives de la localisation de la β -caténine GFP lors de la migration d'une monocouche de cellules après blessure avec ou sans PP1 (75 μ M) à t=0 ou t=6heures. Bas : vitesse de migration (distance moyenne parcourue par le front de migration en 1h) avec ou sans PP1 (75 μ M). b) Intensité de GFP présente dans le noyau après 5 heures de migration pour les cellules leaders ou au front en l'absence de leaders avec PP1 et à l'arrière avec ou sans PP1. c) Index FRET des cellules EcadTSMod mesuré pour des cellules leaders ou à défaut au front de migration avec PP1 et à l'arrière avec ou sans PP1. Échelle=100 μ m.

Par contre, si l'on traite les cellules avec seulement 25μ M de PP1, l'avancement de la monocouche est plus lent mais les cellules migrent (Figure 87.a). Si l'on regarde plus précisément ce qui se passe au début, les cellules sont plutôt à l'arrêt dans les toutes premières heures pour finalement retrouver un avancement et un profil de migration normaux par la suite. Une fois que la migration est lancée, on retrouve de la β -caténine dans le noyau des cellules leaders ainsi qu'une relaxation de tension dans les E-cadhérines (Figure 87.b et c). Tout se passe comme si à 25μ M de PP1 on observait juste un délai de quelques heures avant la migration, alors que sous 75 μ M de PP1 on prévient cette migration pendant plus de 10 heures.



Figure 87 - a) Vitesse de migration (distance moyenne parcourue par le front de migration en 1h) avec ou sans PP1 à 75 μ M ou à 25 μ M. b) Images représentatives de la localisation de la β -caténine GFP lors de la migration d'une monocouche de cellules après blessure avec ou sans PP1 (25 μ M) à t=0 ou t=6heures. c) Index FRET des cellules EcadTSMod traitées avec PP1 (25 μ M) lors de la migration collective des cellules pendant 18 heures. En noir : cellules à l'arrière du front de migration ;

rouge : cellules au front au début quand la monocouche avance peu, et qui deviennent des leaders par la suite. Échelle=100μm.

b) Activation de la kinase Src

Bien que ces résultats soient compatibles avec une nécessité des kinases Src en amont de la translocation de la β -caténine et de la relaxation de tension des E-cadhérines, nous avons voulu aller plus loin afin de tester si l'activité de Src est constitutive ou déclenchée/augmentée lors de nos perturbations.

Peu de choses sont connues sur le rôle de l'activité Src lors de la migration collective des cellules MDCK. Son activité a été montrée comme nécessaire (Matsubayashi et al., 2004). L'expression de la forme vSrc, dont la partie C terminale est tronquée, et dont l'activité est en conséquence constitutive, peut perturber la cohésion de la monocouche (Behrens et al., 1993), et conduire à la désorganisation des jonctions cellule-cellule (Woodcock et al., 2009). Sur les cellules en ilots, l'expression exogène de Src ou d'une forme constitutivement active de Src peut induire un phénotype migratoire sans aucune stimulation avec HGF (Avizienyte et al., 2002; Behrens et al., 1993; Kadono et al., 1998; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Palovuori et al., 2003; Takeda et al., 1995).

Sous HGF, plusieurs études sur des types cellulaires différents ont montré que la kinase pouvait s'activer (Chen et al., 1998; Empereur et al., 1997; Grano et al., 1996; Mao et al., 1997; Ponzetto et al., 1994; Popsueva et al., 2003; Rahimi et al., 1998; Woodcock et al., 2009), mais ce à des échelles de temps très différentes allant de plusieurs heures quand les cellules ont déjà adopté un phénotype mésenchymateux ou dans les premières 30 minutes après la stimulation. Sur les cellules MDCK, seul un article a montré que dans la première heure sous HGF, l'activité de Src est augmentée (Popsueva et al., 2003).

Nous nous sommes donc intéressés au niveau d'activité de Src dans nos cellules MDCK. La conformation de Src peut nous indiquer si la kinase est sous sa forme active ou non. En effet, la kinase Src comprend différents domaines : un domaine permettant l'ancrage à la membrane grâce à sa glycine terminale qui peut être myristylée ; un domaine SH3 qui interagit avec les séquences riches en proline PxxP ; un domaine SH2 qui interagit avec les tyrosines phosphorylées ; un domaine kinase qui comporte un site de fixation de l'ATP et un site d'autophosphorylation sur tyrosine en Y419 ; et enfin une queue C-terminale constituant un domaine régulateur de l'activité kinase avec la tyrosine Y530 qui est phosphorylée en conformation fermée (Figure 88.a). Ainsi, la kinase Src peut se trouver dans les cellules sous deux formes : une forme fermée inactive, et une forme ouverte (Figure 88.b). Dans la conformation inactive fermée, le domaine SH2 interagit avec Y530 phosphorylée et le domaine SH3 avec une séquence riche en proline, ce qui maintient le domaine kinase dans une conformation contrainte. Dans la conformation active, le SH2 et le SH3 n'interagissent plus avec des domaines intramoléculaires et peuvent se fixer sur les substrats partenaires; le domaine kinase est dans une conformation ouverte et peut s'autophosphoryler et phosphoryler des substrats.



Figure 88 – a) Structure de Src comprenant en N terminal un domaine d'interaction avec la membrane, puis un domaine SH3, puis un domaine SH2, un domaine kinase, et enfin une queue en C terminale permettant de réguler l'activité kinase. b) A gauche conformation fermée inactive de la kinase ; A droite : conformation ouvert et active de Src.

Pour évaluer l'activation de la kinase Src, on peut déterminer le niveau d'autophosphorylation de la tyrosine 419 de Src qui témoigne de sa forme ouverte. Pour cela, nous pouvons mesurer grâce à des anticorps spécifiques de cette phosphorylation, le niveau de forme active de Src par rapport à la quantité totale de Src par western blot. Nous avons mesuré ce rapport à différents points de temps sous HGF, et nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une sur-activation de Src sous HGF par rapport au niveau basal d'activation (Figure 89). Cela suggère que Src est déjà actif dans les cellules MDCK en ilots.



Figure 89 – Western blot typique du lysat de cellules MDCK stimulées ou non avec HGF après 5, 15, 30 minutes, 1, 2, 4, ou 6 heures et révélé pour Src total, la forme active de Src phosphorylée en Y419, et GAPDH (ici marqueur de la quantité totale de protéines chargées en fonctions des conditions).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons voulu trouver un autre outil qui nous permettait de suivre l'activité kinase de Src au cours de la stimulation avec HGF plus facilement. Pour cela, nous avons utilisé un biosenseur FRET de l'activité kinase de Src dont la mesure de l'index FRET permet d'avoir accès à l'activité endogène de Src dans les cellules vivantes et en dynamique. Brièvement, ce senseur est décrit dans la partie Matériel et Méthodes, et il est constitué de deux fluorophores un accepteur et un donneur, d'un domaine SH2 qui reconnait les tyrosines phosphorylées, et d'une séquence peptidique substrat de Src. Une diminution de l'index FRET signifie que l'activité kinase de Src est plus importante (Figure 90.a).

Nous utilisons donc ce biosenseur FRET Kras-Src adressé à la membrane comme rapporteur de l'activité de Src. Pour les cellules stimulées avec HGF durant les 5 premières heures, la mesure de l'index FRET montre qu'il n'y a pas de différence avec les cellules non stimulées (Figure 90.b). Par contre, si l'on transfecte aux cellules MDCK avec le biosenseur Kras-Src un mutant mCherry de Src constitutivement activé grâce à la mutation Y530F qui lui permet de rester sous forme ouverte et donc d'être potentiellement toujours actif, nous observons que l'index FRET est plus faible que pour des cellules contrôles (Figure 90.b). Ceci signifie que le biosenseur Kras-Src peut détecter une activité kinase comme nous l'avons vu dans la partie Matériel et Méthodes. Inversement, l'ajout de l'inhibiteur PP1 induit une augmentation de l'index FRET du senseur Kras-Src (Figure 90.b).



Figure 90 – a) Schéma du biosenseur FRET d'activité kinase Kras-Src. Plus il y a d'activité, plus le FRET est bas. b) Index FRET mesuré par le senseur Kras-Src dans les cellules non stimulées, stimulées 1 heure avec HGF, ou avec PP1, transfectées avec un mutant constitutivement actif de Src (Src Y530F mCherry) et stimulées plus de 10 heures avec HGF. Echelle=20µm.

PP1 permet bien de diminuer l'activité kinase de Src, et ces résultats indiquent qu'une partie des kinases Src sont constitutivement actives dans les cellules MDCK non stimulées. Par contre, l'ajout de HGF ne semble pas sur-activer Src au début de la stimulation. Cependant si on regarde le niveau de l'index FRET après 15 heures d'HGF, on peut voir que celui-ci est plus bas, ce qui révèle que lorsque les cellules MDCK sont sous forme mésenchymateuse elles ont un niveau de Src actif plus important (Figure 90.b).

Ensuite, nous avons voulu également déterminer le niveau d'activité de Src lors de la migration collective des cellules en fonction de leur position soit de leaders, soit à l'arrière du front de migration. De manière surprenante, nous avons observé que l'index FRET mesuré avec le senseur Kras-Src dans les cellules leaders est plus haut que celui des cellules à l'arrière (Figure 91). Ceci signifie que l'activité de Src est plus importante dans les cellules à l'arrière par rapport aux leaders. Néanmoins le niveau d'activité des leaders parait suffisamment élevé pour être permissif à la relaxation des E-cadhérines et la translocation de la β-caténine qui survient dans ces cellules. En effet, lorsqu'on ajoute l'inhibiteur de Src, PP1, sur les cellules confluentes et en migration, l'index FRET du senseur Kras-Src est plus élevé que sans PP1 (Figure 91). Ces résultats confirment que Src est constitutivement activé dans les cellules confluentes et les cellules migrantes lors de la cicatrisation de la blessure.



Figure 91 – Index FRET mesuré pour les cellules MDCK Kras-Src, après 15 heures de migration collective, dans les cellules leaders, et les cellules à l'arrière du front de migration (point gris). Ces mêmes cellules leaders ou à l'arrière sont ensuite traitées 10 minutes sous 25µM de PP1 (point bleu). Index FRET mesuré pour les cellules MDCK Kras-Src YY-FF, senseur inactif de Src, après 15 heures de migration après blessure, dans les cellules leaders, et les cellules à l'arrière du front de migration (point gris foncé).

Par contre, ces résultats soulèvent d'autres questions vis-à-vis de cette différence d'activité de Src entre cellules leaders et cellules à l'arrière du front de migration. On peut noter qu'une différence similaire a été observée au front de cellules endothéliales individuelles en migration, sans que le mécanisme en soit compris (Zhuo et al., 2015). Nous avons voulu tester si la différence de niveau de FRET ne serait pas due non pas à une réelle différence d'activité de Src, mais à un artéfact à la mesure du signal FRET en fonction de leur localisation dans l'épithélium. Pour vérifier l'existence de ce potentiel biais, nous avons utilisé une construction mutante du senseur Kras-Src YY \rightarrow FF qui n'est plus sensible à l'activité de la kinase Src endogène. En effet dans ce mutant, les deux tyrosines substrat de Src ont été mutées, ainsi le domaine SH2 du senseur ne peut plus reconnaitre les tyrosines phosphorylées, et le senseur est en position fermée tout le temps avec un index FRET élevé. Aucune différence n'est observée lors de l'utilisation de mutant inactif du senseur Kras-Src YY→FF entre les cellules leaders et les cellules à l'arrière du front de migration. Dès lors, la différence que l'on observe entre les cellules à l'avant et les cellules à l'arrière n'est pas due à un artefact de localisation, mais peut être bien à une réelle différence de niveau d'activité de Src. Nous n'avons pas approfondi davantage ce point, mais on peut quand même garder en tête que cette différence pourrait être due également à (1) une certaine non spécificité du senseur Kras-Src à la kinase Src, ou à (2) l'adressage spécifique du senseur Src avec le tag Kras à la membrane exclue de radeaux lipidiques. En effet, il a déjà été mis en évidence que l'adresse avec un tag Kras ou Lyn pouvait révéler des différences d'activités de la kinase Src en fonction de sa localisation dans la cellule (Seong et al., 2011a).

En conclusion, les résultats apportés par le biosenseur Kras-Src nous ont quand même permis de mettre en évidence le rôle constitutivement actif de Src, qui est nécessaire à la relocalisation de la β -caténine et la relaxation de tension des E-cadhérines.

c) La 6-caténine comme cible de Src

L'une des cibles privilégiées dans le modèle proposé par les équipes d'E. Farge et J. Nelson pour Src est la βcaténine. En effet, les travaux précédents ont montré que la β-caténine se trouve sous sa forme phosphorylée pour la tyrosine 654 lors des stimulations mécaniques (Benham-Pyle et al., 2016; Desprat et al., 2008). Or cette phosphorylation peut être causée par la kinase Src, comme cela a été montré *in vitro* (Roura et al., 1999) et dans les cellules (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993; Hazan and Norton, 1998; Matsuyoshi et al., 1992).

Nous avons voulu déterminer si le niveau de β -caténine phosphorylée est plus élevé dans nos stimulations sous HGF ou dans les cellules leaders. Pour cela, nous avons testé différents anticorps spécifiques de la forme phosphorylée en Y654 de la β -caténine (cf 3.3.3 partie sur les western blot). Tout d'abord, il est important de noter que fixer les cellules, pour observer la β -caténine par immunofluorescence, ne semble pas être une bonne idée, puisque même sur les cellules MDCK β -caténine GFP avec HGF, nous n'avons pas été capables de trouver les bonnes conditions pour conserver la β -caténine dans le noyau des cellules aussi bien que ce que nous avons pu observer dans les cellules vivantes. Nous avons donc essayé d'évaluer le niveau de β -caténine phosphorylée dans nos stimulations par western blot. Pour cela, les cellules MDCK ont été traitées avec HGF, ou PP1 pendant 5 heures. De plus, afin de tester l'anticorps anti-phospho Y654, et augmenter de manière artificielle le niveau de phosphorylation des tyrosines dans la cellule, les cellules ont été incubées pendant 1 heure avec de l'orthovanadate, un inhibiteur des tyrosinephosphatases. Nous avons donc évalué la proportion de β -caténine phosphorylée en Y654 (Figure 92.a). Aucune augmentation notable sous HGF n'est observée, seule une diminution du niveau de β -caténine phosphorylée en Y654 sous PP1 est à noter (Figure 92.b). Une partie de la β -caténine est donc constitutivement phosphorylée en Y654.



Figure 92 - a) Western Blot typique du lysat de cellules MDCK stimulées ou non avec HGF (5h), PP1 (5h) ou incubées 1 heure avec 50 μ M de Na₃VO₄ (V), révélé pour la β -caténine totale, sa forme phosphorylée Y654, et l' α -tubuline comme marqueur de charge. b) Niveau de phosphorylation pour la β -caténine en Y654 normalisé par rapport à la quantité totale de β -caténine pour les cellules traitées en a). c) Western Blot typique du lysat de cellules MDCK, MDCK β -caténine GFP, MDCK β -caténine GFP Y654E, et MDCK β -caténine GFP Y654F, révélé pour la β -caténine totale, sa forme phosphorylée Y654. En pointillés jaunes : bandes correspondants à la β -caténine GFP Y654E et Y654F qui ne peuvent pas être reconnues par l'anticorps spécifique de phosphorylation de la β -caténine en Y654.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons voulu évaluer leurs fiabilités en testant la spécificité des anticorps. Nous avons choisi d'utiliser des phospho-mutants de la β-caténine GFP en remplaçant la tyrosine 654 par une phénylalanine (Y654F) qui ne pourra plus être phosphorylée, et par un acide glutamique (Y654E) qui lui possède une charge négative comme le groupe tyrosine-phosphate et donc mime l'état phosphorylé. Normalement, si l'anticorps est très spécifique de la forme phosphorylée en Y654 de la β-caténine, il ne devrait pas y avoir de 167 bande au niveau de la β -caténine GFP Y654F à 130kDa, et seulement au niveau de la β -caténine endogène à 90 kDa. Or, ce n'est pas ce qui est observé sur la Figure 92.c. En effet, les deux anticorps utilisés ne semblent pas forcément vraiment très spécifiques de la phosphorylation de la β -caténine dans nos conditions puisqu'ils sont capables de détecter le mutant Y654F de la β -caténine GFP aussi bien que le WT ou le mutant Y654E.

Nous avons alors essayé d'évaluer le niveau de phosphorylation de la β -caténine par immunoprécipitation de la β -caténine grâce à son étiquette GFP, et détection de toutes les tyrosines phosphorylées avec un anticorps spécifiques de tyrosines phosphorylées. Là encore, nous n'avons pas pu vraiment déterminer quel était le profil de phosphorylation de la β -caténine en condition avec ou sans HGF et/ou avec PP1 (Figure 93.a). La seule chose que nous pouvons conclure est qu'il semble que même dans la condition contrôle c'est-à-dire sans HGF, une certaine proportion de β -caténine soit phosphorylée et l'ajout de l'inhibiteur des kinases Src, PP1, prévient cette phosphorylation (Figure 93.b).



Figure 93 - a) Western blot typique des cellules MDCK β -caténine GFP, stimulées ou non avec HGF (5h), PP1 (5h), après immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP, révélé pour la β -caténine totale et les tyrosines phosphorylées. . b) Niveau de phosphorylations pour la β -caténine GFP normalisé par rapport à la quantité totale de β -caténine GFP pour les cellules traitées en a).

Ces premiers résultats par western blot, ont permis de mettre en évidence que la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β-caténine sous HGF n'est pas si importante quantitativement car nous n'avons pas pu la mettre en évidence facilement avec nos anticorps anti-tyrosine. Par contre, l'utilisation de l'inhibiteur des kinases Src, lui, permet de diminuer la quantité de β-caténine phosphorylée en Y654.

Afin de déterminer le rôle de la phosphorylation de la β -caténine, nous avons également, utilisé des phosphomutants de la β -caténine GFP en remplaçant la tyrosine 654 par une phénylalanine (Y654F) qui ne pourra plus être phosphorylée, et par un acide glutamique (Y654E) qui mime l'état phosphorylé. Ces deux mutants : nonphosphorylable (Y654F) et phophomimétique (Y654E) sont les mêmes que ceux utilisés dans le western blot de la Figure 92.c, et ont déjà été caractérisés (cf 2.2). Notamment, *in vitro* l'affinité de la E-cadhérine avec le mutant Y654F est sensiblement la même que celle avec la β -caténine WT non phosphorylée, et le mutant Y654E a lui une affinité avec la E-cadhérine comparable à celle de la β -caténine phosphorylée par Src, et donc plus faible (cf partie 2.4).

Lorsque l'on exprime dans les cellules MDCK les mutants β-caténine GFP Y654F et Y654E, on peut observer que dans les deux cas, la β-caténine se trouve principalement au niveau de la membrane et des contacts cellulecellule (Figure 94.a). En particulier, même le mutant Y654E pourtant phosphomimétique se retrouve à la membrane, très certainement car il est en interaction avec la E-cadhérine.



Figure 94 – a) Images représentatives de la β-caténine GFP pour les mutants Y654E (haut) et Y654F (bas) dans les cellules sans HGF et avec HGF. Les flèches soulignent la localisation à la membrane des mutants dans les conditions contrôles sans stimulation. Les étoiles indiquent la localisation nucléaire des mutants de β-caténine sous HGF. b) Intensité de fluorescence de la GFP mesurée dans le noyau pour les cellules WT, β-caténine GFP Y654F et Y654E après 7 heures de stimulation avec ou sans HGF. c) Images représentatives de la β-caténine GFP pour les mutants Y654E (à gauche) et Y654F (à droite) dans les cellules après 5 heures de migration collective. Echelle=20μm (HGF) Echelle=100μm (Blessure).

De plus sous HGF, les deux mutants montrent une accumulation de β -caténine GFP dans le noyau comme pour la β -caténine GFP non mutée (Figure 94.b). De même, dans les expériences de migration après blessure avec les mutants Y654F et Y654E, la β -caténine est présente aux contacts loin de la blessure et dans le noyau des cellules leaders au front de migration (Figure 94.c). Ainsi, ces résultats montrent que la phosphorylation de la β -caténine en Y654 n'est ni nécessaire ni suffisante pour permettre l'accumulation de celle-ci dans le noyau. On peut quand même remarquer que le mutant Y654E a tendance sans stimulation à avoir un niveau un peu plus élevé de β -caténine dans le noyau. Cela suggère que peut être la forme phosphorylée de la β -caténine peut contribuer à l'accumulation de la β -caténine au noyau, mais en tout cas elle n'est pas à elle seule suffisante.

Nous avons montré, dans notre modèle cinétique du paragraphe 4.2.2, que les temps caractéristiques issus des expériences de FRAP reflètent à la fois la cinétique d'endo/exocytose de la β -caténine, et son affinité avec la E-cadhérine. Bien que nous ayons vu dans les conditions précédentes, que la cinétique d'endo/exocytose de la β -caténine soit la contribution principale du temps caractéristique de retour à la membrane par FRAP, on peut espérer que puisque les mutants de la β -caténine ont des affinités différentes avec la E-cadhérine, nous serions néanmoins capables de voir un effet, peut-être marginal, sur les courbes de retour de fluorescence de FRAP pour les β -caténines mutantes, en vertu de fait que les protéines observées dans ce cas sont intégralement phosphorylées, ou intégralement pas. Nous avons mesuré le temps caractéristique de retour de fluorescence pour la β -caténine à la membrane, noté $t_{1/2 in}$, pour le mutant β -caténine Y654E mimant la forme phosphorylée de la β -caténine, pour lequel nous pourrions nous attendre à un renouvellement à la membrane plus élevé, et

celui du mutant non phosphorylable Y654F. Nous n'observons pas de différence notable du temps $t_{1/2 in}$ ou du pourcentage de protéines mobiles pour ces deux mutants comparés à la β -caténine GFP (Figure 95).



Figure 95 – Temps caractéristique $t_{1/2}$ en fonction du % de fraction mobile issus du fit des courbes de retour de fluorescence, pour les différentes conditions : la β -caténine GFP au niveau d'un contact cellule-cellule à basse densité avec ou sans HGF, de la membrane basale, de la β -caténine GFP Y654F avec ou sans HGF, de la β -caténine GFP Y654E avec ou sans HGF, ainsi que la GFP libre.

En conclusion, ces expériences montrent que la phosphorylation en Y654 de la β-caténine n'est pas l'élément nécessaire et déclencheur pour induire une translocation nucléaire de la β-caténine dépendante de Src.

d) La E-cadhérine comme cible de Src

Une autre cible de Src est la E-cadhérine. Lorsque Src est actif, il peut phosphoryler la E-cadhérine sur trois différentes tyrosines Y754-Y755-Y756 (Fujita et al., 2002). La phosphorylation de ces trois tyrosines sur la queue de la E-cadhérine favorise l'interaction de la E-cadhérine avec l'ubiquitine ligase Hakai au dépend de son autre partenaire p120. Cette interaction avec Hakai conduit à l'endocytose des E-cadhérines (Ishiyama and Ikura, 2012). Dès lors, notre hypothèse pourrait être que l'activité de Src est nécessaire pour la régulation et l'endocytose des E-cadhérines, qui auraient ainsi une tension plus faible conduisant à un relargage de la β -caténine du complexe. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un mutant de phosphorylation de la E-cadhérine avec le senseur de force où les trois tyrosines Y754-755-756 ont été remplacées par des phénylalanines (EcadTSMod YYY \rightarrow FFF) et donc ne peuvent plus être phosphorylées (Figure 96.a). Cette mutation prévient la E-cadhérine d'interagir avec Hakai (Mukherjee et al., 2012).

Lors de la stimulation avec HGF, les cellules EcadTSMod YYY→FFF possède un index FRET plus haut après 5 heures de stimulation comme les cellules EcadTSMod (Figure 96.b). Donc, malgré la triple mutation, la tension exercée sur le mutant EcadTSMod YYY→FFF diminue. Cela montre que l'origine de cette relaxation serait plus une relaxation due à une réorganisation de l'ancrage entre la E-cadhérine et le cytosquelette d'actine que la phosphorylation directe par Src qui conduirait à un recyclage des E-cadhérines. De même, dans les cellules leaders après blessure d'une monocouche, la tension des E-cadhérines dans les cellules MDCK EcadTSModYYY→FFF est plus faible que celles pour les cellules à l'arrière, exactement comme pour les cellules MDCK EcadTSMod (Figure 96.c).



Figure 96 – a) A droite : Schéma de la construction du mutant EcadTSMod avec la mutation Y754-755-756 \rightarrow FFF. A Gauche : Image typique des cellules EcadTSMod YYY \rightarrow FFF. b) Changement d'index FRET après 5 heures de stimulation avec ou sans HGF pour les cellules EcadTSMod YYY \rightarrow FFF. c) Index FRET mesuré dans les cellules leaders et dans les cellules à l'arrière du front de migration.

En conclusion, ces résultats montrent que ni la phosphorylation par Src de la β -caténine ou ni celles de la Ecadhérine ne peuvent expliquer la relaxation de tension observée sur les E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β -caténine lors de la migration des cellules induite par HGF ou par blessure. Ainsi le changement d'affinité du complexe E-cadhérine/ β -caténine provoqué par la phosphorylation de la β -caténine par Src ou le recyclage des E-cadhérines à la membrane médié par Src, ne sont pas les causes principales de nos deux observations. Le rôle de Src est donc ailleurs, les cibles de Src ne sont pas dans le complexe E-cadhérine/ β caténine.

4.3.2. Src active FAK qui est nécessaire pour la relaxation des cadhérines et la translocation de la β -caténine.

L'absence de régulation par Src dans le complexe E-cadhérine/ β -caténine, nous a amené à regarder d'autre partenaires de Src en dehors du complexe.

a) FAK est une cible de Src

L'observation de la localisation de la kinase Src dans les cellules peut s'avèrer être un atout pour trouver de nouvelles cibles. Nous avons donc mis à profit les constructions mCherry de Src, et du mutant constitutivement actif de Src (mutation Y530F sur la queue de Src permettant d'ouvrir la conformation de la kinase). En utilisant ce dernier mutant, nous avons observé que celui-ci en plus de se localiser à la membrane des cellules, était présent au niveau des adhésions focales (Figure 97.a). Cette localisation de Src dans les adhésions focales a d'ailleurs été décrite dans les cellules cancéreuses (Avizienyte et al., 2002). Il a aussi été démontré que la surexpression conditionnelle de Src pouvait induire la dispersion des cellules épithéliales au même titre que HGF (Behrens et al., 1993). Dans nos cellules MDCK, l'utilisation du mutant constitutivement actif de Src provoque la création de protrusions enrichies par des adhésions focales à l'intérieur des cellules. Ces protrusions s'accompagnent parfois d'une dissociation des contacts cellule-cellule laissant des trous dans la monocouche (Figure 97.b).



Figure 97 – a) Image représentative de la localisation de Src Y530F mCherry et FAK GFP. En jaune les images superposées indiquent la colocalisation des deux protéines. b) Exemple de cellules transfectées avec Src Y530F mCherry. Les flèches indiquent certains contacts dissociés formant des trous. Echelle= $10\mu m$.

Nous avons pu mettre en évidence que les cellules transfectées avec Src Y530F mCherry présentent statistiquement plus de β -caténine GFP au noyau que les cellules non stimulées et une tension dans les E-cadhérines plus faible (Figure 98.a, b et c).



Figure 98 – a) Top: Cellules EcadTSMod transfectées avec Src Y530F mCherry. Les flèches indiquent les protrusions. Bas : Cellules β-caténine GFP transfectées avec Src Y530F mCherry. Les étoiles indiquent l'accumulation nucléaire de la β-caténine. b) Index FRET mesuré pour des cellules EcadTSMod transfectées ou non avec Src Y530F mCherry. c) Intensité de GFP mesuré dans le noyau des cellules β-caténine GFP transfectées ou non avec Src Y530F mCherry. Echelle=20µm.

Ceci suggère que lorsque Src est suractivé par rapport à son niveau endogène, il peut induire, sans perturbation avec HGF ou de blessure, une relaxation de tension des E-cadhérines et une accumulation nucléaire du β-caténine.

Le rôle de Src pourrait se trouver au niveau des adhésions focales où il est enrichi. En effet, certaines études ont montré que la kinase FAK peut être un substrat de Src (Calalb et al., 1995) et FAK est impliqué dans la régulation de la migration cellulaire et l'adhésion cellule-cellule (Schaller, 2010). Ces données nous amènent à penser que FAK pourrait être la cible de Src responsable de la relaxation de tension des E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β-caténine membranaire.

b) Activation de la kinase FAK

Pour tester l'implication de FAK dans nos stimulations, nous nous sommes appuyés sur l'existence d'un biosenseur FRET de l'activité kinase de FAK dont la mesure de l'index FRET permet d'avoir accès à l'activité endogène de FAK dans les cellules vivantes et en dynamique (Seong et al., 2011b). Brièvement, ce senseur est décrit dans la partie Méthodes et Démarches Expérimentales, et il se comporte comme celui construit pour Src. Il est constitué de deux fluorophores un accepteur et un donneur, d'un domaine SH2 qui reconnait les tyrosines phosphorylés, et d'une séquence peptidique substrat de FAK. Une diminution de l'index FRET signifie que l'activité kinase de FAK est plus importante (Figure 99.a).

Nous utilisons donc ce biosenseur FRET Lyn-FAK adressé à la membrane comme rapporteur de l'activité de FAK. Pour les cellules stimulées avec HGF durant les 5 premières heures, l'index FRET a diminué comparé aux cellules non stimulées, ce qui signifie que FAK est activé sous HGF, contrairement à Src (Figure 99.b). Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de FAK, PF228, augmente l'index FRET mesuré sur les cellules MDCK Lyn-FAK. Ceci confirme que l'inhibiteur PF228 inhibe l'activité de FAK, et cela signifie qu'une partie de FAK est constitutivement activée (Figure 99.b). Plus intéressant, l'utilisation de l'inhibiteur PP1 de Src permet lui aussi d'augmenter l'index FRET mesuré par le biosenseur Lyn-FAK (Figure 99.b). Ces résultats montrent donc que l'activité kinase de FAK est augmentée sous HGF, et sont cohérents avec une activation de FAK par Src.



Figure 99 – a) Schéma du biosenseur FRET d'activité kinase Lyn-FAK. Plus il y a d'activité, plus le FRET est bas. b) Index FRET mesuré par le senseur Lyn-FAK dans les cellules non stimulées, stimulées 1 heure avec HGF (50ng/ml), avec PP1 (25μM) et PF228 (10μM). Echelle=20μm.

Nous avons voulu également déterminer le niveau d'activité de FAK lors de la migration collective des cellules entre les cellules leaders et les cellules à l'arrière du front de migration. Nous n'avons observé qu'une très légère différence pour l'index FRET mesuré avec le senseur Lyn-FAK dans les cellules leaders par rapport à celui des cellules à l'arrière (Figure 100). Certaines cellules semblent « activées », mais en moyenne cette différence n'est pas significative. Le senseur ne nous permet pas de conclure sur l'activité de FAK dans les cellules leaders par rapport à celles à l'arrière. En revanche, l'ajout de l'inhibiteur PF228 augmente l'index FRET mesuré par Lyn-FAK. Ceci permet de confirmer que la kinase FAK est constitutivement active dans les cellules en migration et confluentes.



Figure 100 – Index FRET mesuré par le senseur Lyn-FAK dans les cellules après 15 heures de migration après blessure de la monocouche pour les cellules leaders du front, et les cellules à l'arrière du front de migration avec ou sans PF228 (10μM).

Finalement, la difficulté d'interprétation dans ces résultats n'est pas de savoir si FAK est activée ou non dans les cellules, mais quelle quantité de son activité est induite à la suite de la blessure de la monocouche, et que l'on peut la détecter avec le senseur Lyn-FAK.

Afin d'évaluer de mieux comprendre comment FAK est activé sous HGF, le profil de phosphorylation de FAK a été observé par western blot. Malheureusement, ce type de quantification ne peut pas être réalisé sur les cellules leaders en western blot.

Pour rappel, la structure de FAK contient plusieurs tyrosines dont certaines ont été caractérisées comme des cibles de Src. La kinase FAK peut être activée par les intégrines à la membrane plasmique (Schaller et al., 1994), par certains facteurs de croissance (Sieg et al., 2000) et lorsqu'elle est activée elle va s'autophosphoryler sur son résidu tyrosine 397. Cette phosphorylation Y397 va permettre l'interaction de Src avec FAK (Eide and Turck, 1995). Src une fois accroché à FAK par son domaine SH2 va pouvoir phosphoryler plusieurs autres tyrosines, notamment les tyrosines Y576 et Y577 qui lorsqu'elles sont phosphorylées augmentent l'efficacité kinase de FAK (Calalb et al., 1995; Schlaepfer and Hunter, 1996), et également la tyrosine Y861. Ces phosphorylations préviennent l'autoinhibition de FAK par son domaine FERM (Lietha et al., 2007).

Nous avons donc évalué la proportion de FAK autophosphorylée en Y397 – et donc actif –, de FAK phosphorylé par Src en Y576-577 et Y861 après 3-4 heures de stimulation avec HGF (Figure 101.a). Nous avons observé une augmentation des niveaux de phosphorylation de Y397 et Y576/577 sous HGF par rapport au niveau des cellules non stimulées contrôles (Figure 101.b). L'inhibition par PF228 de FAK diminue bien le niveau de phosphorylation détecté pour toutes les tyrosines Y397, Y576-577 et Y861. Par contre, l'inhibiteur PP1 sous HGF ne prévient pas complétement l'autophosphorylation et l'activation de FAK en Y397, mais diminue bien le niveau de phosphorylation de Y576-577 et Y861.



Figure 101 – a) Top: Schéma de la structure de FAK et des sites tyrosine. Bas : Western Blot typique du lysat de cellules stimulées ou non avec HGF (3h) avec ou non PP1 et PF228 révélé pour FAK total, les formes phosphorylées de FAK Y397, FAK Y576-577 et FAK Y861. b) Niveau de phosphorylation pour FAK Y397, Y576-577 et Y861 normalisé par rapport à la quantité totale de FAK pour les cellules traitées en a).

L'ensemble de ces résultats soutient un modèle dans lequel HGF conduit à l'activation de FAK, d'abord en permettant l'autophosphorylation de FAK indépendamment de Src, et puis en augmentant son activité grâce à l'action de Src sur FAK.

c) Nécessité de l'activité kinase de FAK

Pour finir, nous avons voulu vérifier que l'activation de FAK était bien nécessaire à la relaxation de tension des E-cadhérines et à la translocation nucléaire de la β -caténine. Pour les cellules MDCK, il a été montré que la surexpression de FAK, en combinaison avec HGF, permet d'augmenter la motilité des cellules, alors que la surexpression du FRNK – une version tronquée de FAK – inhibe la migration induite par HGF (Lai et al., 2000). D'autre part, l'inhibition de FAK conduit à une diminution de la migration collective des cellules (Slack-Davis et al., 2007).

Pour déterminer si FAK est nécessaire dans nos stimulations, nous avons utilisé l'inhibiteur de FAK : PF228 sur les cellules MDCK β-caténine GFP et EcadTSMod lorsqu'elles sont stimulées avec HGF et lors de la blessure de la monocouche. Pour les cellules traitées avec HGF, l'inhibition de FAK par PF228 prévient la relaxation de tension observée normalement avec HGF sur les E-cadhérines (Figure 102.a et b). Elle prévient également l'accumulation au noyau de la β-caténine GFP par rapport aux cellules traitées avec HGF seul (Figure 102.c). De plus, la migration collective des cellules sous PF228 est presque complètement abolie. La vitesse de migration de la monocouche est très ralentie par rapport aux cellules où FAK n'est pas inhibé (Figure 102.d).



Figure 102 - a) Images représentatives de la β -caténine GFP dans les cellules traitées avec ou sans HGF (50ng/ml) et PF228 (10μ M). b) Intensité de la β -caténine GFP dans le noyau comparé au cytoplasme après 5 heures de stimulation avec ou sans HGF et PF228. c) Changement d'index FRET mesuré après 5 heures pour les cellules EcadTSMod avec ou sans HGF et PF228. d) A gauche : Images représentatives de la localisation de la β -caténine GFP lors de la migration d'une monocouche de cellules après blessure avec ou sans PF228 (10μ M) à t=0 ou t=6heures. A droite : vitesse de migration (distance moyenne parcourue par le front de migration en 1h) avec ou sans PF228. Echelle= 20μ m.

En conclusion, l'activation permise par Src de FAK est nécessaire pour permettre la relaxation de la tension dans les E-cadhérines et l'accumulation nucléaire de la β-caténine.

En Bref :

résumé de la partie 4.3

- La relaxation des E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β -caténine nécessitent l'activité kinase de Src, mais ne nécessitent ni la phosphorylation de la β -caténine, ni celle de la E-cadhérine. Ainsi, les phosphorylations par Src de la β -caténine et de la E-cadhérine qui sont impliquées respectivement dans la diminution d'affinité de la β -caténine avec la E-cadhérine et du recyclage des E-cadhérines à la membrane, ne sont pas les causes majeures de la relaxation de tension des E-cadhérines et de la translocation de la β -caténine dans les cellules en migration.

- La relaxation des E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β -caténine nécessitent l'activation par Src de FAK dans les cellules en migration. L'autophosphorylation de FAK indépendamment de Src suite à l'ajout d'HGF, puis l'augmentation d'activité de FAK par Src constitutivement activé, suggère que FAK est l'un de premier messager qui va ensuite permettre la relaxation concomitante des E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β -caténine.

4.4. La réorganisation du cytosquelette est suffisante pour induire une relaxation des cadhérines.

De nombreuses cibles de FAK sont des régulateurs du cytosquelette d'actomyosine qui peuvent modifier son architecture ou sa dynamique (Schaller, 2010). Ces différents régulateurs tels que Rac, Rho, Arp2/3 ... sont connus pour modifier l'organisation de l'actine, sa polymérisation, sa contractilité, ou sa polarisation, et sont donc à même d'être responsables de la relaxation de tension des E-cadhérines et la translocation de la β caténine. Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation de l'organisation du cytosquelette d'actomyosine qui dépend des kinases Src-FAK dans les cellules en migration.

4.4.1. Description de la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine dépendante de Src-FAK.

Notre nouvelle hypothèse désormais pour expliquer la relaxation de tension des E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β -caténine repose sur une réorganisation du cytosquelette d'actine médiée par les kinases Src et FAK. Nous nous sommes intéressés dans cette partie à l'organisation du cytosquelette d'actine lors de la migration des cellules, et notamment à l'organisation du cytosquelette cortical proche des contacts cellule-cellule.

Il a été montré que l'organisation du cytosquelette d'actine est considérablement modifiée lors de la dispersion des cellules par des facteurs de croissance comme HGF (Balkovetz and Sambandam, 1999; De Rooij et al., 2005; Dowrick et al., 1991; Mangold et al., 2011; Rosen et al., 1990; Sperry et al., 2010). Bien qu'une étude de la structure du cytosquelette reste forcément descriptive et ne nous permettra pas elle-même de déterminer pourquoi la tension des E-cadhérines chute dans les cellules en migration, elle permettra déjà de confirmer qu'il existe une différence d'organisation du cytosquelette pour les cellules en migration, et de la caractériser.

Nous avons donc examiné l'architecture du cytosquelette d'actine par immunofluorescence. Tout d'abord, les fibres d'actine ont été visualisées grâce à un marquage avec la phalloïdine dans les cellules stimulées avec ou sans HGF et avec ou sans les inhibiteurs de Src ou FAK (PP1 ou PF228) (Figure 103.a). Sous HGF, le nombre de fibres de stress d'actine en position ventrale est deux fois plus important que pour les cellules stimulées (Figure 103.b). Ces fibres de stress traversant la cellule de part en part se terminent au niveau des adhésions focales où se trouve FAK. D'ailleurs on peut observer une redistribution des adhésions focales sous HGF qui deviennent perpendiculaires à la surface de la membrane notamment dans les nombreuses nouvelles protrusions créées. Lorsqu'on ajoute les inhibiteurs PP1 ou PF228 à HGF, le nombre de fibres de stress est bien plus faible (Figure 103.b). En définitive, les cellules en migration sous HGF forment de manière dépendante de Src et FAK plus de fibres de stress d'actine.



Figure 103 – a) Cellules MDCK FAK GFP traitées 4 heures avec ou sans HGF, ou HGF et PP1 ou HGF et PF228, et marquées pour avec la phalloïdine à 550nm. b) Exemple de cellules MDCK FAK GFP traitées 4 heures avec HGF et marquées pour avec la phalloïdine à 550nm. c) Quantification des fibres de stress par cellules en fonctions des conditions de a). Echelle=20µm.

Lorsque l'on marque les cellules MDCK avec de la phalloïdine pour observer les fibres d'actine dans les cellules sous HGF, outre l'augmentation de leur nombre, on observe très fréquemment des structures d'actine « en étoile » (Figure 104.a). Ces structures d'actine sont enrichies en phospho-myosine, et sont inhibées lorsque les cellules sont sous HGF et sous les inhibiteurs de Src et FAK (Figure 104.b). De même, ces structures se retrouvent très souvent dans les cellules leaders au front de migration lors de la cicatrisation des cellules après blessure (Figure 104.b et c.). Nous n'avons pas cherché à en savoir plus quant à la composition de ces structures, mais nous avons pu constater qu'elles avaient pu être observées à d'autres reprises sous HGF sans jamais avoir été vraiment décrites en terme de composition protéique et de dynamique (Li et al., 2015; Sperry et al., 2010).



Figure 104 – a) Cellules MDCK stimulées 3-4 heures avec HGF, marquées avec la phalloidine (550nm), la pMLC (488nm) et la β-caténine (650nm). Les flèches sur les images superposées de l'actine (rouge) et la pMLC (vert) et les contacts (magenta) indiquent les fibres d'actine réorganisées en étoile. b) Quantification du pourcentage de cellules comprenant ces structures riches en actine et pMLC pour des cellules avec ou sans HGF, HGF et PP1, HGF et PF228, ainsi que des cellules leaders et des cellules plus à l'arrière du front de migration. c) Cellules MDCK avec à l'avant une cellule leader, marquées avec la phalloidine (550nm), la pMLC (488nm) et la β-caténine (650nm). La flèche sur les images superposées de l'actine (rouge) et la pMLC (vert) et les contacts (magenta) indique les fibres d'actine réorganisées en étoile. Echelle=20µm.

D'autre part, les fibres de stress sont des structures caractérisées par l'assemblage de plusieurs filaments d'actine, notamment par l' α -actinine, et où les myosines peuvent s'associer et jouer leurs rôles de moteurs qui permettent de générer des forces de contraction. On peut examiner par exemple comme marqueur de l'organisation des moteurs de myosine sur les fibres de stress, l'état de phosphorylation du résidu serine 20 de la chaine légère de la myosine (MLC). Lorsque cette chaine régulatrice MLC est phosphorylée en Ser20 (pMLC),

elle est dans son état actif. La distribution de la pMLC sur les fibres de stress et les filaments d'actine du cortex au niveau d'un contact cellule-cellule a été analysée (cf Méthodes et Démarches Expérimentales) (Figure 106.a).

Nous avons alors quantifié la densité de pMLC présente au niveau des contacts cellule-cellule et de l'actine corticale, et celle des fibres de stress à l'intérieur de la cellule. Nous avons observé que dans les cellules non stimulées, la densité de pMLC est plus importante au niveau du cortex des contacts intercellulaires que sur les fibres de stress dans la cellule (Figure 105.a et b). Par contre, l'ajout de HGF renverse se ratio : la pMLC se retrouve plus au niveau des fibres de stress qu'au niveau des contacts (Figure 105.a et b). Quand les cellules ont été traitées avec HGF et PP1 ou HGF et PF228, il n'y a plus d'enrichissement des fibres de stress en pMLC (Figure 105.a et b).



Figure 105 – a) Cellules MDCK stimulées 3-4 heures avec ou sans HGF, HGF et PP1 et HGF et PF228 et marquées avec la phalloidine (550nm), la pMLC (488nm) et la β-caténine (650nm). b) Quantification de la densité de pMLC au niveau du cortex de la membrane (C) et au niveau des fibres de stress (S) pour les différentes conditions montrées en a). Echelle=20µm.



Figure 106 – a) Cellules MDCK stimulées 4 heures avec ou sans HGF, et marquées avec la phalloidine (550nm), la pMLC (488nm) et la 6-caténine (650nm). Les flèches pleines indiquent les fibres d'actine (rouge) enrichies en pMLC (vert). Les flèches creuses indiquent les contacts (magenta) où il n'y a plus de pMLC (vert). Sur les images superposées les cadres blancs indiquent les zones utilisées pour la mesure du profil d'intensité. b) Profil d'intensité normalisé (haut) pour la phalloïdine (rouge), la pMLC (vert) et la 6-caténine (magenta) d'un contact sans HGF (Haut), d'un contact après 4 heures sous HGF (Bas). La flèche pleine indique au niveau du pic le contact enrichie en actine (rouge) et pMLC (vert), les triangles gris indiquent d'autres fibres d'actine proches du contact. c) Exemples de l'organisation du contact (magenta) et de la pMLC (vert) Echelle=20µm.

Sous HGF, on peut observer un enrichissement de pMLC sur des fibres d'actine à quelques μ m à côté du contact cellule-cellule (ici marqué par la β -caténine). Les profils d'intensité normalisés de la Figure 106.b montrent que, pour un ilot de cellules MDCK non stimulé, le contact cellule-cellule est soutenu par l'actine enrichie de pMLC. Au contraire, sous HGF, le contact cellule-cellule peut toujours être soutenu par l'actine et la myosine, mais ce sont les fibres d'actine adjacentes qui sont nettement enrichies de pMLC. De plus, la morphologie des contacts cellule-cellule n'est pas homogène sous HGF, tous les contacts ne se séparent pas tous en même temps, et peuvent également se reformer en fonction de la position de la cellule dans l'ilot. Pour les ilots qui commencent à se dissocier à partir de 3-4 heures, on peut observer des contacts plutôt linéaires où la pMLC se retrouve sur les fibres d'actines périphériques au contact (Figure 106.c à gauche), des contacts striés, où également la pMLC ne se trouve pas forcément au niveau du contact lui-même mais dans son prolongement (Figure 106.c milieu), et des zones à l'intérieur de la cellule enrichies en pMLC à plusieurs dizaines de microns des contacts striés des cellules (Figure 106.c à droite).

Ces résultats montrent que sous HGF, l'organisation du cytosquelette d'actomyosine est changée de manière Src et FAK dépendante en favorisant l'enrichissement de pMLC sur les fibres de stress au détriment du cortex d'actine au niveau des jonctions cellule-cellule.
4.4.2. Relaxation de tension des E-cadhérines et lien avec le cytosquelette

Nous souhaitons désormais tester si le modèle selon lequel une réorganisation de l'actine dépendante de Src et FAK, lors de la migration cellulaire, permettrait de relaxer la tension des E-cadhérines et le départ de la β -caténine. En effet, nous voulons définir si cette relaxation de tension n'est autre que la conséquence du départ de la β -caténine ou si la relaxation peut provenir du cytosquelette indépendamment du départ de la β -caténine du complexe.

Pour cela, nous avons inséré le senseur de force moléculaire dans une protéine chimère qui peut former des contacts cellule-cellule, recruter le cytosquelette d'actine et ce sans l'intermédiaire de la β -caténine. Cette protéine chimère E- α -TSMod est donc composée de la E-cadhérine avec le senseur de force dont le domaine d'interaction avec la β -caténine a été remplacé par une version tronquée de l' α -caténine (Figure 107.a). Cette construction chimère ne peut donc relaxer sa tension que sous une modification de l'accrochage avec le cytosquelette par le domaine d'interaction de l' α -caténine. Nous avons dans un premier temps vérifié que cette construction chimère E- α -TSMod pouvait bien se lier à l'actine. L'utilisation de la cytochalasine B, qui est un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, sur les cellules MDCK E- α -TSMod permet d'augmenter l'index FRET mesuré par rapport aux cellules avant le traitement (Figure 107.b). Cela signifie que cette construction est sous tension générée par le cytosquelette d'acine.



Figure 107 – a) Schéma de la construction chimère E- α -TSMod et image représentative des cellules E- α -TSMod. b) Index FRET mesurée avant et après 15min de traitement avec la cytochalasine B (10 µg/ml) pour E- α -TSMod. Echelle=20µm.

La stimulation avec HGF pendant 5 heures sur ces cellules conduit aussi à une augmentation de l'index FRET, c'est-à-dire une relaxation de tension comme pour les cellules EcadTSMod sous HGF (Figure 108.a). De même, la tension dans la construction chimère est bien plus faible dans les cellules leaders que dans les cellules à l'arrière de la blessure (Figure 108.b).



Figure 108 – a) A Gauche : Profil d'index FRET pour les cellules E- α -TSMod lors de la migration de la monocouche après blessure. A Droite : Mesure de l'index FRET pour les cellules E- α -TSMod leaders et les cellules à l'arrière du front de migration. b) A Gauche : Profil d'index FRET pour les cellules E- α -TSMod traitées avec ou sans HGF pendant 5 heures. A Droite : Mesure du changement d'index FRET après 5 heures pour les cellules E- α -TSMod traitées avec ou sans HGF. Echelle=20 μ m (HGF) et 100 μ m (migration).

Ces résultats confirment que le départ de la β -caténine de complexe E-cadhérine/ β -caténine n'est pas nécessaire pour observer une relaxation de la tension dans les E-cadhérines. Ceci signifie que dans les cellules en migration, la relaxation de tension des E-cadhérines ne semble due qu'à une réorganisation du cytosquelette d'actomyosine. Ces observations soutiennent un modèle qui considère que les réorganisations médiées par Src et FAK au niveau du cytosquelette d'actine pourraient être suffisantes pour induire une relaxation de tension sur les E-cadhérines qui conduirait à une translocation de la β -caténine de la membrane au noyau.

En Bref :

résumé de la partie 4.4

Dans les cellules en migration, le cytosquelette d'actine est réorganisé. Cette réorganisation est caractérisée par un enrichissement des fibres des stress ventrales, en phospho-MLC, au détriment du cortex d'actine des contacts cellule-cellule. Cette réorganisation est dépendante des kinases Src et FAK.

Une telle réorganisation au cours de la migration des cellules est suffisante pour induire une relaxation des Ecadhérines, indépendamment du départ de la β-caténine aux contacts.

Ainsi, la réorganisation, par les kinases Src et FAK, du cytosquelette d'actomyosine apparait suffisante pour induire une relaxation des E-cadhérines, indépendamment des modifications post-traductionnelles connues pour dissocier le complexe E-cadhérine/β-caténine.

Discussion

Sommaire

5.1.	Rel/	AXATION DE TENSION DANS LES E-CADHERINES	184
	Quantification en pN de la relaxation des E-cadhérines		184
	Caractéristiques spatio-temporelles de cette relaxation		184
	Lien avec les forces à l'échelle de la cellule		185
	Tension	des E-cadhérines et composition des jonctions adhérentes	187
5.2.	Аст	VATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION B-CATENINE	189
5.	2.1.	Translocation de la 6-caténine membranaire au noyau	189
	Accumu	lation de la β -caténine au noyau	189
	La quan	tité de β -caténine membranaire est-elle suffisante ?	189
	Modèle	de l'homéostasie de la β -caténine : Modèle cinétique avec trois compartiments	190
5.	2.2.	Rôle de la quantité de E-cadhérines membranaires	191
Aux temps courts : pas de dérégulation des E-cadhérines Le recyclage des E-cadhérines et le rôle de Src			191
			191
	Stabilité	ilité des E-cadhérines à la membrane sans eta -caténine	
5.	2.3.	Rôle de synthèse et la dégradation de la β-caténine	193
5.	2.4.	Rôle de la kinase Src et des phosphorylations de la 6-caténine	194
La kinase Src		e Src	194
	Rôle de	s phosphorylations de la β-caténine	194
5.	2.5.	Mécanismes à l'origine du départ de la β-caténine membranaire	195
Hypothèses sur le départ de la β-caténine de la membrane à la suite d'une relaxation observée sur les E-cadhérines : .			195
	Induire	une relaxation de tension des E-cadhérines et devenir de la β-caténine ?	197
5.3.	C ου	PLAGE AVEC LES ADHESIONS FOCALES ET ROLE DE FAK	198
5.	3.1.	FAK, cible de Src	198
5.	3.2.	Origine de l'ouverture de FAK et de son autophosphorylation	198
5.4.	L'AC	TINE : LIEN ENTRE LES ADHESIONS FOCALES ET LES JONCTIONS ADHERENTES	201
5.5.	Nou	IVEAU MODELE EMERGENT	203

5. Discussion

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au complexe E-cadhérine/ β -caténine aux jonctions adhérentes, dont la β -caténine est aussi un cofacteur de transcription mécaniquement inductible. Lors de la morphogénèse chez les embryons de *Drosophile* et de poisson zèbre (Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008), lors du développement de certaines cellules cancéreuses (Fernández-Sánchez et al., 2015; Whitehead et al., 2008), ou encore dans des cultures de cellules sur différents supports et stimulées mécaniquement (Benham-Pyle et al., 2016), il a été proposé que la β -caténine puisse être détachée des E-cadhérines à la membrane lors de la phosphorylation de ses tyrosines et aller dans le noyau. Néanmoins aucune preuve de ce mécanisme de translocation n'avait été mise en évidence. Nous avons montré que lors de stimulations conduisant en partie à une transition épithélio-mésenchymateuse, la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine dépendante des kinases Src et FAK est suffisante pour conduire à une relaxation de la tension des E-cadhérines, et à une translocation de la β -caténine de la membrane au noyau, et ce de manière indépendante de la phosphorylation de la β -caténine ou de la E-cadhérine. Dans ce chapitre, nous allons revenir sur les différentes interprétations qui peuvent être tirées de nos résultats, et les nouvelles questions qu'ils soulèvent.

5.1. Relaxation de tension dans les E-cadhérines

Quantification en pN de la relaxation des E-cadhérines

Dans cette étude, nous avons utilisé un senseur FRET de force moléculaire, génétiquement inséré dans notre protéine d'intérêt, la E-cadhérine. Ce senseur a été utilisé dans des cellules épithéliales MDCK dont la migration a été induite par l'ajout du facteur de croissance HGF ou lors de la création d'une blessure de la monocouche. Grâce aux constructions 5aa et TRAF, de respectivement haute et basse efficacité FRET (Figure 58.d), et à la calibration présentée dans la partie 3.3.2 de la section Méthodes et Démarches Expérimentales, nous avons pu relier l'index FRET mesuré directement sur le microscope à l'efficacité FRET. Cette calibration nous permet d'utiliser la calibration précédemment publiée dans Grashoff et al. qui relie l'efficacité FRET à la force exercée sur le senseur TSMod. Nous pouvons ainsi estimer que lorsque les cellules MDCK migrent, la tension des E-cadhérines diminue d'environ 2 pN par rapport à leur état avant la stimulation.

Caractéristiques spatio-temporelles de cette relaxation

Cette relaxation de tension est progressive dans le temps, en effet cela prend 2 à 5 heures sous HGF pour pouvoir détecter une relaxation de tension significative (Figure 71 et données non montrées). Sous HGF, nous avons constaté que toutes les cellules ne réagissent pas de la même façon, que ce soit dans l'intensité de leur réaction, ou dans le temps. De plus, elles présentent un état de départ de tension qui peut être différent en fonction de la densité cellulaire. Les effets de HGF sont visibles dès 5 minutes sur les protrusions et l'étalement des cellules, mais ensuite les effets sur les contacts cellule-cellule peuvent différer en fonction de la place de la cellule dans l'ilot. Que ce soit pour la tension des E-cadhérines ou la localisation nucléaire de la β -caténine, certaines cellules peuvent s'activer très vite dès la première heure, alors que pour d'autres il faudra attendre plus longtemps. Cette hétérogénéité est sûrement à l'origine du fait qu'il faille attendre plusieurs heures après la stimulation, pour que l'on observe en moyenne un effet sur la tension. Décrire plus en détail comment se comporte la morphologie de la cellule (protrusion...), celle du contact (contact linéaire ou strié cf Figure 106) en fonction de la tension observée dans les E-cadhérines, nous permettrait de mieux spécifier si la relaxation moyenne de tension que nous avons observée pourrait masquer des régions des contacts qui sont sous des tensions différentes en fonction de leur morphologie, après l'ajout de HGF.

D'autre part, cette relaxation de tension peut être également graduelle dans l'espace. En effet, lors de la migration collective des cellules, on peut observer un gradient de tension de plusieurs pN, perpendiculairement au front de migration de la monocouche. Cette relaxation de tension est réversible, notamment lors de la fermeture de la monocouche.

Lien avec les forces à l'échelle de la cellule

La relaxation de tension des E-cadhérines observée dans nos cellules en migration peut sembler contrintuitive. En effet, la morphologie des cellules lors de leur migration sous HGF ou pour les cellules leaders peut faire penser à des cellules « étirées », très étalées sur le substrat, et parfois juste avant qu'un contact ne se détache sous HGF on peut voir des contacts striés, déformés comme étirés. Pour autant cela ne veut pas forcément dire que les cellules tirent plus sur leurs voisines. La déformation seule ne peut pas nous renseigner directement sur la force dans les jonctions et dans les E-cadhérines. Cela pourrait aussi vouloir dire que les cellules sont plus « souples » pour se déformer, en raison peut être de la relaxation du cytosquelette cortical et de son détachement des E-cadhérines.

Nous pouvons essayer de corréler cette diminution de force dans les E-cadhérines avec les forces exercées à l'échelle cellulaire. Si l'on s'intéresse notamment aux cellules leaders, et aux forces exercées sur le substrat par les leaders, il a été montré que celles-ci exercent des forces de traction plus fortes que les cellules à l'arrière, et que ces forces de traction corrèlent aussi avec une distribution spatiale de RhoA plus importante dans le lamellipode des cellules leaders que les cellules à l'arrière (Reffay et al., 2014). Il est aussi remarqué dans cet article, que l'ablation des câbles d'actines périphériques des cellules juste à l'arrière des cellules leaders sur le bras de migration conduit à une relaxation des câbles d'actine jusqu'à 200 secondes après l'ablation, et permet de créer une nouvelle cellule leader, qui après 5 heures présente un large lamellipode et une position bien en avant des autres cellules qui la suivent.

D'autre part, la mesure des forces exercées sur le substrat par TFM, lors de la migration collective des cellules MDCK, peut, sous certaines hypothèses, permettre de remonter à ce qui est appelé les « tugging forces » ou forces de traction intercellulaire (Notbohm et al., 2012; Style et al., 2014). Ces forces sont calculées à partir des déformations sur le substrat observées par TFM. Par exemple, pour un doublet de cellules, la somme des forces de traction sur le substrat mesurées sous la surface d'une cellule n'est pas nulle, et en vertu de la 3^{ème} loi de Newton, elles doivent s'équilibrer avec les forces de traction intercellulaire, et qui sont souvent attribuées à celles des jonctions adhérentes (Figure 109.a).

On peut alors par exemple, remarquer que le gradient de tension que nous avons observé dans les E-cadhérines lors de la migration collective des cellules (Figure 67), ressemble à celui observé pour les forces de traction intercellulaire prédites à partir des mesures de force de traction sur le substrat (Coburn et al., 2016; Trepat et al., 2009). En effet, il a été montré que les forces de traction sur le substrat par des cellules épithéliales augmentent lorsque l'on s'approche du bord de l'ilot ou à l'avant du front de migration. Ainsi, les forces de traction intercellulaire, elles, diminuent entre l'arrière et l'avant (Figure 109.b). Dans l'article Coburn et al., les auteurs ont à la fois simulé et mesuré expérimentalement les forces de traction sur le substrat et entre les cellules, et ont également corrélé celles-ci avec le recrutement de pMLC. Ils ont montré à la fois sur de large ilots d'une vingtaine de cellules, et sur une monocouche avec un bord libre, qu'il existe un gradient de forces de traction intercellulaire qui augmente dans la monocouche en allant vers le centre, qui corrèle d'ailleurs avec le gradient de pMLC entre les bords et le centre. Ils ont également utilisé l'ablation laser sur un contact, et mesuré la vitesse de rétractation du contact, pour constater que cette vitesse est plus importante au centre de l'ilot que sur les bords, mettant en évidence également une plus forte tension au niveau des jonctions au centre



qu'aux bords des ilots. Ce type de gradient rappelle celui que nous avons mesuré dans les E-cadhérines dont la tension est plus faible sur les bords de la monocouche, et augmente progressivement vers l'arrière (Figure 67).

Figure 109 - a) Principe des « tugging forces » ou forces de traction intercellulaire : en haut : principe illustré par un tir à la corde ; au milieu : appliqué pour une paire de cellules ; en bas au sein d'un ilot de cellules (adapté de Style et al.2014) ; b) Exemple de migration collective d'un large ilot de cellules MDCK : i) forces de traction (plein : traction normal ; vide : traction parallèle) exercées sur le substrat en fonction de la distance au bord, ii) tension intercellulaire dans la monocouche déduite de l'équilibre des forces de traction sur le substrat en fonction de la distance au bord (issu de Trepat et al., 2009).

Pour les cellules MDCK en migration sous HGF, les forces de traction sur le substrat ont aussi été mesurées pour des cellules en large ilot, et des doublets de cellules (Jang et al., 2017; Maruthamuthu and Gardel, 2014). Pour des doublets de cellules, les auteurs de Maruthamuthu et al. ont montré que pour les cellules qui migrent de manière orthogonale à leur contact, le contact se dissocie rapidement sans diminution de la traction intercellulaire avant la rupture du contact (Figure 110.a). Pour les cellules qui se déplacent parallèlement à leur contact, il apparait une redistribution des forces de traction intercellulaire qui diminue de 50% avant la dissociation du contact (Figure 110.a). Dans l'article Jang et al., la situation est également différente de la nôtre où les cellules sont en ilots de 5 à 15 cellules, car dans leur cas les cellules sont cultivées dans des ilots d'environ 1000 cellules qui forment une monocouche circulaire, qui est ensuite stimulée avec HGF. Néanmoins, leurs résultats sont intéressants, car ils montrent que HGF induit un étalement des cellules, une augmentation de la taille de l'ilot de manière homogène comparé à l'ilot de cellules non traitées qui lui va créer des digitations et ne pas conserver sa forme circulaire, et une persistance du mouvement des cellules sur les bords sous HGF. De plus, en mesurant les forces exercées sur le substrat, et en extrayant les forces de traction intercellulaire, ils ont montré que la somme des forces de traction sur le substrat sont comparables avec ou sans HGF, mais que les forces de traction intercellulaire sous HGF sont plus faibles que celles des cellules non traitées avec HGF (Figure 110.b). Ils en concluent que HGF conduit à une diminution de la coopérativité cellulaire en diminuant la traction intercellulaire.



Figure 110 - a) Rupture de paires de cellules MDCK avec en haut : schéma de la rupture, au milieu : TFM forces de traction exercées sur le substrat avant et après HGF, en bas : les forces de traction cellule-substrat (en bleu) et les forces de traction intracellulaire (rouge) au cours du temps pour une rupture i) orthogonale au contact cellule-cellule et ii) parallèle au contact cellule-cellule. (Issu de Maruthamuthu et al. 2014). b) En haut : ilots de cellules MDCK avec ou sans HGF, i) TFM forces de traction exercées sur le substrat au cours du temps avec ou sans HGF ; ii) forces de traction intracellulaire au cours du temps. (Issu de Jang et al. 2017).

Il semble donc que les forces au niveau des contacts cellule-cellule à l'échelle cellulaire, et celles à l'échelle moléculaire dans les E-cadhérines soient positivement corrélées. Une telle corrélation positive a aussi été mise en évidence par exemple entre les forces de traction exercées sur des substrats de différentes rigidités, et la tension exercée au niveau moléculaire dans la vinculine (Sarangi et al., 2016). En revanche, en l'absence de stimulation dans les ilots de deux cellules, il a été montré que la tension dans les E-cadhérines et les forces de traction intercellulaire ne sont finalement pas vraiment corrélées (Sim et al., 2015). Peut-être que ce type de corrélation émerge plus facilement lorsque les cellules forment de larges ilots multicellulaires.

Tension des E-cadhérines et composition des jonctions adhérentes

Un autre point intéressant qui n'a pas été traité dans ce travail de thèse concerne le lien entre la tension des E-cadhérines, et la composition (en termes de partenaires) et dynamique (endocytose, recyclage) des jonctions adhérentes.

- Il a été montré que la tension des E-cadhérines pouvait être la même que celles-ci soient engagées ou non dans un contact cellule-cellule (Borghi et al., 2012). Nous avons montré que la tension des E-cadhérines est plus faible dans le lamellipode des cellules leaders que pour les cellules à l'arrière, et est aussi plus faible pour des contacts cellule-cellule sous HGF que sans. Or, si l'on essaye de corréler la tension des E-cadhérines à leur dynamique de recyclage à la membrane, on s'aperçoit que la relation est complexe. En effet, nous avons vu que le renouvellement des E-cadhérines dans le lamellipode est rapide (Figure 82), et les E-cadhérines sont sous une tension faible. On pourrait proposer un modèle où une tension faible en moyenne dans les E-cadhérines serait corrélée avec un échange à la membrane élevé et un recyclage des E-cadhérines élevé. Mais à l'inverse, la dynamique des E-cadhérines de la membrane basale, où il n'y a pas de liaison entre domaines extracellulaires de E-cadhérines, est du même ordre de grandeur que celle de E-cadhérines dans le lamellipode (c'est-à-dire rapide Figure 82), pourtant leur tension à la membrane basale peut être élevée. De même, la dynamique d'échange des E-cadhérines aux contacts cellule-cellule est la même avec ou sans stimulation avec HGF (Figure 81), pourtant leurs tensions moyennes chutent uniquement sous HGF. Il serait donc intéressant

d'examiner le lien entre les différents mécanismes de recyclage des E-cadhérines, et l'établissement de la tension, et ce en fonction des perturbations sur la partie extracellulaire des E-cadhérines et leurs capacités à recruter le cytosquelette d'actine. De même, il serait intéressant de savoir si la cinétique d'échange aux contacts des E-cadhérines est différente en fonction des perturbations mécaniques extérieures. Par exemple, il a été montré que l'exposition des cellules tumorales OC1 à un flux de cisaillement conduit à l'internalisation des E-cadhérines en 30 min, et cette internalisation est dépendante de l'activité de Src à la suite de l'application du flux (Lawler et al., 2009). Pour les cellules MDCK, il a été montré que la cinétique d'échange à la membrane est régulée majoritairement par les phénomènes d'endocytoses (et non de diffusion dans la membrane)(de Beco et al., 2009), fluctue dans le temps et l'espace et n'est pas contrôlée au niveau de la cellule dans sa globalité mais reste relativement la même pour un même contact entre deux cellules (de Beco et al., 2015). L'échange cinétique à la membrane d'un contact intercellulaire peut dépendre également des stimulations mécaniques chez les cellules MDCK, par exemple en tirant avec une micropipette perpendiculairement au contact cellule-cellule, le temps caractéristique de retour de fluorescence au contact cellule-cellule est plus court que sans stimulation mécanique (de Beco et al., 2015).

- Un second point qui mériterait plus de description concerne le recrutement des protéines partenaires au niveau des jonctions en fonction de la tension des E-cadhérines. Pour l'instant, nous avons montré qu'une diminution de tension dans les E-cadhérines, corrèle en moyenne dans nos stimulations avec une réorganisation de l'actine entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales. Notamment, nous avons vu qu'il existe une redistribution de la phospho-myosine, qui est moins abondante au niveau des jonctions cellulecellule sous HGF que sans. Nous avons également vu que l'organisation des contacts sous HGF peut prendre différentes formes, et nous n'avons pas regardé si ces contacts « striés », ou linéaires où les filaments d'actomyosine se retrouvent décalés de quelques µm des contacts, possèdent des tensions différentes. Nous avons commencé quelques expériences préliminaires pour corréler la tension des E-cadhérines avec, par exemple, l'ouverture de l' α -caténine ou le recrutement de la vinculine. En effet, la conformation de l' α -caténine peut s'ouvrir lorsqu'une force autour de 5 pN est appliquée sur la protéine, et elle peut ainsi recruter la vinculine (Kim et al., 2015; Yao et al., 2014). Néanmoins, le maintien de la force pour conserver la conformation ouverte de l' α -caténine n'est pas toujours nécessaire (Biswas et al., 2016). En effet, en utilisant des membranes synthétiques permettant de créer des rassemblements nanométriques de E-cadhérines, il a été montré que l'α-caténine peut être trouvée dans sa configuration ouverte marquée avec l'anticorps spécifique a18, en raison du rassemblement organisé des E-cadhérines mais dans des régions sans recrutement de vinculine ou de phospho-myosine (Biswas et al., 2016). Il serait donc intéressant dans notre cas de savoir si pour des contacts ayant été sous tension avant le traitement avec HGF, l'α-caténine se retrouve enrichie en conformation ouverte avec la vinculine aux contacts, et si l'ajout de HGF et la relaxation de tension observée sur les E-cadhérines corrèle avec une diminution de la forme ouverte de l' α -caténine et un recrutement moindre de vinculine aux contacts.

Ainsi, pouvoir avoir accès à l'état de tension des E-cadhérines, et décrire la présence ou non de certaines protéines comme l' α -caténine, la vinculine, mais aussi les partenaires du cytosquelette d'actomyosine comme la zyxine, les formines, VASP, l' α -actinine... permettrait de mieux comprendre comment s'organisent les jonctions en fonction de perturbations mécaniques. Par exemple pour des cellules endothéliales, la zyxine et VASP sont recrutées aux contacts striés (appelés « Focal Adherens Junctions ») de manière indépendante de l'intégrité du domaine de liaison de la vinculine à l' α -caténine et de manière dépendante de l'intégrité du cytosquelette d'actomyosine (Oldenburg et al., 2015).

- Le dernier point qui mérite d'être soulevé est celui concernant la résolution temporelle et spatiale de nos mesures de tension. En effet, nous avons observé le comportement moyen de plusieurs E-cadhérines au niveau

de différents contacts sur une population de cellules. Mais, il serait tout à fait possible de regarder les variations locales de tension en fonction de la morphologie du contact, et avec une résolution temporelle plus élevée. Nous pourrions ainsi corréler ces mesures de tension avec par exemple la présence ou non de protéines partenaires pour chaque morphologie des contacts. En revanche, avec nos méthodes actuelles nous n'avons pas encore la possibilité de pouvoir accéder à la distribution des tensions au sein d'un pixel regroupant déjà un grand nombre de E-cadhérines. Nous ne pouvons pas savoir si la diminution de tension moyenne observée est due à une diminution de tension sur chaque E-cadhérine, ou s'il s'agit d'une sous population de E-cadhérine dont la tension chute. Pour avoir accès à cette distribution de tension, il faudrait mesurer en molécule unique le signal FRET de chaque E-cadhérine dans les cellules vivantes.

5.2. Activation de la voie de signalisation β-caténine

5.2.1. Translocation de la β-caténine membranaire au noyau

Nous avons montré que la localisation nucléaire de la β -caténine et son activité transcriptionnelle, sont associées à une relaxation de tension des E-cadhérines, à la fois pour des cellules stimulées avec HGF ou par blessure de la monocouche.

Accumulation de la 6-caténine au noyau

Nous avons mis en évidence une accumulation nucléaire de la β -caténine, ainsi qu'une augmentation de la transcription des gènes dépendants de celle-ci dans les cellules en migration. Sous HGF, l'activation de la transcription des gènes dépendants de la β -caténine avait été mise en évidence de nombreuses fois (Apte et al., 2006; David et al., 2008; Liou et al., 2002; Matteucci et al., 2006; Monga et al., 2002; Müller, 2002; Papkoff and Aikawa, 1998; Purcell et al., 2011; Rasola et al., 2007; Soldati et al., 2008; Zeng et al., 2006), mais la localisation dans le noyau de la β -caténine était plus difficile à observer (Brembeck et al., 2004; Howard et al., 2011; Monga et al., 2002). De plus, grâce aux expériences de photoconversion, nous avons montré que la β -caténine membranaire contribue de manière majoritaire à son accumulation dans le noyau, dans les cellules en migration sous HGF ou après blessure.

Dans la monocouche, la localisation nucléaire de la β -caténine, et son activité transcriptionnelle sont présentes respectivement au front de migration ou sur deux à trois rangées de cellules (~60-100 µm), puis s'arrêtent assez brutalement alors que le gradient de tension des E-cadhérines est lui plus lisse du front à 200 µm à l'arrière du front (Figure 66 et Figure 68). Cette différence pourrait refléter un mécanisme non linéaire entre la tension et l'activation de la β -caténine. Il se pourrait que l'expression du rapporteur TOPdGFP ne soit pas forcément linéaire en fonction de la quantité de β -caténine nucléaire. Mais, dans l'hypothèse où la relaxation de tension est la cause de la translocation de la β -caténine, la différence entre la β -caténine nucléaire retrouvée juste à l'avant du front de migration et le gradient de tension des E-cadhérines s'étalant sur plusieurs centaines de µm, la différence spatiale entre les deux signaux pourrait être le résultat d'un seuil de sensibilité de tension des E-cadhérines pour le relargage de la β -caténine.

La quantité de 6-caténine membranaire est-elle suffisante ?

Nous avons pu mettre en évidence que l'accumulation de la β -caténine au noyau est une conséquence d'un départ de la membrane d'une partie de la β -caténine. Le ratio à la membrane entre la β -caténine et la E-cadhérine dans des conditions normales est de 1:1 (Aberle et al., 1994; Hinck et al., 1994). Mais même si l'on considère que la densité de β -caténine à la membrane est d'environ 10¹⁵m⁻², soit 10 fois plus faible que la

densité de E-cadhérine au niveau d'un contact cellule-cellule (Harrison et al., 2011) et que le rayon de la cellule et de son noyau soit de 20 µm et 5 µm, alors, on n'aurait qu'un volume de rayon 30 nm accessible par molécule de β -caténine dans le noyau si toute la β -caténine de la membrane était transportée au noyau, ce qui ne laisserait pas vraiment de place pour autre chose. Les concentrations de β -caténine à la membrane, dans le cytoplasme et le noyau ont été évaluées expérimentalement dans les cellules de mammifères par western blot et mesures des volumes des compartiments (Tan et al., 2012). Dans les cellules MDCK, les concentrations de β caténine dans le noyau, le cytoplasme et la membrane ont été mesurées respectivement autour de 248, 39, 624 nM, et confirment que le relargage de la quantité de β -caténine présente à la membrane est nettement suffisant pour pouvoir remplir le noyau. On peut également garder à l'esprit que bien que la quantité de β caténine membranaire puisse permettre de « remplir » le noyau entièrement, ceci n'est pas nécessaire, il faut surtout qu'il y ait une quantité suffisante de β -caténine pour occuper les sites de liaison aux cofacteurs de transcription TCF/LEF dans le noyau, dont la concentration dans le noyau n'a pas été mesurée expérimentalement.

Modèle de l'homéostasie de la 6-caténine : Modèle cinétique avec trois compartiments

De nombreux modèles cinétiques associés à des simulations quantitatives ont été mis au point pour décrire l'homéostasie de la β -caténine et expliquer l'accumulation nucléaire de la β -caténine. Au départ, le modèle proposé par Lee et al. ne tenait compte que de la présence du ligand Wnt et de la β -caténine soit cytoplasmique soit nucléaire, comme cela est le cas pour des cellules n'ayant pas de jonctions adhérentes avec des cadhérines (Lee et al., 2003). La contribution des E-cadhérines à la membrane a été ajoutée, plus tard, en introduisant une β-caténine « activée » et phosphorylée ayant une affinité plus faible avec les jonctions adhérentes que celle « non activée » et non phosphorylée (van Leeuwen et al., 2007). Dans ce modèle, les auteurs concluent que si on ne considère pas l'existence d'une β -caténine phosphorylée, alors l'ajout du ligand Wnt conduit à une augmentation de la concentration en β -caténine à la membrane en premier, et ensuite dans le cytoplasme. C'est d'ailleurs ce qui a été observé expérimentalement dans les cellules épithéliales après l'ajout du ligand Wnt sur des cellules épithéliales en culture (Hinck L, Nelson WJ, 1994). Ces modèles cinétiques peuvent être très détaillés pour chacun des composants de la machinerie de dégradation avec plus de 80 étapes intermédiaires (MacLean et al., 2015). Afin de tester dans quelles conditions le ratio N/M entre la β-caténine au noyau et celle à la membrane pouvait être supérieur à 1, nous avons construit un modèle simplifié. Plutôt que de réaliser les estimations cinétiques de la concentration de β -caténine en fonction des multiples partenaires du complexe de dégradation au cours du temps, nous avons simplement considéré à l'équilibre, sans décrire toutes les protéines intermédiaires, trois compartiments et les différents échanges entre chaque compartiment, la synthèse et la dégradation de la β -caténine (Figure 77). Ce modèle simplifié nous a permis d'établir différents paramètres importants à considérer pour exprimer le ratio N/M tels que la saturation à la membrane de toutes les E-cadhérines, et des régimes de dégradation lente ou rapide par rapport aux échanges des différents compartiments (Table 4). Nous avons pu évaluer expérimentalement les différents paramètres, et nous avons vérifié que nous nous trouvions dans un régime où la quantité de E-cadhérines à la membrane est inchangée pendant nos stimulations, et la dégradation est faible par rapport aux échanges des compartiments. Nous allons revenir sur ces deux points dans les paragraphes suivants.

5.2.2. Rôle de la quantité de E-cadhérines membranaires

D'après notre modèle cinétique, le ratio N/M peut varier si, par exemple, il y a une saturation à la membrane de toutes les E-cadhérines. Sans stimulation, le ratio à la membrane entre la β -caténine et la E-cadhérine dans des conditions normales est de 1:1 (Aberle et al., 1994; Hinck et al., 1994), une diminution du nombre de E-cadhérines à la membrane pourrait conduire à un excès de β -caténine qui ne pourraient plus être recrutée à la membrane et pourrait s'accumuler au noyau. Nous avons montré que cette saturation des E-cadhérines à la membrane n'est pas à l'origine de l'accumulation nucléaire de β -caténine.

Aux temps courts : pas de dérégulation des E-cadhérines.

Sous HGF, les cellules présentent de nombreux changements morphologiques, avec tout d'abord une augmentation de leur activité protrusive en quelques minutes, l'augmentation de leur étalement et leur aire, puis après quelques heures la dissociation de leurs contacts, et une fois isolée leur migration. La dissociation des contacts a souvent été attribuée à une diminution de la quantité de E-cadhérines présente à la membrane (Howard et al., 2011; Kamei et al., 1999; Miura et al., 2001). Mais la plupart du temps, la quantification du niveau de E-cadhérines est faite à des temps de 6, 12, 24 ou 48h, or la dissociation des contacts commence dès 3-4 heures après la stimulation. Nous avons d'ailleurs vérifié que l'intensité de E-cadhérines à la membrane ne chute pas avant 10 heures (Figure 79). De plus, cette diminution du niveau total de E-cadhérines sous HGF à des temps inférieurs à 12 heures a été contredit dans plusieurs études, notamment par l'équipe de J. de Rooij (De Rooij et al., 2005) où ils ont montré que les cellules qui adhérent sur des substrats fonctionnalisés avec des domaines extracellulaires de E-cadhérines maintiennent leur adhésion sous HGF. Egalement dans une autre étude, il a été montré que non seulement les E-cadhérines peuvent maintenir une adhésion au substrat fonctionnalisé avec des domaines de E-cadhérines, mais elles exercent des forces dessus (Maruthamuthu and Gardel, 2014).

Le recyclage des E-cadhérines et le rôle de Src

Le niveau de E-cadhérine à la membrane peut également être régulé par les phénomènes endo/exocytose. Notamment, la kinase Src, qui est nécessaire dans nos stimulations avec HGF ou lors de la migration collective des cellules pour observer une accumulation nucléaire de la β-caténine et une relaxation de la E-cadhérine, peut phosphoryler la E-cadhérine (Fujita et al., 2002; Palacios et al., 2005). Les phosphorylations de la E-cadhérine sur ses tyrosines Y754-755-756 par Src, permettent de recruter la protéine Hakai qui va conduire à l'ubiquitination de la E-cadhérine et sa dégradation une fois recyclée (Fujita et al., 2002; Palacios et al., 2002; Palacios et al., 2002; Palacios et al., 2005). Nous avons pu montrer que la phosphorylation par Src sur les tyrosines Y754-755-756 de la E-cadhérine n'a pas de rôle dans la relaxation de tension des E-cadhérines dans nos stimulations (Figure 96).

p120 est une aussi une cible de Src, néanmoins dans notre système nous pouvons écarter son rôle dans la régulation du complexe avec les mêmes expériences que celles menées avec le mutant de la E-cadhérine. En effet, le domaine d'interaction de la E-cadhérine avec p120 comprend celui des trois tyrosines mutées Y754-755-756 sur la E-cadhérine, qui lorsqu'elles sont phosphorylées permettent l'interaction avec Hakai au détriment de p120 (Ishiyama et al., 2010).

On pourrait être amené à conclure que l'endocytose et le recyclage des jonctions ne sont pas responsables de la déstabilisation du complexe dans nos situations. Cette interprétation reste sûrement un peu rapide, car la phosphorylation par Src de la E-cadhérine n'est pas l'unique mécanisme responsable de l'endocytose des E-cadhérines (Grant and Donaldson, 2009; Kowalczyk and Nanes, 2012; Yap et al., 2007). En effet sous HGF, il a été montré que l'endocytose des E-cadhérines peut être plus importante que sans HGF via un mécanisme impliquant les clathrines, l'activation de Rac ou IQGAP1 (Izumi et al., 2004) ou via un mécanisme impliquant la

GTPase Arf6 (Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Palacios et al., 2001). Afin de tester le rôle de l'endocytose et du recyclage des jonctions adhérentes, nous aurions voulu pouvoir perturber les mécanismes d'endocytose spécifiquement responsables de l'endocytose des E-cadhérines. Nous avons utilisé un inhibiteur tel que la dynasore (qui inhibe la dynamine à l'origine de l'endocytose clathrines dépendantes). L'ajout de cet inhibiteur annihile l'effet de HGF au niveau de l'étalement et de la séparation des cellules (Figure 81 et données non montrée). Mais surtout, il conduit à la mort des cellules en 6-7 heures car tout le trafic membranaire est inhibé, et ne permet pas de perturber uniquement le recyclage des cadhérines. Il semblerait que l'endocytose soit nécessaire pour que la voie de signalisation soit activée, mais elle est aussi nécessaire à la survie des cellules. Néanmoins, nous avons pu tester si l'échange cinétique à la membrane des E-cadhérines était modifié sous HGF. En effet, si HGF modifie le taux d'endocytose du complexe nous pourrions le détecter lors de nos expériences de FRAP. Or, nous n'avons pas détecté de différence de cinétique d'échange à la membrane des E-cadhérines ou de la β-caténine, avec ou sans HGF, aux contacts cellule-cellule (et données non montrées pour la E-cadhérine). Cette absence de différence de transport avait déjà été mise en évidence par FRAP sur les cellules MDCK soumises ou non à HGF pendant 2-3 heures (Twiss et al., 2013).

Il est donc peu probable que la déstabilisation des jonctions sous HGF soit due à un changement de recyclage et d'adressage des E-cadhérines à la membrane, et cette déstabilisation ne dépend pas de la phosphorylation par Src de la queue de la E-cadhérine.

Stabilité des E-cadhérines à la membrane sans 6-caténine

Nous avons montré que de la β -caténine de la membrane peut se retrouver au noyau. Lors du départ de la β -caténine de la membrane au noyau, la E-cadhérine peut se retrouver sans β -caténine et donc avec une tension nulle à un instant donné. Nous n'avons pas évalué le ratio E-cadhérine/ β -caténine à la membrane, car nous voulions au départ savoir si la β -caténine nucléaire pouvait provenir de la membrane. Or un ratio différent à la membrane entre la E-cadhérine et la β -caténine resterait néanmoins insuffisant pour prouver que la β -caténine partie de la membrane est celle qui est dans le noyau.

Ce détachement de la β-caténine de la E-cadhérine à la membrane, peut conduire à l'instabilité de la Ecadhérine à la membrane et à son endocytose (Chen et al., 1999; Huber et al., 2001). En effet, il a été montré que la dissociation de la β -caténine de la E-cadhérine peut conduire à sa dégradation en faisant apparaitre la séquence PEST riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine qui est un signal de dégradation de la Ecadhérine (Huber et al., 2001). En effet, la queue de la E-cadhérine non structurée sans β-caténine est considérée instable en solution, son index d'instabilité théorique est plus haut que 40. Ce type d'index est associé à un temps de vie de dégradation inférieur à 5 heures dans les cellules (Huber et al., 2001). Les séquences PEST peuvent être reconnues pour être dégradées, et certaines protéines possédant ce signal possède un temps de vie caractéristique de 30 min (Rogers et al., 1986); mais celui-ci n'a pas été spécifiquement évaluée pour la E-cadhérine dans les cellules. Il a toutefois était montré que la stabilité des Ecadhérines à la membrane dépend de sa liaison avec le cytosquelette (Adams et al., 1998; Angres et al., 1996; Capaldo and Macara, 2007; Chu et al., 2004; Nagafuchi et al., 1994). Comme le phénomène que nous observons est dynamique, on peut imaginer que pour un complexe β -caténine/E-cadhérine, la β -caténine se détache de la E-cadhérine, une autre β-caténine peut venir se lier, ou alors la E-cadhérine est endocytosée puis réadressée à la membrane avec une β -caténine. Nous avons observé que la β -caténine revient à la membrane avec nos expériences de FRAP (Figure 81). Finalement, la diminution à la membrane de la quantité totale de E-cadhérine va prendre du temps, et c'est sûrement pour cela que cette chute est observée après 10 heures sous HGF.

5.2.3. Rôle de synthèse et la dégradation de la β-caténine

Nous avons pu mettre en évidence qu'un changement dans la dégradation ou la synthèse de la β -caténine ne peut pas expliquer une accumulation de β -caténine au noyau dans les cellules épithéliales en migration. En effet, nous n'avons pas observé de changement de taux de synthèse pour la β -caténine GFP (Figure 78), ce qui bien sûr ne témoigne pas de la synthèse de la β -caténine endogène, mais nous pouvons au moins dire que l'accumulation de la β -caténine GFP que nous observons n'est pas due à un changement de synthèse de cette même β -caténine.

Le changement du taux de dégradation peut prendre un certain temps pour se mettre en place. Techniquement, nous devons évaluer la dégradation en suivant la fluorescence de la β-caténine mMaple pendant au minimum 4-5 heures pour extraire un taux de dégradation. Si ce taux de dégradation est évalué, directement à la suite de l'ajout de HGF, nous n'observons qu'une faible différence. Nous observons que la courbe de déclin est la combinaison de plusieurs temps de dégradation qui sont modifiés au cours du temps, avec au début un taux de dégradation comparable à celui des cellules non stimulées, et puis la pente du déclin change progressivement (données non montrées).La réponse suite à l'ajout de HGF des protéines impliquées dans la dégradation de la β-caténine prend un certain temps à se mettre en place très certainement, et le temps de vie de la β-caténine après l'ajout de HGF augmente progressivement au cours des premières heures. C'est pourquoi, nous avons choisi d'évaluer la dégradation sous HGF après 4 heures de traitement préalable. Nous avons observé une diminution de la dégradation de la β-caténine sous HGF. Une différence absolue d'environ une heure entre le temps de dégradation des cellules non traitées, et celui des cellules ayant été traitées 4 heures préalablement avec HGF, a été mesurée (Figure 81). Cette différence de dégradation sous HGF avait été mise en évidence préalablement dans d'autres types cellulaires par évaluation de la quantité de β-caténine par western blot (Howard et al., 2011; Ishibe et al., 2006; Koraishy et al., 2014; Papkoff and Aikawa, 1998). De plus, la dégradation de la β-caténine est encore plus faible dans les cellules à confluence (Figure 81), et pourtant bien qu'ayant un taux de dégradation faible, la β-caténine, dans ces cellules, ne s'accumule pas dans le noyau, mais est majoritairement présente à la membrane. Ainsi les variations observées de dégradation de la βcaténine ne peuvent pas expliquer son accumulation nucléaire.

En diminuant la dégradation de la β -caténine avec LiCl, la β -caténine s'accumule partout dans la cellule, en particulier au noyau sans pour autant conduire à un départ à la membrane de la β -caténine (Figure 84). Lors de cette perturbation, bien que la β -caténine se retrouve au noyau en large excès, la tension des E-cadhérines n'est pas pour autant affectée. Ainsi, la tension des E-cadhérines n'est pas contrôlée à postériori par la seule présence nucléaire de la β -caténine. Comme l'effet de LiCl sur la transcription des gènes a déjà été mis en évidence dans les cellules MDCK (Lyons et al., 2004; Maher et al., 2009; Masszi et al., 2004), nous pouvons conclure alors que la tension des E-cadhérines n'est pas contrôlée à postériori par la transcription des gènes dépendants de la β -caténine. Néanmoins, l'effet de LiCl et HGF n'est pas le même sur les cellules, et LiCl même sur des temps longs (15h) ne conduit pas à un phénotype mésenchymateux des cellules MDCK. Pour vérifier que sous HGF, la relaxation de tension observée sur les E-cadhérines n'est pas due à la transcription de gènes, nous aurions pu aussi utiliser la construction chimérique « β -caténine engrailed ». Cette chimère permet d'inhiber sélectivement la transcription des gènes médiées par la β -caténine nucléaire, sans affecter les contacts cellule-cellule (Montross et al., 2000).

Nous avions envisagé de pouvoir accéder au paramètre d'affinité entre la E-cadhérine et la β -caténine expérimentalement. Mais, l'affinité thermodynamique entre la E-cadhérine et la β -caténine est masquée en partie par la cinétique des phénomènes d'endo/exocytose de la E-cadhérine (Figure 83). Néanmoins, le fait que pour des cellules qui ne migrent pas (conditions contrôle ou sous LiCl), la β -caténine membranaire ne soit pas

transportée dans le noyau autant que dans les cellules en migration, soutient que quelque chose permet de modifier la stabilité du complexe à la membrane pour des cellules sous HGF ou après blessure de la monocouche.

5.2.4. Rôle de la kinase Src et des phosphorylations de la β-caténine

Le départ de la β -caténine membranaire au noyau est une conséquence d'une diminution d'affinité de la β caténine des jonctions adhérentes. Or les modifications post-traductionnelles de phosphorylation des tyrosines clés dans le complexe E-cadhérine/ β -caténine peuvent être à l'origine de la dissociation du complexe (Bonvini et al., 2001; Jean et al., 2009; Piedra et al., 2001; Roura et al., 1999; van Veelen et al., 2011; Zeng et al., 2006), et pourraient l'être également sous HGF. Il a été proposé que suite à la phosphorylation par Src, la dissociation de la β -caténine des E-cadhérines soit à l'origine de l'accumulation nucléaire de la β -caténine sous différentes perturbations mécaniques (Benham-Pyle et al., 2016; Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008; Whitehead et al., 2008) ou sous HGF.

La kinase Src

Nous avons montré, de notre côté, que l'activité de la kinase Src est requise en amont pour avoir une relaxation de tension des E-cadhérines et une accumulation nucléaire de la β-caténine dans les cellules MDCK avec nos stimulations (Figure 85). Nous avons également mis en évidence que l'activité de Src est constitutive et non suractivée sous HGF et lors de la migration collective de la monocouche épithéliale (Figure 86). Cette activité permissive de Src avait été aussi mise en évidence lors de la gastrulation chez l'embryon de *Drosophile* (Desprat et al., 2008).

Rôle des phosphorylations de la 6-caténine

Nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de la tyrosine Y654 de la β -caténine en premier puisque que le niveau de β -caténine phosphorylée en 654 a été trouvé plus élevé lors de l'activation mécanique de la voie de signalisation β -caténine (Benham-Pyle et al., 2016; Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008; Fernández-Sánchez et al., 2015), et qu'il s'agit du site d'interaction avec la E-cadhérine.

Grâce à l'utilisation de phospho-mutants de la β-caténine, nous avons pu montrer que la phosphorylation en Y654 de la β -caténine n'est pas suffisante à elle seule pour permettre une relocalisation au noyau de la β caténine, ni même nécessaire pour que la β-caténine s'accumule au noyau (Figure 94). Ce résultat suggère que la principale cible de Src lors de la perturbation n'est pas directement la phosphorylation de la β -caténine. Or il a bien été montré que Src peut phosphoryler la β -caténine en Y654 in vitro (Roura et al., 1999) et dans les cellules (Behrens et al., 1993; Hamaguchi et al., 1993; Hazan and Norton, 1998; Matsuyoshi et al., 1992), et cette forme phosphorylée de la β -caténine a une plus faible affinité avec la E-cadhérine *in vitro* et dans les cellules (Bonvini et al., 2001; Jean et al., 2009; Roura et al., 1999; van Veelen et al., 2011; Zeng et al., 2006). Néanmoins, nous avons vu que ces résultats ont été nuancé dans certaines conditions, où il a été montré que dans certaines lignées cellulaires, dont les MDCK, l'activation de l'activité de Src ne conduit pas nécessairement à une phosphorylation de la β -caténine (Hamaguchi et al., 1993; Papkoff, 1997; Reynolds et al., 1994; Takeda et al., 1995). Ou encore, il a été montré que le mutant mimant la forme phosphorylée de la β-caténine permet de réétablir l'adhésion cellulaire en culture et in vivo (Tominaga et al., 2008; van Veelen et al., 2011). Il est donc possible que, contrairement à ce qui a été montré sur les MDCK cultivées sur un substrat étirable cycliquement (Benham-Pyle et al., 2016), nos perturbations sur les cellules MDCK avec l'ajout de HGF ou blessure de la monocouche ne conduisent pas à une augmentation de la forme phosphorylée de la β -caténine.

Dans nos expériences, nous avons vu qu'une partie de la β -caténine peut être phosphorylée sans aucune perturbation (Figure 93). Cette forme phosphorylée de la β -caténine existe dans nos cellules avec ou sans perturbations, et on ne peut donc pas conclure que la phosphorylation de la β -caténine n'ait pas lieu. Par contre, on peut conclure que cette phosphorylation, à elle seule, ne peut pas complètement déclencher un départ de la β -caténine des contacts, et que dans nos conditions, il est possible de déclencher ce départ sans passer par la phosphorylation de la β -caténine. Ainsi, le rôle de cette phosphorylation n'est pas primordial dans nos stimulations. D'autre part, le mutant mimant la forme phosphorylée de la β -caténine, sans stimulation, présente statistiquement un peu plus de β -caténine au noyau (Figure 94). Ceci pourrait aussi être le résultat d'une différence du niveau d'expression pour les différents mutants qui conduirait à un peu d'accumulation au noyau. D'ailleurs, nous avons remarqué que c'est un artefact typique de la surexpression de la β -caténine, et peut-être la raison pour laquelle la localisation nucléaire a été observée pour certains mutants dans la littérature (Howard et al., 2011; Zeng et al., 2006).

Finalement, il se peut aussi qu'une différence relative d'affinité *in vitro* d'un facteur 10 ne soit pas réellement suffisante pour détacher substantiellement la β -caténine des contacts cellulaires. Tout cela implique qu'il existe une autre cible qui conduit à la dissociation du complexe E-cadhérine/ β -caténine. Et il n'est pas à exclure que la phosphorylation de la β -caténine survienne à la suite de la libération de la β -caténine de la membrane et soit importante pour la suite dans le noyau.

Nous aurions pu reproduire les expériences avec des mutants de la phosphorylation en Y142 de la β -caténine qui peut diminuer l'affinité de la β -caténine avec l' α -caténine (Brembeck et al., 2004; Piedra et al., 2001; Tominaga et al., 2008), mais les expériences menées avec la chimère de la E-cadhérine fusionnée avec celle de l' α -caténine E- α -TSMod ont permis de mettre en évidence que la relaxation de tension sur la E-cadhérine est indépendante de la présence de la β -caténine lors de la migration des cellules sous HGF ou lors de la cicatrisation d'une blessure de la monocouche (Figure 108). Cette expérience permet de dire que la réorganisation du cytosquelette est suffisante pour diminuer la tension dans les E-cadhérines, indépendamment de la présence de β -caténine, et est en amont de la relaxation de tension et de la translocation nucléaire de la β -caténine.

5.2.5. Mécanismes à l'origine du départ de la β-caténine membranaire

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer le départ de la β -caténine membranaire. Nous avons écarté deux possibilités : celle (1) d'une diminution du niveau global de E-cadhérines ou d'un changement de la cinétique de recyclage des E-cadhérines à la membrane, et celle (2) d'une modification d'affinité de la β -caténine avec les E-cadhérines à la suite de la phosphorylation de la β -caténine au niveau des tyrosines 654 ou 142.

Nos résultats montrent un rôle important du cytosquelette d'actine en amont de la corrélation entre la relaxation de tension des E-cadhérines et l'accumulation nucléaire de la β -caténine. On peut imaginer que la réorganisation du cytosquelette d'actine permette une relaxation de tension sur les E-cadhérines et que cette modification conduise à un changement d'affinité de la β -caténine avec la E-cadhérine et donc à un départ de la β -caténine de la membrane.

Hypothèses sur le départ de la 6-caténine de la membrane à la suite d'une relaxation observée sur les E-cadhérines :

Une question qui reste en suspens dans ce travail de thèse est la suivante : pourquoi une réorganisation du cytosquelette qui a pour conséquence de relaxer la tension des E-cadhérines conduirait à un relargage de la β-

caténine des contacts ? Le détachement de la β -caténine des E-cadhérines pourrait s'expliquer de plusieurs façons.

De manière générale, l'interface E-cadhérine- β -caténine pourrait changer de conformation sous l'effet d'une force, ce qui pourrait modifier son temps de vie d'interaction. Cette hypothèse n'a pour l'instant pas été testée expérimentalement. On peut quand même citer les expériences qui ont combiné à la fois de la spectroscopie de force par AFM sur la β -caténine purifiée *in vitro* à la modélisation de l'interaction E-cadhérine/ β -caténine *in silico* (Valbuena et al., 2012). Il a été montré que le domaine armadillo de la β -caténine peut se déplier par différents chemins sous l'application de force, à partir de 40 pN, *in vitro*. *In silico* la modélisation de l'application de forces à la β -caténine indique que les domaines de la région N-terminale (R1-R3) se déplient en premier. De plus, *in silico*, la modélisation montre que lorsque le domaine d'interaction de la queue de E-cadhérine comprend le maximum de régions RI-IV/V alors l'interaction E-cadhérine/ β -caténine est plus stable sous l'application d'une force que si le domaine RV n'est pas pris en compte dans l'interaction de la E-cadhérine avec la β -caténine. Lorsque la région RI-IV/V de la E-cadhérine interagissant avec la β -caténine est mise sous tension, un changement de conformation de la β -caténine écartant les répétitions armadillo R8 et R9, autour de la tyrosine 489, est observable.

D'autre part, il a été montré que le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine se comporte comme un « catch bond » c'est-à-dire qu'il a un temps de vie d'interaction plus long lorsqu'une tension est appliquée au complexe (Buckley et al., 2014) (cf 1.5.1). Dans cet article, les auteurs n'ont pas pu observer quelle interaction entre protéines se dissociait en premier lors de la rupture du complexe : est-ce le lien Ecadhérine/ β -caténine, ou β -caténine/ α -caténine ou α -caténine/F-actine ? Compte tenu des constantes de dissociation (mesurées *in vitro* sans force) des protéines entre elles, et de la conformation sensible à la force de l' α -caténine, les auteurs proposent qu'il s'agisse très certainement du lien α -caténine/F-actine. On peut également noter que toutes ces interactions étant en série, un catch bond entre l' α -caténine et l'actine aurait moins de chance d'avoir un effet sur la cohésion du complexe si toutes les interactions n'étaient pas aussi des catch bonds. On peut à partir de là imaginer deux scénarios possibles :

- Le premier serait qu'un tel lien renforcé sous tension puisse exister entre la β-caténine et l'E-cadhérine.
 Expérimentalement, il faudrait alors démontrer que l'interaction E-cadhérine/β-caténine se comporte elle aussi comme un catch bond, dont l'interaction serait plus faible lorsque la force exercée sur le complexe diminue. La façon la plus directe de tester cette hypothèse est *in vitro* à partir des protéines purifiées, appliquer une tension sur le complexe, par exemple, avec des pinces magnétiques, et mesurer le temps de vie d'interaction en fonction de la force. Ce point sera détaillé dans la partie Annexe 6.1.
- Un deuxième scénario ne nécessite pas qu'un tel comportement de catch bond entre la β-caténine et la cadhérine existe pour expliquer le départ de la β-caténine. En effet, il possible qu'à la suite de la relaxation médiée par le cytosquelette d'actine, la tension, alors plus faible dans le complexe, conduise, en vertu du catch bond entre le complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine, à une dissociation de l'α-caténine de l'actine d'après le modèle proposé par Buckley et al. 2014. Ensuite, on doit faire l'hypothèse que l'α-caténine détachée de l'actine a une affinité plus faible avec la β-caténine, soit en vertu d'une conformation moins favorable indépendamment de la force (pas exclu mais non démontré), soit à cause du manque de force, donc d'un comportement catch bond. Une fois l'α-caténine détachée de l'affinité entre la E-cadhérine et la β-caténine est plus faible lorsque ces deux protéines ne recrutent pas l'α-caténine (Pokutta et al., 2014b). Dès lors, la dissociation de la β-caténine des contacts pourrait être due au départ de l'α-caténine lorsque le cytosquelette exerce moins de force sur le complexe E-cadhérine/α-caténine/α-caténine.

Sinon, d'autres scénarios ne faisant pas appel ni aux phosphorylations dans le complexe, ni à un catch bond seraient possibles, mais semblent moins probables. Par exemple, d'éventuels canaux ioniques mécanosensibles pourraient modifier l'affinité de la E-cadhérine et la β -caténine en modifiant les propriétés électrostatiques dans leur environnement proche. Néanmoins, l'interaction E-cadhérine/ β -caténine n'est que très peu sensible à des modifications électrostatiques *in vitro* (Huber and Weis, 2001). D'autre part, l'affinité du complexe E-cadhérine/ β -caténine pourrait dépendre des propriétés, force dépendantes, de l'assemblage en « cluster » des queues cytoplasmiques de E-cadhérines (Delanoe-Ayari et al., 2004; Wu et al., 2015; Yap et al., 1997). Toutes ces hypothèses restent à encore à tester.

Induire une relaxation de tension des E-cadhérines et devenir de la 6-caténine ?

Nous aurions voulu pouvoir tester directement l'hypothèse selon laquelle une réorganisation du cytosquelette qui conduit à une relaxation de tension sur les E-cadhérines puisse être la cause du relargage de la β -caténine des jonctions cellule-cellule. Pour cela nous souhaitions pouvoir expérimentalement diminuer spécifiquement la tension exercée sur les E-cadhérines et observer le départ potentiel de la β -caténine de la membrane. Nous pouvons imaginer plusieurs expériences.

- La première est d'essayer de diminuer globalement, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, la tension dans le cytosquelette dans les cellules. Pour cela, nous savons que l'utilisation d'inhibiteurs tel que la cytochalasineB, ou ML-7 et Y27632 permet de respectivement dépolymériser l'actine, ou inhiber indirectement les moteurs de myosines, et conduit à relaxer la tension sur les E-cadhérines. Malheureusement, ces inhibiteurs perturbent plus qu'uniquement les forces exercées sur les E-cadhérines. Ils touchent tout le cytosquelette d'actomyosine, et pas uniquement les myosines sur l'actine corticale comme nous l'aurions souhaité, et donc peuvent modifier les tensions dans les jonctions adhérentes mais aussi dans les adhésions focales. Ces inhibiteurs peuvent sur des temps longs être létaux pour les cellules, ce qui nous a empêché de pouvoir visualiser un possible relargage de la β-caténine (données non montrées). De la même façon, afin de tester si la relaxation de tension est à l'origine du départ de la β-caténine de la membrane, nous avions imaginé pouvoir prévenir cette relaxation sous HGF en traitant les cellules avec de la calyculineA, qui est connue pour augmenter l'état actif phosphorylé de la myosine et maintenir une forte « tension » dans les cellules. Néanmoins, là aussi, ce traitement affecte plusieurs autres cibles que les phospho-myosines proches des contacts, en inhibant toutes les phosphatases des sérines et thréonines. Le traitement des cellules avec la calyculineA conduit à la contraction des cellules et à leur détachement du substrat en quelques heures (données non montrées). Finalement, l'utilisation de telles perturbations pharmacologiques dans la cellule, est difficile, et ne nous a pas permis de conclure sur la causalité de la relaxation de tension des E-cadhérines et du départ de la membrane de la β-caténine en raison des effets trop violents et non spécifiques des inhibiteurs.

- D'autre part, nous avions pensé également à perturber l'ancrage au cytosquelette des E-cadhérines en ablatant les fibres d'actine proches des E-cadhérines et visualiser le devenir de la β-caténine. Ce point sera commenté plus en détails dans la partie Annexe 6.3.1, mais être capable de détecter le départ de la β-caténine à la suite de l'ablation est un point délicat car une ablation ponctuelle ne maintient pas forcément l'état relaxé assez longtemps.

En fin de compte, à l'heure actuelle, il n'existe pas de techniques qui permettent de manipuler les forces dans les cellules avec une spécificité moléculaire, et de tester l'interaction entre deux protéines en fonction de la force.

5.3. Couplage avec les adhésions focales et rôle de FAK

5.3.1. FAK, cible de Src

Nous avons vu que la cible des kinases Src n'est pas directement dans le complexe E-cadhérine/β-caténine. Nous avons cherché d'autres cibles potentielles de Src, et il n'en manque pas... plus de 100 protéines différentes ont été identifiées comme phosphorylées à la suite de la surexpression de Src (Ferrando et al., 2012).

En observant la localisation du mutant constitutivement actif de Src, nous avons pu identifier que celui-ci, présent à la membrane, se trouve spécifiquement enrichi aux adhésions focales. Or, dans les cellules cancéreuses du colon, l'expression exogène de ce mutant de Src constitutivement actif conduit au non recrutement de la E-cadhérine au contacts cellule-cellule de manière intégrine-FAK dépendantes (Avizienyte et al., 2002). De plus, l'expression d'un mutant de FAK ne pouvant plus être phosphorylé par Src sur les tyrosines 407-576-577-861 et 925 permet de retrouver un marquage de E-cadhérine à la membrane et de conserver les contacts cellule-cellule. Dans notre système, nous avons pu montrer également qu'une voie de signalisation dépendante de Src et FAK, est impliquée dans la relaxation de la E-cadhérine et de la translocation de β -caténine suite à l'ajout de HGF et à la blessure des cellules. Il existe donc un lien fonctionnel entre les adhésions focales et les jonctions adhérentes mais qui ne se résume pas seulement à une régulation des niveaux de protéines. En effet, nous avons montré plus particulièrement que l'activation de FAK est nécessaire à la relaxation de tension des E-cadhérines et à la translocation de BAC caténine (Figure 102). FAK est suractivé sous HGF contrairement à Src (Figure 99), et cette activation de FAK dépend en partie de Src. En effet, en étant phosphorylée par Src sur ses tyrosines 576-577, l'activité de la kinase FAK est plus élevée. Néanmoins son ouverture qui conduit à l'autophosphorylation en Y397 de FAK est, elle, Src-indépendante (Figure 101).

5.3.2. Origine de l'ouverture de FAK et de son autophosphorylation

L'ouverture de FAK qui conduit à son autophosphorylation peut dépendre de multiples perturbations biochimiques, mais aussi peut être mécaniques. Par exemple, l'autophosphorylation de FAK a été mise en évidence lors de l'étirement de cellules sur des substrats, l'application d'un flux sur les cellules, d'une force de traction, ou selon la rigidité du substrat (Zebda et al., 2012). De plus, FAK pourrait être activé mécaniquement à l'échelle moléculaire. Il a été montré par simulation que l'ouverture et l'autophosphorylation de FAK pouvait être force dépendante (Zhou et al., 2015) (Figure 111.a). L'application de tension à travers le domaine de liaison à PIP2 de FERM et le domaine de liaison FAT, permet d'éloigner le lobe F2 du domaine FERM du domaine C kinase et d'ouvrir la conformation de FAK, libérant ses tyrosines Y756/577. Néanmoins, la possibilité que FAK puisse être une protéine sous tension reste à démontrer expérimentalement.



Figure 111 – a) Modèle issu de simulation pour l'ouverture de FAK suite à l'application d'une tension après la liaison du domaine FERM à PIP2 à la membrane et du domaine FAT au cytosquelette (Issu de Zhou et al. 2015). b) Modèle de l'activation de FAK par sa liaison avec le récepteur cMet. Suite à la liaison du domaine FERM de FAK à la membrane avec PIP2 et/ou à la queue cytoplasmique de cMet activé par HGF, grâce à son domaine chargé positivement KAKTLRK dans son domaine FERM. cMet phosphoryle la tyrosine 194 du domaine FERM de FAK, ce domaine alors chargé négativement va interagir avec le domaine chargé positivement du domaine FERM, et conduire à un changement conformationnel libérant le domaine kinase du domaine FERM, et l'autophosphorylation de Y397. Ensuite, Src peut reconnaitre grâce à son SH2 la tyrosine Y397 phosphorylée et complètement activer FAK en le phosphorylant sur ses kinases 576/577. (Issu de Chen et al. 2011). c) Modèle de l'activation de FAK par les intégrines. FAK est activé grâce à sa liaison avec PIP2 (noté PtdIns(4,5)P2 dans ce schéma) qui est enrichi à la membrane grâce à la kinase PIP5K (notée PtdIns(4)P5KIY sur le schéma). L'étape 1 consiste à l'activation des intégrines par la taline, puis le domaine FAT de FAK s'associe avec la taline, et le domaine FERM de FAK se lie aux PIP2 enrichis à la membrane. (Issu de Frame et al. 2010).

Il a également été montré que l'autophosphorylation de FAK peut avoir lieu directement à la suite de l'interaction entre le récepteur de HGF, cMet, et FAK (Chen et al., 2011). En effet, il a été montré précédemment que FAK peut interagir avec cMet (Chen and Chen, 2006; Chen et al., 1998; Sieg et al., 2000). Dans le dernier article de Chen et al., les auteurs ont montré que, lors de l'ajout de HGF sur les cellules MDCK, cMet peut phosphoryler directement FAK sur sa tyrosine 194 dans son domaine FERM, et conduire ainsi à son ouverture, et une fois en configuration ouverte à l'autophosphorylation de la tyrosine 397 de FAK (Figure 111.b) (Chen et al., 2011). Nous n'avons pas testé si cette liaison entre FAK et cMet est importante également donc nos cellules MDCK sous HGF. On peut s'attendre à ce que le récepteur cMet soit activé lors de sa liaison avec son ligand HGF, reste à montrer dans nos conditions que l'ouverture de FAK est une cible de cMet en par exemple examinant la phosphorylation 194 de FAK. En revanche, pour les cellules en migration à la suite de la blessure de la monocouche, soit cMet n'est pas impliqué et FAK n'est alors pas activé par cMet, soit cMet est impliqué mais dans ce cas ça n'explique pas comment il est lui-même activé lors de cette stimulation.

De plus, l'autophosphorylation de FAK peut également avoir lieu à la suite de l'activation des intégrines (Figure 111.c). Expérimentalement, le regroupement en agrégats des intégrines conduit à une phosphorylation rapide de la tyrosine 397 (Calalb et al., 1995). Le mécanisme n'est pas vraiment bien compris (Frame et al., 2010). En

effet, le domaine FERM de FAK peut être impliqué directement dans une interaction avec une région de la partie cytoplasmique des β intégrines (Schaller et al., 1995), ou avec les talines et paxillines par son domaine FAT (Sieg et al., 2000). Le modèle intermoléculaire d'activation de FAK par les intégrines est basé sur le fait que soit le domaine FERM de FAK interagit avec les intégrines et son domaine FAT avec la taline ; soit sur un recrutement du domaine FAT avec la taline et grâce à l'activation de PIP2 à la membrane, une liaison de FERM à la membrane. Quelle que soit l'implication d'autres protéines comme les intégrines, la taline ou PIP2 pour conduire à l'ouverture de FAK, cela repousse le problème de comprendre quelle est la première cause conduisant à leur activation, et cela n'exclue pas dans un cas, comme dans l'autre qu'une tension doive être exercée sur FAK attaché ainsi de part et d'autre. Une dernière possibilité repose sur la dimérisation transitoire de FAK qui conduit à son autophosphorylation en Y397 (Toutant et al., 2002).

Pour l'instant, dans nos stimulations, la manière dont la migration des cellules, activée par l'ajout de HGF ou à la suite de la blessure de la monocouche de cellules, conduit à l'autophosphorylation de FAK reste inconnue.

Dès les premières minutes et pendant la première heure sous HGF, l'activité protrusive des cellules est augmentée. On peut d'ailleurs noter que sous HGF, les cellules MDCK peuvent uniquement migrer et se dissocier les unes des autres que si elles ont accès à un espace libre à envahir (Ishibe et al., 2006; Maruthamuthu and Gardel, 2014). En effet, les cellules cultivées sur des substrats circulaires adhésifs où elles sont confinées, sont insensibles à l'ajout de HGF (Maruthamuthu and Gardel, 2014). Pour les cellules confluentes HGF n'a aussi aucun effet, le récepteur cMet est toujours présent et activé mais les voies de signalisation en dépendant ne sont pas activées (Ishibe et al., 2006). Nous avons vérifié que sur les monocouches confluentes incubées avec HGF, nous n'observons pas d'accumulation de β -caténine au noyau, ni de relaxation de tension sur les Ecadhérines (données non montrées). Ainsi, peut être que la présence d'un espace libre à envahir et la formation de protrusions en combinaison avec HGF pour des cellules en ilots, ou sans aucune autre stimulation lors de la migration collective des cellules à la suite d'une blessure, peuvent activer FAK. Ces expériences suggèrent que l'activation par le ligand HGF ne repose pas uniquement sur une activation de voies biochimiques dans la cellule, indépendamment des contraintes mécaniques. Les contraintes mécaniques ont un rôle important à jouer, mais les mécanismes ne sont pas encore connus. Il pourrait s'agir par exemple d'un rôle soit dans l'activation directe de FAK, soit dans l'activation des intégrines.

Nous avons également remarqué que l'utilisation du mutant de Src constitutivement actif permet d'induire à la fois la relaxation des E-cadhérines et la translocation nucléaire de la β -caténine, sans aucune autre stimulation, et peut donc outrepasser l'activation de FAK Src-indépendante. Le rôle de Src constitutivement actif qui peut, sans besoin de FAK, activer la formation et la dynamique des adhésions focales pour permettre la migration des cellules, a été observé dans des fibroblastes n'exprimant plus FAK (Hsia et al., 2003; Moissoglu and Gelman, 2003). Dans notre cas, l'utilisation de Src constitutivement actif permet la relaxation de tension des E-cadhérines et l'accumulation nucléaire de la β -caténine, mais nous n'avons pas testé si l'activité de FAK était nécessaire au processus ou pas.

Il serait intéressant de pouvoir caractériser à la fois (1) la cause en amont de l'activation de FAK conduisant à son ouverture et son autophosphorylation ; et (2) le rôle de cette activation de FAK dans la suite du processus pour définir les intermédiaires entre FAK, au niveau des adhésions focales, et les jonctions adhérentes. Concernant le second point, la cible privilégiée reliant adhésions focales et jonctions adhérentes, se porte sur le cytosquelette d'actine, et il a été montré qu'un nombre important d'effecteurs de FAK sont des cibles du cytosquelette telles que RhoA ou Rac1 (Schaller, 2010). Nous pourrions donc envisager de décrire quels sont les intermédiaires qui sont activés à la suite de FAK, et qui conduisent à la réorganisation du cytosquelette que nous avons observé.

5.4. L'actine : lien entre les adhésions focales et les jonctions adhérentes

Sous HGF, une réorganisation du cytosquelette d'actine avait déjà été mise en évidence avant notre travail (Balkovetz and Sambandam, 1999; De Rooij et al., 2005; Dowrick et al., 1991; Jang et al., 2017; Mangold et al., 2011; Rosen et al., 1990; Sperry et al., 2010), mais les interprétations des résultats peuvent être différentes en fonction des articles et des équipes de recherche. Dans ce paragraphe nous allons revenir sur certains d'entre eux pour essayer de comprendre comment se situent nos observations sur les fibres de stress et le recrutement de la phospho-myosine dans cette littérature.

Par exemple, en 2005, De Rooij et al. ont proposé comme hypothèse qu'à la suite de l'ajout de HGF l'augmentation des forces au niveau des contacts cellule-cellule conduit alors à la rupture des jonctions avec les E-cadhérines (De Rooij et al., 2005). Cette hypothèse a été proposée à la suite de leur mise en évidence par western blot d'une augmentation transitoire, après 30min de traitement avec HGF, de la quantité totale de phospho-myosine. Sur les images de marquage de l'actine et de la phospho-myosine, on peut voir un enrichissement de certaines fibres mais pas vraiment des contacts cellule-cellule (Figure 112.a). Aucune quantification n'est faite. Toutes les conclusions tirées de ces observations ne sont que des interprétations des images (Figure 112.a), et ont conduit à l'idée selon laquelle la tension augmente au niveau des contacts cellule-cellule striés sous HGF.



Figure 112 - a) i) « Cell–cell adhesions are pulled apart during scattering »; Marquage des cellules MDCK après 5 heures de traitement avec HGF pour l' α -caténine (majenta), l'actine (vert), et la paxilline (bleu). Les contacts sont striés par endroit et très déformés, étirés, mais cela n'est pas forcément le témoin d'une tension plus importante aux contacts que sans HGF. La déformation pourrait être le résultat de contacts plus « souples ». ii) Marquage de l'actine et de la pMLC sans HGF, et après 2h ou 5h d'incubation des cellules MDCK avec HGF. Les contacts ne sont pas marqués.(Issu de De Rooij et al. 2005). b) Images représentatives des cellules MDCK traitées avec HGF pendant 2h et marquées pour p120 et pMLC. Un quadrillage est défini automatiquement. Le marquage p120 sert de masque pour définir les régions des jonctions (vert), et en rouge sont notés les régions cytoplasmiques prises en compte dans la quantification du ratio pMLC(jonctions)/pMLC(cytoplasme). Les étoiles jaunes indiquent les régions « faux positif » considérées comme des jonctions (Issu de Le Duc et al. 2010).

Plus tard, la même équipe a cette fois-ci quantifié la présence de phospho-myosine au contact grâce au marquage de p120 (Le Duc et al., 2010). Ils ont décidé d'analyser automatiquement un grand nombre d'images en se servant du marquage de p120 pour détecter la membrane. La région mesurée autour du marquage inclut une zone plus large et donc prend en compte des fibres d'actine qui ne sont pas colocalisées avec la membrane.

De plus, cette approche à l'aveugle peut comporter des faux positifs dans l'identification des régions membranaires avec le marquage p120, notamment dans l'article on peut voir que des zones périnucléaires qui sont utilisées dans la quantification (étoile jaune sur la Figure 112.b) (Le Duc et al., 2010). En regardant les images de marquage d'actine, phospho-myosine et des jonctions, on s'aperçoit que celles-ci ne sont pas si différentes de celles que nous avons. Néanmoins, leur proposition d'une augmentation de tension aux contacts sous HGF a été reprise dans différentes.

Or d'un autre côté, plusieurs autres études ont été menées sur la description du cytosquelette, et beaucoup s'accordent sur un désengagement du cytosquelette d'actomyosine des jonctions adhérentes sous HGF (Balkovetz and Sambandam, 1999; Catizone et al., 2015; Jang et al., 2017; Li et al., 2015; Mangold et al., 2011; Maruthamuthu and Gardel, 2014; Sperry et al., 2010). De ces études a donc été proposé qu'il existe une relaxation de tension au niveau des jonctions adhérentes. Il a été montré, par immunofluorescence, que le ratio entre la quantité d'actine présente à la membrane et la quantité totale dans la cellule, diminue ; que de nombreuses fibres de stress sont formées ; et que la distance entre le cortex d'actine et les jonctions augmente sous HGF (Figure 113.a) (Sperry et al., 2010). Sous HGF, les contacts peuvent présenter plusieurs morphologies différentes. Certaines présentent des contacts linéaires où les fibres d'actine sont parallèles au contact mais plus éloignées, alors que pour d'autres contacts les fibres sont perpendiculaires, « striées » et connectées entre les deux cellules (Maruthamuthu and Gardel, 2014). De même, en dynamique dans les cellules vivantes, il a été confirmé à deux reprises grâce au marquage de l'actine GFP ou avec le marqueur LifeAct que l'actine se délocalise des jonctions suite à l'ajout d'HGF (Figure 113.a ii et b.ii)(Mangold et al., 2011; Sperry et al., 2010) avant même la dispersion des cellules. De plus, le marquage en myosine VI des jonctions diminue sous HGF (Mangold et al., 2011) (Figure 113.b). La contractilité du cytosquelette a été évaluée en marquant la phosphomyosine sous HGF, et il a été montré que les nouvelles fibres de stress à l'intérieur de la cellule colocalisent avec un enrichissement en phospho-myosine de manière dépendante de la kinase Abl (Li et al., 2015).



Figure 113 – a) i) En haut : Images représentatives des cellules MDCK traitées avec HGF pendant 2h et marquées pour la Ecadhérine (bleu), la myosine IIA (rouge) et l'actine (vert). En bas : Quantification du ratio moyen entre l'actine colocalisant avec le signal E-cadhérine à la membrane, et le signal total de l'actine dans la cellule pour différents temps après ajout de HGF. ii) Fluorescence de l'actine GFP au cours du temps après ajout de HGF. La flèche pleine montre un enrichissement ponctuel en actine. Les parenthèses montrent la dissociation en plusieurs filaments d'actine après 1h51min avec HGF. (Issu de Sperry et al. 2010). b) i) En haut : Images représentatives des cellules Caco-2 traitées avec HGF pendant 15 minutes, et marquées pour la Myosine VI et l'actine. En bas : quantification du ratio entre la myosine VI et les E-cadhérines à la

membrane avec et sans HGF. ii) Kymographe du marquage avec LifeAct de l'actine à un contact pour des cellules avec ou sans HGF. (Issu de Mangold et al. 2011).

D'autre part, dans l'article de De Rooij et al. 2005, les auteurs ont également observé un plus fort recrutement de vinculine au niveau des jonctions E-cadhérines sous HGF (Le Duc et al., 2010). Ce recrutement de la vinculine les a amené à proposer que les jonctions sous alors sous tension. Or, l'inverse de cette observation a été mise en évidence plus tard, lorsqu'il a été montré que l'ajout de HGF sur des cellules MCF10 conduit à une forte diminution de la forme phosphorylée Y822 de la vinculine au niveau des contacts cellule-cellule (Bays et al., 2014). De même, dans une autre étude menée sur les MDCK, il a été montré que HGF peut prévenir la co-localisation des E-cadhérines avec la vinculine et l'actine, et conduit ainsi à une augmentation des fibres de stress internes liées aux adhésions focales, et une diminution des fibres du cortex reliées aux jonctions adhérentes (Jang et al., 2017). Les résultats de ces deux études (Jang et al., 2017; Le Duc et al., 2010) sont en opposition, et examiner avec plus de précision le rôle de la vinculine avec et sans HGF avec des marquages plus convaincants, et quantifiés de manière robuste, sera nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes de réorganisation du cytosquelette. Ces mesures descriptives du recrutement de la vinculine pourraient être associées avec des mesures de la tension aux contacts cellule-cellule de la vinculine.

Nous avons montré nos conditions expérimentales que, dans les cellules en migration, le cytosquelette d'actine est réorganisé. Cette réorganisation est caractérisée par un enrichissement des fibres des stress ventrales, en phospho-MLC, au détriment du cortex d'actine des contacts cellule-cellule. Cette réorganisation est dépendante des kinases Src et FAK. Une telle réorganisation au cours de la migration des cellules est suffisante pour induire une relaxation des E-cadhérines, indépendamment du départ de la β -caténine aux contacts. Ainsi, notre travail a permis de corréler la description du cytosquelette à la mesure de la force exercée au niveau des E-cadhérines pour la première fois. La description de l'organisation du cytosquelette et des protéines recrutées n'est que descriptive et ne permettra jamais à elle seule de conclure quant à la force exercée sur le complexe, mais le développement des outils de mesure de force à l'échelle moléculaire avec les senseurs FRET dans différentes molécules telles que la E-cadhérine, l' α -caténine, la vinculine... permet de mieux comprendre les effets du cytosquelette sur les jonctions cellule-cellule.

5.5. Nouveau modèle émergent

Lors de la migration des cellules sous HGF ou après blessure, nous avons montré que l'accumulation nucléaire de la β -caténine est due à un départ significatif de celle-ci de la membrane. Cette translocation de la β -caténine a lieu en aval d'une voie de signalisation impliquant les kinases Src et FAK, et qui conduit à une relaxation de tension des E-cadhérines. Le mécanisme sous-jacent implique une réorganisation du cytosquelette d'actine. En revanche, les phosphorylations des tyrosines dans le complexe cadhérine/caténine ne sont pas requises.

Nos différents résultats nous ont amené à proposer le modèle suivant présenté sur la Figure 114 :

- Etat de départ : Sans perturbation, les cellules épithéliales forment des ilots ou des monocouches confluentes et forment des jonctions adhérentes linéaires avec un cortex d'actomyosine très enrichi au niveau des jonctions cellule-cellule (Figure 65).
- à la suite de la perturbation (ajout du facteur de croissance HGF ou blessure de la monocouche) induisant la migration des cellules, la kinase FAK se retrouve en conformation ouverte et sa tyrosine 397 est auto-phosphorylée.
- (2) grâce à l'activité constitutive de la kinase Src, celle-ci va pouvoir se lier à FAK et phosphoryler ses autres tyrosines, activant complètement la kinase FAK.

- (3) Cette activation de FAK permet de réorganiser le cytosquelette d'actomyosine. Cette réorganisation est caractérisée par un enrichissement en phospho-myosine sur les fibres de stress au détriment du cortex d'actine au niveau des jonctions cellule-cellule.
- (4) Cette réorganisation du cytosquelette d'actomyosine conduit à une relaxation de tension des Ecadhérines, et
- (4') une translocation de la β-caténine de la membrane au noyau qui conduit à son accumulation nucléaire et une activation de la transcription des gènes dépendants de la β-caténine. Cette accumulation n'est pas due à une modification de la synthèse ou de la dégradation de la β-caténine, mais bien à un départ de la β-caténine à la membrane spécifiquement dans les cellules en migration.



Figure 114 – Modèle du rôle de la E-cadhérine dans la voie de signalisation β-caténine.

L'utilisation de la chimère E-cadhérine fusionnée avec l' α -caténine nous a permis de conclure que la relaxation de tension des E-cadhérines n'est pas l'unique conséquence du départ de la membrane de la β -caténine, car sans β -caténine, les perturbations peuvent tout de même conduire à la relaxation de tension de la E-cadhérine. Le mécanisme du départ de la β -caténine à la membranaire n'est pas due à une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β -caténine (connue dans certains systèmes pour diminuer son interaction avec la E-cadhérine), ni celle de la phosphorylation de la E-cadhérine (qui conduit à son endocytose et son recyclage). Le départ de la β -caténine membranaire pourrait être complètement indépendant de la relaxation de tension des E-cadhérines, et mais cela ferait appel à des mécanismes inconnus. Néanmoins, nous proposons un modèle où la tension alors plus faible dans les E-cadhérines conduit au détachement de la β -caténine.

Les E-cadhérines ne sont pas, dans nos conditions, les premiers mécanotransducteurs du signal extracellulaire. Par ailleurs, le fait que la E-cadhérine ne soit pas un mécanotransducteur du signal extracellulaire n'implique pas forcément qu'il y ait un autre mécanotransducteur en amont. Le signal extracellulaire n'est peut-être pas mécanique après tout dans nos stimulations. En revanche, les E-cadhérines sont des senseurs intracellulaires de la perturbation mécanique qui relient les jonctions adhérentes aux adhésions focales. Sous HGF, par exemple, cela signifie que HGF ne conduit pas à un affaiblissement des jonctions cellule-cellule directement, mais le fait à travers une connexion fonctionnelle entre les protéines des jonctions adhérentes, le cytosquelette d'actomyosine et les adhésions focales.

Plusieurs points de ce modèle ne sont pas encore connus ou restent à démontrer :

- Les mécanismes conduisant à l'activation de FAK par son ouverture sont encore inconnus. Afin de mieux comprendre cette activation de FAK, on pourrait en premier lieu tester si son activation est dépendante des protrusions formées à la suite de l'ajout de HGF en confinant les cellules sur des cercles adhésifs et ajouter HGF. Ce confinement des cellules ne conduit pas à la perte des contacts cellule-cellule sous HGF (Maruthamuthu et al., 2011). Il faudrait explorer si le confinement prévient également la relaxation de tension des E-cadhérines et l'accumulation nucléaire de β-caténine. Mais, si FAK n'est pas autophosphorylé sur ces surfaces alors on pourra dire que la liaison de HGF avec son récepteur cMet et les voies de signalisations en aval ne sont pas suffisantes pour activer FAK, que cette activation nécessite une contribution mécanique d'un partenaire (intégrines, taline) qui ne s'active pas non plus lorsque les cellules sont confinées, ou que le confinement ne permette pas une activation mécanique de FAK. Afin de savoir si FAK peut être activé mécaniquement, on peut essayer de savoir s'il est sous tension et si son ouverture est mécaniquement dépendante dans les cellules.
- Les autres inconnues de ce modèle concernent les protéines intermédiaires nécessaires à la réorganisation du cytosquelette. Par exemple, il serait intéressant de savoir quelles sont les protéines phosphorylées par FAK dans les adhésions focales comme potentiellement la paxilline, qui peuvent modifier la dynamique et l'organisation des adhésions focales, ou encore d'autres cibles de FAK telles que RhoA qui pourrait ensuite recruter la formation de phospho-myosine, ou Rac dans les protrusions pour induire la polymérisation de l'actine, ou encore Arp2/3... De même, il serait intéressant de savoir si certaines protéines structurelles du cytosquelette d'actine sont impliquées spécifiquement dans les fibres de stress, ou dans le désengagement du cytosquelette cortical. Il est vraisemblable que plusieurs protéines soient impliquées dans la réorganisation du cytosquelette entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales.
- La raison du départ de la β-caténine de la membrane à la suite de la relaxation de tension des E-cadhérine est à démontrer expérimentalement. Ce départ pourrait être justifié par le comportement de catch bond du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine soit directement par un comportement de catch bond entre la β-caténine et la E-cadhérine au sein du complexe, soit en raison d'un départ de l'α-caténine facilité par la relaxation de tension dans le complexe et un détachement de la β-caténine de la E-cadhérine car la β-caténine a une affinité plus faible pour la E-cadhérine lorsqu'elle n'est pas liée à l'α-caténine (Pokutta et al., 2014b).

Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle de la tension des E-cadhérines, et de la connexion fonctionnelle des jonctions adhérentes avec les adhésions focales dans la régulation de la voie de signalisation β -caténine qui contrôle l'expression de gènes, lors de la migration des cellules épithéliales.

Dans notre étude, les E-cadhérines ont un rôle de senseur de la mécanique intracellulaire. Le rôle de la tension des E-cadhérines dans les cas où la voie de signalisation β -caténine est mécaniquement activée n'est pas encore connu (Benham-Pyle et al., 2016; Brunet et al., 2013; Desprat et al., 2008). Par exemple, lors du développement chez l'embryon de *Drosophile* ou de poisson zèbre, on peut se demander si la tension des E-cadhérines a aussi un rôle dans la localisation de la β -caténine, mais également quel est le rapport entre la mécanique à l'échelle du tissu et celle de la molécule. De même lors de l'étirement du substrat des cellules MDCK qui conduit à une accumulation nucléaire de β -caténine, existe-t-il aussi un lien entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales, et comment se propage l'information mécanique de l'échelle cellulaire à moléculaire ? Cette question du rapport entre la mécanique à l'échelle du tissu et de la molécule n'est toujours pas résolue, bien qu'il y ait eu des tentatives (Chang and Kumar, 2013; Sarangi et al., 2016; Sim et al., 2015). Nous nous sommes d'ailleurs intéressés à ce problème en tirant partie de systèmes de substrat fonctionnalisés permettant d'avoir des cellules suspendues ou des cellules en cisaillement où les forces cellulaires, et moléculaires dans les E-cadhérines dans les E-cadhérines peuvent être mesurées (cf partie 6.3 en Annexes).

De plus, la voie de signalisation β -caténine est impliquée dans de nombreux mécanismes du développement chez différents organismes, de la gastrulation à la formation du mésoderme en passant par les divisions asymétriques, mais également dans la maintenance de la pluripotence ou encore dans de nombreux cancers ou maladies cardiaques. Il serait intéressant de pouvoir déterminer si dans ces situations les contraintes mécaniques ont un rôle dans la régulation de la voie de signalisation β -caténine, et comment. La voie de signalisation β -caténine n'est pas la seule voie de signalisation mécaniquement inductible, et elle partage des intermédiaires communs avec certaines voies telles que les voies Hippo, Merlin ou zyxine. Finalement, on ne connait que très peu où, quand, comment et qui convertit le signal mécanique en signal biochimique dans la cellule. Tout reste à faire pour la plupart des voies de signalisation mécaniquement inductibles connues.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Dans les cellules épithéliales, la β-caténine est un composant nécessaire au lien physique entre le cytosquelette et la protéine transmembranaire d'adhérence la E-cadhérine. La E-cadhérine est effectivement sous tension mécanique due au cytosquelette d'actomyosine. La β-caténine est aussi un co-facteur de transcription mécanoinductible, mais les mécanismes moléculaires en amont ne sont pas connus. La question que nous nous sommes posés dans cette thèse concerne les mécanismes moléculaires en amont de l'accumulation de la β-caténine et le rôle de la tension des E-cadhérines dans la voie de signalisation β -caténine. Pour répondre à cette question, nous avons choisi comme système d'étude les cellules épithéliales MDCK et induit leur migration par le facteur de croissance HGF ou par blessure sur un épithélium, deux conditions qui récapitulent au moins partiellement une transition épithélio-mésenchymateuse. Nous avons montré que, pour les cellules en migration, une voie de signalisation impliquant les kinases Src et FAK permet une réorganisation du cytosquelette d'actomyosine, la relaxation de la tension des E-cadhérines et une translocation de la β-caténine de la membrane au noyau de manière indépendante de sa phosphorylation. Plus précisément, en combinant des techniques d'imagerie de fluorescence, de senseurs de forces et de bioactivité, de photoconversion, avec des perturbations génétiques et pharmacologiques, nous avons mis en évidence une corrélation entre la relaxation de tension dans les Ecadhérines et l'activation de la voie β-caténine dans un contexte d'EMT. Nous avons aussi prouvé que la βcaténine nucléaire provient de la membrane, indépendamment de la régulation de sa dégradation ou de sa synthèse, uniquement pour les cellules en migration. De plus, la phosphorylation des tyrosines de la β-caténine n'est pas la principale cause de sa translocation nucléaire. Nous avons également démontré que la relaxation de tension des E-cadhérines, la translocation nucléaire de la β-caténine et la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine nécessite par contre une activation de FAK par Src, et le remodelage du cytosquelette est suffisant pour induire une relaxation de tension sur les E-cadhérines. Finalement, nos résultats sont en accord avec un modèle selon lequel la translocation nucléaire de la β-caténine et son activité transcriptionnelle surviennent d'une réorganisation du cytosquelette qui est perçue par la E-cadhérine, sous le contrôle de Src et FAK associées à une stimulation extérieure.

Ce travail a donc permis de valider l'hypothèse d'une translocation de la membrane au noyau de la β -caténine, et permet de regarder sous un angle nouveau les études déjà menées illustrant l'importance de l'activation mécanique de la voie de signalisation β -caténine dans d'autres contextes : lors du développement, de la différenciation osseuses, du développement de certaines cellules cancéreuses, ou sur des cellules épithéliales dont le substrat est étiré. De plus, dans nos conditions, la phosphorylation de la β -caténine, à elle seule, est insuffisante pour dissocier la β -caténine des jonctions cellule-cellule au point d'atteindre une accumulation substantielle dans le noyau. Il existe donc un autre mécanisme pour dissocier la β -caténine des E-cadhérines et conduire à son accumulation nucléaire dans nos conditions. La E-cadhérine est finalement un senseur de l'activité mécanique du cytosquelette, et nos résultats impliquent l'existence d'une connexion fonctionnelle des jonctions adhérentes aux adhésions focales.

Ce travail a également soulevé de nouvelles questions, notamment sur le rôle de FAK qui s'active en partie de manière indépendante de Src suite à la perturbation, l'existence de premiers éléments de déclencheurs qui sont toujours inconnus (potentiellement au niveau des adhésions focales), l'existence de protéines intermédiaires entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales et nécessaires à la réorganisation du cytosquelette d'actine, ou encore la raison du départ de la β -caténine des jonctions (catch bond direct avec la E-cadhérine, rôle de l' α -caténine...). En définitive, ce travail a permis de décrire avec plus de précision les mécanismes moléculaires de la régulation de la voie de signalisation β -caténine qui contrôle l'expression de gènes, et l'état mécanique des E-cadhérines à la membrane, et plus généralement de caractériser un mécanisme dont les contraintes mécaniques de l'environnement cellulaire détermine l'expression génétique.

ANNEXE Nouveaux Projets

6. Annexe: Nouveaux projets

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux projets que nous avons commencés concernant trois nouvelles questions :

- \circ Est-ce que le départ de la β-caténine à la membrane est la conséquence d'un catch bond entre la Ecadhérine et la β-caténine ?
- Quels sont les mécanismes à l'origine de l'activation de FAK ?
- o Peut-on trouver d'autres perturbations mécaniques qui peuvent modifier la tension des E-cadhérines ?

6.1. Spectroscopie de force in vitro

Nous avons montré jusqu'ici qu'à la suite de la migration des cellules après l'ajout de HGF, ou de la blessure d'une monocouche, on observe une relaxation de tension des E-cadhérines qui corrèle avec une translocation nucléaire de la β -caténine de la membrane. Nous avons écarté le fait que la relaxation de tension puisse être un effet de l'activation des gènes dépendants de la β -caténine, et nous savons également que la relaxation de tension provient d'un réarrangement en amont du cytosquelette d'actomyosine qui conduit, sans que la présence de la β -caténine soit nécessaire, à une relaxation de tension dans la chimère E- α -TSMod. Les deux hypothèses nous semblant les plus probables pour expliquer ces résultats sont que soit (1) la force, plus faible dans le complexe E-cadhérine/ β -caténine, conduit à un temps de vie d'interaction entre les deux protéines plus court, à la manière d'un catch bond entre la E-cadhérine et la β -caténine, soit (2) le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine, dont le comportement de catch bond a déjà été démontré, conduit, non pas au détachement direct de la E-cadhérine avec la β -caténine, mais à celui de l' α -caténine, et à la suite de ce départ l'affinité entre la E-cadhérine et la β -caténine est alors plus faible permettant leur détachement.

Afin de tester l'hypothèse (1), il s'agirait de purifier la queue cytoplasmique de la E-cadhérine et la β -caténine, afin de les faire interagir, puis appliquer une force contrôlée sur le complexe et mesurer son temps de vie d'interaction en fonction de la force. Notre idée est de pouvoir fonctionnaliser des billes magnétiques de streptavidine avec la β -caténine biotinylée, et accrocher à la surface la queue de la cadhérine de manière contrôlée et covalente. Dès lors, grâce au système de pinces magnétiques mis en place par l'équipe de Vincent Croquette à l'ENS, nous pourrons appliquer à un ensemble de billes avec la β -caténine des forces contrôlées, et mesurer pour la population de billes β -caténine interagissant avec les E-cadhérines à la surface, leur temps de vie d'interaction en fonction de la force appliquée (Figure 115).



Figure 115 - a) Montage expérimental de spectroscopie de force avec des pinces magnétique appliquant une force contrôlée aux billes magnétique en fonction de la distance de l'aimant à la surface i) Exemple de la distribution des temps de vie en fonction de la force à la manière d'un catch bond dont l'interaction du complexe est plus grande sous une force donnée que sans force. ii) Orientation du complexe, avec à la surface de verre la queue cytoplasmique de la E-cadhérine (rose), la 6caténine (bleu) biotinylée accrochée à une bille magnétique fonctionnalisée avec la streptavidine (verte). b) Exemple de différentes billes magnétiques de diamètre 1 µm dans un champ de vue sur le système de pinces magnétiques à l'ENS.

Pour cela, notre stratégie a été de construire deux plasmides, un codant pour la partie cytoplasmique de la Ecadhérine, et l'autre pour la β-caténine, à exprimer dans les bactéries pour pouvoir purifier les protéines (Figure 116). Le plasmide pLIC-HMK-Ecad-tail codant pour la queue cytoplasmique de la E-cadhérine de 18 kDa, comprend aussi une séquence « tag » avec six histidines (His 6x) qui servira à la purification, une région MBP pour « maltose binding protein » qui permet d'augmenter la solubilité des protéines fusionnées avec le MBP en prévenant l'agrégation, un domaine de liaison asparagine, puis un domaine TEV qui permettra de cliver la protéine au niveau de cette séquence grâce à l'enzyme protéase TEV qui la reconnait, une cystéine (la queue de la cadhérine n'en possédant pas), une séquence AviTag, et la séquence des 145 acides aminés de la queue cytoplasmique de la E-cadhérine issue du plasmide EcadTSMod. Sur le même principe, le plasmide pLIC-HMKβ-caténine est construit avec une séquence tag histidine, puis le MBP, le linker, le site de clivage TEV, l'AviTag, et la séquence des 731 acides aminées de la β-caténine issue du plasmide β-caténine PAGFP N1.



Figure 116 – Construction des plasmides pLIS-HMK à exprimer dans les bactéries codant pour a) une protéine de 63kDa avec la queue cytoplasmique de la E-cadhérine de 18kDa fusionnée en amont aux séquences avec la tag His6x, puis le MBP, puis la séquence de clivage TEV, puis une cystéine, puis l'AviTag ; b) une protéine de 132kDa avec la β-caténine de 90kDa et en amont les séquences des tag His6x, MBP, la séquence de clivage TEV, puis l'AviTag.

Ces plasmides sont exprimés par des bactéries Rosetta (DE3) pLysS qui possèdent des codons rares permettant d'améliorer la traduction de nos protéines recombinantes dont l'expression sous le contrôle du promoteur lactose est induite grâce à l'addition d'IPTG. Après induction pour une densité optique (DO) de 0.3 avec 0.5M d'IPTG à 37°C pendant 3 heures, puis lyse des bactéries, sonication et centrifugation, les constructions His6x-MBP-TEV-AviTag-β-caténine et His6x-MBP-TEV-Cys-AviTag-E-cadhérine du lysat, sont purifiées à 4°C une première fois à l'aide de billes Ni-NTA complexant grâce au Ni²⁺ le tag avec les 6 histidines de nos protéines recombinantes. A la suite de cette première purification, on obtient les protéines recombinantes de 132kDa pour His6x-MBP-TEV-AviTag-β-caténine, et de 63kDa pour His6x-MBP-TEV-Cys-AviTag-E-cadhérine. On peut alors concentrer les solutions issues des fractions d'élution (Figure 117).



Figure 117 - a) Stratégie de purification des protéines. b) Gel révélé au Coomassie avec dans le premier puit le marqueur (M), ensuite le lysat de bactéries après induction 3h à 37°C avec 0.5M d'IPTG pour la construction avec la β -caténine, puis celle pour la E-cadhérine, puis après récupération des fractions d'élution à la suite de la première purification sur billes Ni-NTA, dialyse et concentration de MBP-TEV-AviTag- β -caténine et MBP-TEV -Cys -E-cadhérine.

Ensuite, les protéines sont incubées la nuit avec la protéase TEV pour cliver, et obtenir juste les protéines AviTag- β -caténine et Cys-AviTag-E-cadhérine (Figure 118.a). A l'issue de cette digestion, les sous-produits de 44kDa His6x-MBP-TEV et la protéase TEV (qui possède un marqueur His6x également) sont purifiées en repassant de nouveau sur les billes Ni-NTA, mais en gardant cette fois les protéines non liées aux billes. Cette étape fonctionne très bien sur la protéine de 90 kDa AviTag- β -caténine qui peut donc être purifiée (Figure 118.b). Mais une fois clivées les queues de 18 kDa des Cys-AviTag-E-cadhérines s'agrègent et précipitent (Figure 118.c). En effet, la queue cytoplasmique de la E-cadhérine est non structurée, et possède un fort index d'instabilité en solution. Nous avons donc décidé de travailler sur la protéine avec la séquence MBP en entier pour la queue de cadhérine. Cette construction His6x-MBP-TEV-Cys-AviTag-E-cadhérine ne possède qu'une seule cystéine et donc nous pouvons toujours l'utiliser pour la fonctionnalisation à la surface, en espérant que le tag MBP ne gênera pas stériquement l'interaction avec la β -caténine. La protéine AviTag- β -caténine, après avoir été concentrée, et changée de tampon, peut ensuite être biotinylée grâce à l'enzyme BirA qui va biotinyler la lysine (K) de la séquence LNDIFEAQKIEWH de l'AviTag.



Figure 118 – a) Principe de la digestion avec l'enzyme TEV. b) Gel révélé au Coomassie pour la 6-caténine avec dans le premier puit le marqueur (M), ensuite His-MBP-TEV-AviTag-6-caténine après la première purification de la Figure précédente, ensuite cette construction avec l'enzyme TEV : on retrouve la construction non digéré, la 6-caténine seule, et le fragment his-MBP, et l'enzyme TEV, le dernier puit représente ce qui est obtenu après passage sur les billes Ni-NTA avec la

8-caténine seule purifiée. c) Même principe pour la construction His-MBP-TEV-Cis-Ecad, avec le marqueur, la construction His-MBP-TEV-Cis-Ecad, la construction His-MBP-TEV-Cis-Ecad digérée avec la TEV et on ne voit pas de bandes pour la E-cadhérine seule à 18 kDa, le dernier puit représente ce qui est obtenu après passage sur les billes Ni-NTA.

Ensuite, la β-caténine biotinylée au niveau de l'AviTag peut se lier aux billes magnétiques Dynabead-Streptavidine de 1 μm. La stratégie pour accrocher les queues de E-cadhérine de manière contrôlée à la surface de verre, repose sur l'utilisation de la cystéine rajoutée à la construction qui va pouvoir réagir de manière covalente avec un NHS-Maléimide, qui lui va pouvoir avec sa partie NHS lier un brin d'ADN grâce à la fonction amine NH2 ajoutée à un nucléotide à l'extrémité, et avec sa partie maléimide réagir sur le groupement SH de la cystéine de notre protéine (Figure 119). L'attachement du brin d'ADN à la surface de verre a déjà été validé dans l'équipe de Vincent Croquette (Manosas et al., 2013). Brièvement, le brin d'ADN peut lui s'hybrider à un autre brin d'ADN, et est ancré à la surface grâce à l'autre extrémité de son brin avec un nucléotide modifié portant le groupement DIG et qui est reconnu par un anticorps antiDIG attaché de manière non spécifique à la surface de verre recouverte de Sigmacote, ensuite passivée avec de la BSA.



Figure 119 – Illustration de la fonctionnalisation et de l'orientation de la E-cadhérine. La surface de verre avec du SigmaCote est fonctionnalisée avec des anticorps anti-DIG adsorbées à la surface, puis un brin d'ADN permettant de nous affranchir des interactions avec la surface, ensuite un oligo A1 dont l'extrémité 3' est fonctionnalisée avec une base comportant une domaine avec 6 carbones terminés par la fonction amine NH2. Ce NH2 permet la liaison avec le NHS-Maléimide, la fonction maléimide permet, elle, de créer une liaison covalente avec l'unique cystéine de la construction MBP-Cys-Ecad.

Pour l'instant, nous avons toutes les protéines, mais nous n'avons pas encore testé le couplage protéine-oligo pour l'accrochage de manière covalente de la queue de la E-cadhérine. A l'ENS, nous avons pu réaliser un test avec les billes magnétiques fonctionnalisées avec la β-caténine, et la His6x-MBP-TEV-Cys-AviTag-E-cadhérine adsorbée à la surface du Sigmacote. La protéine His6x-MBP-TEV-Cys-AviTag-E-cadhérine a tendance à « coller » et retenir les billes magnétiques même non fonctionnalisées avec la β-caténine (Figure 120.a). Mais, plus de billes sont retenues lorsque celles-ci sont fonctionnalisées avec la β-caténine biotinylée. Ces premiers résultats qualitatifs sont encourageants. Par la suite, nous pourrons fonctionnaliser la surface avec les queues de cadhérines orientées, et plus éloignées de la surface grâce au brin d'ADN, et ensuite appliquer des forces contrôlées entre 0 et 20 pN pour mesurer le temps de vie d'interaction de la β-caténine avec la E-cadhérine.



Figure 120 – a) Billes Streptavidine de 1 μ m restant liées après lavages à la surface de verre avec les queues de E-cadhérines adsorbées sur le SigmaCote passivé avec de la BSA. b) Billes Streptavidine de 1 μ m fonctionnalisées avec la β -caténine biotinylée liée aux queues de E-cadhérines adsorbées sur le SigmaCote passivé avec de la BSA. Plus de billes sont attachées.

La découverte d'un catch bond directement entre la E-cadhérine et la β -caténine *in vitro* pourrait expliquer nos observations, dans les cellules, du départ de la β -caténine à la suite de la relaxation de tension des E-cadhérines. Par la suite, ce montage pourrait également servir à tester l'interaction de la E-cadhérine avec les mutants de phosphorylation des tyrosines de la β -caténine, et il serait également transposable au lien β -caténine et α -caténine. Implémenter les pinces magnétiques avec un système pour observer la fluorescence des protéines purifiées, permettrait de visualiser le recrutement de l' α -caténine par exemple en fonction de la force.

6.2. Rôle de FAK – 1^{er} mécanosenseur de la perturbation?

Lors de la migration des cellules MDCK induite par le facteur de croissance HGF ou par blessure sur un épithélium, la kinase FAK est activée. Nous avons vu que son activité est en partie due à sa phosphorylation par Src, mais une partie du mécanisme en amont est indépendant de Src et repose sur l'ouverture de FAK. Pour rappel, FAK est constitué de trois domaines : un domaine FERM, un domaine kinase, et un domaine FAT de liaison aux adhésions focales. Les mécanismes conduisant à l'ouverture et l'activation de FAK sont encore inconnus. Il a été proposé à la suite de simulations numériques que le domaine FERM de FAK doit être étiré pour libérer le domaine kinase, permettre son autophosphorylation en Y397 et activer l'activité kinase de FAK (Zhou et al., 2015).

Afin de tester dans les cellules si l'ouverture de FAK est mécanique, nous avons inséré le senseur de force TSMod dans un domaine non structuré de FAK, entre le domaine kinase et le domaine FAT (Figure 121.a). Deux constructions contrôles ont été créées : une dont le domaine de liaison à PIP2 à la membrane a été muté (FAKTSMod Mutant) et une dont les domaines FERM et kinase sont tronqués (FRNK TSMod). Ces deux constructions seront nos références sans tension.



Figure 121 – a) Schéma des constructions FAKTSMod, FAKTSMod mutant et FRNK TSMod. b) Image représentative des cellules MDCK exprimant la construction FAKTSMod. Echelle=10μm.

Nous pouvons donc utiliser ce senseur FAKTSMod dans les cellules MDCK (Figure 121.b). Nous avons vérifié que celui-ci était bien localisé au niveau des adhésions focales, qui présentent une morphologie comparable à celles avec FAK GFP. Helena Canever, alors stagiaire dans l'équipe, a par la suite testé si FAK était sous tension dans les cellules, avec ou sans HGF, en fonction de la densité cellulaire, ou en fonction des cellules à l'avant ou à l'arrière lors de la migration collectives des cellules blessées. Pour l'instant, toutes les constructions exhibent une valeur moyenne de l'index FRET autour de 60 comparable à celle de l'index FRET des EcadTSMod Δ C qui ne sont pas sous tension (Figure 122).



Figure 122 – a) Index FRET mesuré pour différentes adhésions focales dans une cellule pour les cellules MDCK exprimant la construction FAKTSMod, FAKTSMod mutant et FRNK. b) Index FRET mesuré pour différentes adhésions focales dans les cellules leaders à l'avant du front de migration, et les cellules à l'arrière. c) Index FRET mesuré pour différentes adhésions focales dans les focales dans les cellules sous 100ng/ μ L d'HGF.

Ces résultats sont préliminaires, mais ils pourraient permettre de montrer que FAK n'est pas sous tension, en moyenne, lors de la migration des cellules MDCK induite par le facteur de croissance HGF ou par blessure sur un épithélium. Pouvoir montrer que le senseur de force de FAK peut être effectivement sous tension dans d'autres conditions permettrait de confirmer le fait que FAK n'est pas en moyenne sous tension dans les nôtres. Nous pouvons envisager d'enrichir la membrane en PIP2 artificiellement. Pour cela, nous avons à disposition un inhibiteur YU142670 sélectif inactivant le sous-groupe de 5-phosphatases OCRL/INPP5b qui permettent d'enlever un groupement phosphate à PIP2 pour créer du PIP. Cet inhibiteur permet d'augmenter la quantité de PIP2 dans les fibroblastes (Pirruccello et al., 2014). On peut également surexprimer en transfectant une kinase PIP5K permettant de rajouter un phosphate à PIP pour créer du PIP2 telle que la PIP5K α , connue pour augmenter la quantité de PIP2 dans les cellules MDCK (Fets et al., 2014).

Pour l'instant, les mesures effectuées ont été réalisées sur toutes les surfaces des adhésions focales de la cellule, et toutes les 5 à 20 minutes. Le fait que nous n'ayons pour l'instant pas réussi à mettre en évidence une tension de FAK pourrait également refléter que le fait que la mise sous tension de FAK est un évènement très transitoire, et/ou ponctuel au sein d'une adhésion focale. En effet, lors de son ouverture FAK pourrait être sous tension, mais une fois ouvert il a été montré que la kinase Src peut se lier à FAK et le phosphoryler. Ces phosphorylations par Src permettent de bloquer FAK en position activée (Lietha et al., 2007). FAK fonctionnerait comme un « interrupteur à bascule » (« toggle switch ») sous l'effet de la tension grâce à Src, plutôt que comme un « pousse-bouton ».

Afin d'avoir une meilleure résolution concernant l'activité de FAK, et déterminer si son ouverture pourrait avoir lieu spécifiquement dans certaines adhésions focales en fonction de leur position dans la cellule, leur morphologie, ou leur maturité, il est envisageable de construire le senseur d'activité FRET de la kinase FAK avec un adressage spécifique aux adhésions focales. En effet, le senseur que nous avons utilisé jusque-là, est composé du domaine Lyn qui positionne le senseur dans les radeaux lipidiques, nous pourrions utiliser à la place le domaine FAT pour suivre l'activité de FAK spécifiquement dans les adhésions focales. Ce senseur FAT-FAK a été utilisé dans les cellules MDA-MB-231 isolées, et a permis de mettre en évidence un délais d'environ 42 secondes entre l'enrichissement du signal lors de la formation d'une adhésion focale et l'activation du senseur FAK (Wu et al., 2016). Néanmoins, il faut garder en tête que le senseur d'activité ne discrimine pas vraiment l'ouverture et l'activation de FAK, de l'activation totale de FAK par Src. De plus, cette activation ne donne aucune information sur la force.

D'autre part, afin de mieux comprendre comment sont réorganisées les adhésions focales lors de nos stimulations, nous pouvons également utiliser le senseur de force FRET inséré dans la vinculine (VinTSMod) ou même la taline (TInTS). Les premiers résultats préliminaires d'Helena montrent que la vinculine est bien sous tension dans les adhésions focales comparée à la construction VinTL qui ne peut pas se lier au cytosquelette (Figure 123.a et b). On peut noter d'ailleurs que la vinculine est aussi sous tension au niveau des jonctions adhérentes de cellules à confluence, mais que celle-ci est plus faible que la tension de la vinculine aux adhésions focales (Figure 123.a et b). Nous avons pu également mesurer pour des cellules après blessure, l'index FRET de la vinculine des adhésions focales des cellules leaders qui est plus élevé que celui des cellules à l'arrière du front de migration (Figure 123.c). Or pour les cellules exprimant la construction contrôle tronquée VinTL, l'index FRET des cellules leaders est sensiblement plus bas que pour les cellules à l'arrière (Figure 123.c). Ainsi, en moyenne la tension de la vinculine aux adhésions focales des cellules leaders semble plus faible que celle des celulles à l'arrière. La différence d'index FRET pour la construction contrôle VinTL peut témoigner d'une compression du senseur dans les cellules à l'arrière du front de migration. Ce phénomène de compression du senseur TSMod a déjà été observé pour VinTL sous le noyau au centre des cellules sur des surfaces de taille contrôlée (Rothenberg et al., 2015), et aussi pour le TSMod exprimé dans la protéine du glycocalyx MUC1 (Paszek et al., 2014). Ces résultats suggèrent donc que la vinculine est soumise à une tension (données VinTSMod), et d'autant plus de compression qu'elles sont confluentes (données VinTL). Par ailleurs, la tension est en moyenne plus faible dans les leaders que dans les autres.


Figure 123 – a) Exemple de cellules MDCK exprimant la construction VinTSMod : en haut au niveau des adhésions focales, en bas : pour des cellules confluentes au niveau des contacts. b) Index FRET mesuré dans les cellules MDCK VinTSMod (rond clair) et VinTL (triangle foncé) au niveau des adhésions focales pour des cellules à basse densité en ilot, et des cellules confluentes, et au niveau des jonctions adhérentes (bleu) pour des cellules à confluence. c) Index FRET mesuré dans les cellules MDCK VinTSMod (rond clair) et VinTL (triangle foncé) au niveau des adhésions focales pour des cellules leaders et des cellules à l'arrière du front de migration.

Désormais, il serait intéressant de poursuivre ces expériences préliminaires :

- trouver des conditions favorables à l'activation de FAK pour conclure avec certitude qu'en moyenne FAK n'est pas sous tension dans nos cellules. Il faudrait évaluer plus en détails la fonctionnalité du senseur.

- observer avec une meilleure dynamique les variations de l'index FRET de FAK au sein d'une adhésion focale qui pourraient être masquées dans nos mesures non dynamiques et moyennes. De même, pouvoir avoir accès à une distribution des index FRET dans un pixel pourrait être utile pour mettre en évidence une activation transitoire et partielle d'une partie des kinases FAK dans la population totale. Pour cela, il faudrait pouvoir mesurer le signal FRET à l'échelle de la molécule unique dans les cellules vivantes (smFRET).

- approfondir les mesures sur la vinculine : au niveau des contacts cellule-cellule d'une part pour mieux décrire la réorganisation du cytosquelette et la chute de tension observée sur la E-cadhérine. Ces mesures avec la VinTSMod pourraient être couplées à des immunomarquages de l' α -caténine ouverte par exemple. De plus, la diminution de tension dans la vinculine des adhésions focales dans les cellules leaders est un résultat soulevant de nouvelles questions. Est-ce que cette relaxation de tension moyenne au sein des adhésions focales est observable avec HGF ? Quel est le mécanisme sous-jacent ? Par exemple, sous HGF, nous avons observé que la surface des adhésions focales augmente plus rapidement que le recrutement de vinculine. On peut imaginer que lorsque les adhésions focales se forment pour les cellules sous HGF ou leaders, la diminution de tension des vinculines reflète le fait que la proportion de vinculine sous forme active dans les nouvelles adhésions focales est plus faible que dans les adhésions focales avant l'ajout de HGF ou pour les cellules à l'arrière du front de migration. Il faudrait approfondir cette potentielle redistribution de vinculine.

6.3. Applications à d'autres systèmes de EcadTSMod

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié le rôle de la tension des E-cadhérines lors de deux conditions qui récapitulent au moins partiellement une transition épithélio-mésenchymateuse : l'ajout du facteur de croissance HGF ou par blessure sur un épithélium. Découvrir de nouvelles perturbations qui pourraient changer la tension des E-cadhérines permettrait de mieux comprendre leurs fonctions mécanotransductrices. Dans ce paragraphe, nous présenterons différentes perturbations mécaniques qui ont été appliquées aux cellules exprimant le senseur de force FRET dans les E-cadhérines.

6.3.1. Ablation laser

Nous avons mis en évidence, lors de la migration induite par l'ajout du facteur de croissance HGF ou par blessure sur un épithélium, une relaxation de tension des E-cadhérines et une accumulation de β -caténine. Dans ce paragraphe, nous allons présenter les premières expériences d'ablation laser que nous avons effectué à la fois sur les cellules EcadTSMod pour voir si l'ablation peut modifier la tension des E-cadhérines, et sur les cellules β -caténine GFP.

Notre hypothèse de départ était qu'en ablatant les filaments d'actine proches des contacts cellule-cellule nous serions en mesure d'induire une relaxation de tension sur les E-cadhérines, et éventuellement un départ de la β -caténine. Nous avons donc, dans un premier temps, ablaté avec un laser deux photons les filaments d'actine dans la cellule proche des contacts pour observer à la fois la possible variation d'index FRET de la E-cadhérine et la localisation de la β -caténine (Figure 124.a).



Figure 124 - a) Schéma du principe de l'ablation des filaments d'actine à l'intérieur de la cellule. b) Images représentatives d'un ilot de cellules MDCK θ -caténine GFP transfectées pour visualiser l'actine avec LifeAct RFP, avant l'ablation, juste après l'ablation, et 10 min après. c) En haut : Images représentatives du canal YFP des cellules MDCK EcadTSMod avant et après l'ablation à l'intérieur de la cellule proche du contact. En bas : Index FRET au cours du temps avant et après l'ablation laser pour le contact de la cellule ablaté, et les contact 1 et 2 noté sur les images du dessus pour les cellules non directement touchées par l'ablation laser.

Ce type d'expérience s'est révélé finalement plus difficile à mettre en place qu'il n'y parait. En effet, l'ablation est ponctuelle, ou localisée sur une ligne de quelques μ m. Mais au bout de quelques minutes, les filaments d'actine sont capables de se reformer et la cellule se réorganise. Nous n'avons pas pu observer une diminution du signal de la β -caténine GFP au contact durant les premières minutes, ni de relocalisation nucléaire de la β -caténine après 1h (Figure 124.b). Mais on peut se demander si une ablation locale, à côté d'un contact dans la cellule, à un instant donné, est suffisante pour conduire à une relocalisation nucléaire de la β -caténine. Concernant, les expériences avec le senseur de force EcadTSMod, nous les avons réalisées sur un microscope

confocal Zeiss 710 avec un module d'ablation laser deux photons de la plateforme de l'hôpital Saint Louis. Nous n'avons pas pu faire beaucoup d'essais, mais dans les premiers tests nous n'avons pas observé de changement d'index FRET au cours du temps après l'ablation laser, bien que les contacts cellule-cellule bougent directement à la suite de l'ablation (Figure 124.c).

Dans un second temps, afin d'avoir des effets plus forts, nous avons réalisé un autre type d'expérience d'ablation laser. Cette fois-ci au lieu d'ablater à l'intérieur de la cellule, nous avons choisi d'ablater tout autour d'une cellule (Figure 125.a). On peut alors observer le comportement de la cellule du milieu dont tous les contacts avec ses cellules voisines ont été altérés, et également celui des cellules en périphérie dont seul un contact cellule-cellule est perturbé.



Figure 125 – a) Schéma du principe de l'ablation autour d'une cellule d'intérêt. b) Intensité de la 8-caténine GFP normalisée par l'intensité moyenne du contact avant l'ablation, au cours du temps pour des contacts cellule-cellule des cellules dont les voisines ont été ablatées, et pour des contacts loin de l'ablation. c) Images représentatives de la 8-caténine GFP avant l'ablation et après ablation. En pointillé : région ablatée. La flèche indique les contacts où le signal de 8-caténine diminue. d) Images représentatives de la 8-caténine GFP avant l'ablation et après ablation. En pointillé : négion ablatée. La flèche indique les contacts où le signal de 8-caténine diminue. nointique le contact au départ où l'intensité de la GFP diminue, puis après 30 min on a de nouveau un recrutement d'un nouveau contact.

Dans ce cas, nous avons pu observer un mouvement de rétractation de la cellule du centre sur les temps courts, et des contacts des cellules de l'autre côté de l'ablation, témoignant d'un équilibre de tension entre cellules dans l'ilot. Les expériences effectuées sur les cellules MDCK β -caténine GFP, ont mis en avant la rupture du contact cellule-cellule et une diminution de la β -caténine à la membrane comparée aux autres contacts loin de la zone d'ablation (Figure 125.b). Sur des temps courts de quelques minutes, ce phénomène a pu être observé plusieurs fois (Figure 125.c et d). Parfois, les cellules sont capables de reformer un contact avec la cellule voisine sur des temps plus longs, et on peut observer un nouveau recrutement de la β -caténine. Mais le problème est qu'on ne puisse pas découpler le fait que la β -caténine ne semble plus à la membrane, avec le fait que le contact cellule-cellule disparaisse. Il faudrait pour confirmer un départ de la β-caténine, vérifier que la membrane est toujours présente après l'ablation.

Nos premières expériences avec le senseur de force EcadTSMod aux temps courts devront être refaites en raison du photoblanchissement des fluorophores qui ne permet plus de faire des mesures de FRET. En effet ces expériences ont été réalisées sur le microscope deux photons de la plateforme ImagoSeine, qui permet de faire de l'ablation deux photons, mais nécessite de faire l'acquisition également avec une excitation deux photons, et de manière séquentielle pour le FRET sur uniquement deux canaux. Pour se remettre dans les mêmes conditions d'imagerie, nous avons utilisé le détecteur spectral du microscope confocal Zeiss 880 avec un module d'ablation laser deux photons de la plateforme BDD de l'Institut Curie. Les premiers essais ont montré que le comportement des contacts à la suite de l'ablation est complexe : certains se rétractent, d'autres sont enrichies en E-cadhérines, et en moyenne nous n'avons pas observé de variations de l'index FRET (Figure 126). Un comportement hétérogène lors de l'ablation ponctuelle de câbles d'actines a déjà été observé avec le senseur de tension de la vinculine (Chang and Kumar, 2013).



Figure 126 - a) Images représentatives du canal YFP des cellules EcadTSMod avant et après l'ablation. Les flèches indiquent un contact en train de se rétracter et un en train de se former. b) Index FRET mesuré pour différents contacts des cellules dont les voisines ont été ablatées au cours du temps dans les premières minutes. c) Index FRET mesuré pour différents contacts des cellules avant l'ablation et après 30 min après l'ablation des voisines.

En définitive, ces expériences d'ablation se sont révélées complexes, en partie en raison des états de départ non contrôlés entre les différentes cellules qui peuvent avoir de multiples morphologies. Il serait intéressant de poursuivre ce travail, par exemple, en utilisant des surfaces de géométrie contrôlée pour pouvoir comparer sur plusieurs cellules dans la même situation, le comportement des jonctions après l'ablation. De plus, les mouvements que l'on observe sont différents en fonction des échelles de temps. Par exemple, sur des temps courts on peut s'attendre à voir une relaxation des contacts en raison de la perturbation introduite, mais au bout de quelques minutes, les cellules sont capables de se réorganiser, reformer des contacts, et des protrusions de façon active, et les mesures ne témoignent plus de l'état de tension juste avant l'ablation.

6.3.2. Cellules suspendues

Lors de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de découvrir d'autres systèmes pour perturber mécaniquement les cellules avec d'autres équipes de l'Institut Jacques Monod. L'équipe « Adhésion cellulaire et mécanique » de Benoit Ladoux et René-Marc Mège, a mis en place des substrats adhésifs de géométrie contrôlée qui permettent d'étudier la migration collective des cellules épithéliales telles que les MDCK ou les kératinocytes HaCaT. Notamment, il a été mis en évidence que les cellules HaCaT, contrairement aux cellules MDCK, peuvent former des ponts suspendus multicellulaires entre deux lignes adhésives fonctionnalisées avec de la fibronectine lorsque ces lignes ne sont pas plus éloignées que de 120 µm (Vedula et al., 2014). Ce système de migration est constitué d'un réservoir où les cellules sont cultivées à confluence, puis un morceau de PDMS

est enlevé, révélant ainsi les lignes adhésives de 10 μ m de large qui peuvent être envahies par les cellules (Figure 127.a). Lors de la migration des cellules, on peut observer des ponts suspendus de plusieurs cellules (Figure 127.b), qui dépendent de l'intégrité du cytosquelette d'actomyosine, de la capacité des cellules à former des interactions entre E-cadhérines, et de la présence de l' α -caténine. Ces cellules suspendues n'adhèrent pas au substrat et ne forment pas d'adhésions focales. L'utilisation de calyculineA (inhibiteur des phosphatases de serines et thréonines), qui conduit notamment à une augmentation de la pMLC, et de la contractilité du cytosquelette, conduit à la rupture de ces ponts. Ces ponts suspendus semblent être sous tension d'après la structure du cytosquelette d'actine formée de longues fibres de stress à travers les cellules suspendues. L'ablation laser des cellules sur une des lignes de fibronectine conduit à un effondrement de la structure suspendue.



Figure 127 - a) Schéma du système de migration avec un réservoir, et plusieurs lignes de fibronectine permettant, une fois le morceau de PDMS bleu enlevé, la migration collective des cellules avec une adhérence au substrat via les adhésions focales. b) Image représentative en phase des cellules HaCaT en migration du réservoir sur les lignes et formant des ponts suspendus multicellulaires. Echelle= 20μ m. c) Image représentative en phase des cellules HaCaT avant ablation (à gauche) et après ablation d'une cellule leader sur la ligne de fibronectine et effondrement du pont dès l'ablation (100ms). (Issu de Vedula et al. 2014).

Simon Begnaud de l'équipe Ladoux-Mège, a repris ce système pour y étudier le rôle des cofacteurs de transcription YAP et β -caténine, ainsi que le rôle du cytosquelette dans l'organisation de ces cellules suspendues. J'ai ainsi collaboré sur une partie de son projet pour étudier les jonctions adhérentes dans ce système de ponts suspendus et notamment pour mesurer les tensions moléculaires dans les E-cadhérines. Grâce à la lignée HaCaT EcadTSMod, nous avons pu mesurer les tensions dans les E-cadhérines dans ces cellules en fonction de leur position lors de la migration. En effet, nous avons discriminé plusieurs cas : celui des cellules dans le réservoir confinées et confluentes, celui des cellules en migration sur les bandes adhésives, celui des cellules suspendues aux contacts cellule-cellule, et les cellules leaders au font des lignes de fibronectine (Figure 128.a et b). Nous avons observé que les contacts E-cadhérines dans la région suspendue sont très striés (Figure 128.c) et souvent un câble d'actine relie ces jonctions de part et d'autre des cellules, alors que les contacts des cellules en migration sur les ubstrat adhésif possèdent des jonctions adhérentes linéaires (Figure 128.c).



Figure 128 – a) A droite : Image représentative de la surface adhésive et fonctionnalisée avec la fibronectine. A droite : Image représentative des cellules HaCaT EcadTSMod en mode spectral. b) Schéma des différentes régions d'intérêt : cellule leaders, cellules en migration sur le substrat adhésif, cellules suspendues, cellules dans le réservoir. Pour chaque cellule de ces différentes zones, différents contacts cellule-cellule sont choisis et délimités manuellement sur l'image d'intensité du canal d'émission 530nm. c) Exemple de cellules HaCat EcadTSMod dans le réservoir, sur les lignes de fibronectine formant des contacts linéaires, suspendues formant des contacts striés, et une cellule leader.

Nous avons alors mesuré l'index FRET au niveau des contacts cellule-cellule dans les différentes régions et dans le lamellipode des cellules leaders (Figure 129.a). Comme pour nos mesures sur les cellules MDCK, les cellules HaCaT possèdent un index FRET plus élevé dans les cellules leaders que pour les cellules à confluence dans le réservoir. De plus, cet index est aussi plus élevé que celui des cellules migrant le long de la ligne adhésive, ou celui des cellules suspendues. On peut remarquer que les index des cellules adhérentes sur les lignes, mais aussi celui des cellules suspendues sont plus élevés que celui des cellules dans le réservoir. De plus, l'index FRET des cellules suspendues est très légèrement inférieur à celui des cellules migrant sur la ligne adhésive à côté.

Nous avons donc une relaxation de tension dans les cellules leaders tout au front de migration. Afin de déterminer si l'on retrouve, ici aussi, un gradient de tension dans les E-cadhérines, comme celui que nous avons observé pour les cellules MDCK lors de leur migration collective après blessure (Figure 66), nous pouvons mesurer l'index FRET en fonction de la distance à la cellule leader (d=0µm) le long des bandes adhésives (Figure 129.c). On retrouve le même type de gradient d'index que sur la Figure 66, qui correspond, aussi ici, à un gradient de tension de 2-3 pN le long de la ligne de migration adhésive.



Figure 129 – a) Index FRET des contacts E-cadhérines des cellules HaCaT présentes dans le réservoir, des cellules leaders, des cellules en migration sur les lignes de fibronectines, des cellules suspendues. b) A gauche : Image des cellules suspendues et des zones d'intérêt telles que les contacts au front là où il y a une forte courbure de la monocouche suspendue, et à l'arrière des cellules suspendues, ou encore alignés parallèlement ou perpendiculairement à la direction de migration. Au milieu : Index FRET pour les contacts des cellules suspendues à l'avant ou à l'arrière de la monocouche suspendue. A droite : Index FRET pour les contacts des cellules suspendues alignés parallèlement ou perpendiculairement à la direction de migration de la monocouche suspendue. O Profil d'index FRET le long de la ligne de fibronectine adhésive. La distance zéro correspond au lamellipode de la cellule leader.

La différence d'index FRET des E-cadhérines observée entre les cellules en migration sur la ligne et les cellules suspendues est faible (0.5 en index FRET), mais on peut dire que les cellules suspendues, pour une même distance aux cellules leaders au front adhésif, présentent dans les E-cadhérines une tension plus élevée par rapport aux E-cadhérines des cellules migrant sur le substrat. La calibration de l'index FRET avec la force, nous permet d'évaluer cette différence à peine 0.2 pN. Le signal mesuré dans les cellules suspendues en fonction de la position du contact à l'avant ou à l'arrière de la monocouche suspendue, ou en fonction de sa direction parallèle ou perpendiculaire au front de migration. Aucune différence d'index FRET et donc de tension des E-cadhérines n'a pu être observée (Figure 129.b).

En définitive, nous avons observé, dans un autre type cellulaire, une relaxation de tension dans les cellules leaders par rapport aux cellules en arrière du front de migration. Nous avons également pu observer, comme avec les cellules MDCK, que la valeur de la tension des E-cadhérines peut être différente en fonction de la densité de cellules dans le réservoir (données non montrées). On peut se demander si cette variation de tension des E-cadhérines et le gradient que l'on observe sont dus à la migration des cellules, ou à la densité, ou encore à la maturité des contacts cellulaires. Il est assez difficile de découpler migration et densité, puisqu'en migrant les cellules ont une densité plus faible que les cellules du réservoir.

De plus, nous avons pu mettre en évidence que la tension des E-cadhérines dans les contacts striés des cellules suspendues n'est en fait pas plus élevée que celle des cellules du réservoir ou des cellules au début de la migration sur les lignes. Même si la déformation des contacts conduit à des contacts striés qui semblent étirées avec des câbles d'actine de part et d'autre du contact, il s'avère que la tension des E-cadhérines de ce type de contact n'est pas plus élevée que celle de contact linéaire. Simon a par la suite, essayé de comprendre comment s'organise l'actine, quels sont les partenaires des jonctions qui sont recrutés pour des contacts linéaires, des contacts striées des cellules suspendues. Il a pu observer un gradient de YAP qui se trouve dans le noyau des cellules en migration en haut des lignes, mais jamais dans celui des cellules suspendues. Il a donc essayé de comprendre quel est le lien entre YAP, les adhésions focales, les jonctions adhérentes et la tension supportée par les cellules.

6.3.3. Cisaillement des cellules

J'ai également eu l'occasion de travailler sur un autre projet permettant de « cisailler » des cellules épithéliales. Shreyansh Jain, doctorant dans l'équipe Adhésion cellulaire et mécanique de Benoit Ladoux et Renée Marc Mège, s'intéresse à la migration des cellules épithéliales confinées sur des anneaux circulaires fonctionnalisées de fibronectine de diamètre 90 µm et de largeur 33 µm. Sur ces substrats, les cellules MDCK forment alors un anneau de cellules. Elles vont spontanément se mettre à migrer dans la même direction. On observe alors un mouvement coordonnée et une rotation des cellules toutes dans la même direction, soit vers la droite soit vers la gauche. Ce mouvement dépend de la formation des jonctions adhérentes, et n'est pas observé dans un milieu à faible concentration en calcium, ou pour des cellules n'exprimant pas d' α -caténine (données non montrées de Shreyansh). Chacune des cellules, dans l'anneau, est polarisée et possède des protrusions à l'avant, enrichies en Rac.

De plus, lorsque deux anneaux de fibronectine sont suffisamment proches, les cellules peuvent former des contacts d'un anneau à l'autre (Figure 130.a). Dans ce type de double anneau, on peut se retrouver dans deux situations : soit le sens de rotation des deux anneaux est opposé (Figure 130.b), soit les deux anneaux tournent dans le même sens (Figure 130.c). On observe alors différent cas notamment :

 pour des sens de rotation opposés, certaines cellules se rencontrent au milieu de la zone de contact du double anneau, migrent côte à côte et puis une cellule se retrouve dans la situation de devoir « choisir » un côté, et adopte une forme triangulaire, et étirée.

- pour des anneaux dont le sens de rotation est le même, on peut observer des cellules au milieu de la zone de contact qui changent d'anneau et sont très fines et allongées. On observe comme un cisaillement dans cette zone.



Figure 130 – a) En haut : Exemple de surface fonctionnalisée avec de la fibronectine (en rouge) comportant deux anneaux proches. En bas : Cellules MDCK EcadTSMod qui se rejoignent dans la zone du milieu où les deux anneaux sont proches. b) Exemple de deux anneaux ayant des sens de rotation opposé, l'étoile rouge désigne une cellule « étirée » triangulaire. c) Exemple de deux anneaux ayant le même sens de rotation, l'étoile orange montre une cellule étirée dans la zone du milieu. Echelle=40µm.

En observant ces deux types de cellules dans les zones de rencontre des deux anneaux, nous avons voulu connaitre la tension des E-cadhérines dans ce contexte. En effet, nous étions curieux de savoir si pour les cellules présentant une déformation étirée, comme « cisaillée », nous pouvions observer une tension différente des cellules « étirées » triangulaires. Nous avons, alors, mesuré la tension des E-cadhérines avec la lignée MDCK EcadTSMod sur les substrats fonctionnalisés avec de la fibronectine. Ce sont des résultats

préliminaires, mais nous avons pu observer en moyenne que les index FRET des E-cadhérines des cellules étirées en diagonale dans les anneaux tournant avec le même sens de rotation, sont plus bas que ceux des cellules sur les bords de ces doubles anneaux (Figure 131). Ces premiers résultats suggèrent que les E-cadhérines des cellules dans cette zone de cisaillement sont plus sous tension, environ 1 pN d'après les calibrations, que les E-cadhérines des cellules sur les bords.



Figure 131 – Index FRET des cellules MDCK EcadTSMod mesuré pour des contacts E-cadhérines des cellules sur les bords du double anneau, dans la zone du milieu pour des cellules ayant un profil triangulaire, et pour des cellules étirées.

Il serait maintenant intéressant de pouvoir reproduire ces observations, notamment sur plus de cellules pour des anneaux de rotation opposée, et également de suivre dans le temps la variation de tension des Ecadhérines d'une cellule au départ sur le bord et passant dans la zone de cisaillement par exemple. Ces mesures sur la tension moléculaire pourraient être faites également avec le senseur de forces dans la vinculine dans les adhésions focales, et pourraient être mises en relation avec la mesure des vitesses de migration des cellules mesurée par PIV, ou des forces de traction mesurées par TFM pour corréler les endroits de cisaillement, de tension. Annexe : Sollicitations mécaniques conduisant à l'activation de la voie β -caténine

Table 6 – Résumé de différentes sollicitations mécaniques conduisant à l'activation de la voie 8-caténine.

0	Différenciation cellule osseuse Morphogénèse :			-				
organisme / Type Cellulaire	Embryon <i>Drosophile</i>	:mbryon <i>Drosophile</i>	imbryons <i>Drosophile</i> + Poisson Zèbre	Embryon de Souris - régions des articulations	Embryon souris – ostéoblaste du alvarium en culture	Cellules pré- steoblastiques CIMC- 4	Cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2	Cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2
Sollicitation Mécanique	Déformation uniaxiale par compression	Ablation + Compression via une aiguille ou des ferrofluides magnétiques injectés dans les tissus adjacents	Blebbistatine (Poisson Zèbre) ou Snail-/- (<i>Drosophile</i>) + Compression via des liposomes ultra-magnétiques	+/- Contraction musculaire (WT/mutants Spd, Six,Myf5-MyoD)	Etirement du substrat avec Flexercell Tension Plus System	Etirement biaxial du substrat avec Flexcell à 2% 10 cycles/min	Etirement biaxial du substrat avec Flexcell à 2%	Etirement biaxial du substrat avec Z- strain à 2%
Article	(Farge, 2003)	(Desprat et al., 2008)	(Brunet et al., 2013)	(Kahn et al., 2009)	(Hens et al., 2005)	(Case et al., 2008)	(Sen et al., 2008)	(Sen et al., 2009)
Transcription des gènes dépendant de la β-caténine	✓ Rapporteur Twist lacZ	 Expression de Twist 	✓ Expression de Twist (<i>Drosophile</i>) ou de Notail (Poisson Zèbre)	✓ ✓	✓ rapporteur TOPGAL (souris) + RT-PCR cyclinD1 (cellules en culture)	✓ TOPFlash RT-PCR de WISP1, Cox2	 KT-PCR cyclinD1 	✓RT-PCR
β-caténine nucléaire	> ≞	> =	у п		لا الج (cellules en culture)	¥ ⊨ ≺	 Υ IF WB : augmentation de la β- caténine totale, et non phosphorylée en N-term 	
Phosphorylation de la β-caténine	-	r	く IF pArm667 + mutant Arm667F (pour la <i>Drosophile</i>)	-	,			-
Rôle de Src		 Constitutivement actif Src42A-RNAi pSrc42A 	 V Nécessaire Src42A-RNAi (Drosophile) PP2 (Poisson Zèbre) 			- de GSK3β Activation de GSK3β Activation Akt (WB) P13K non requis (inh)	- Inactivation de GSK3β Activation Akt (WB)	- Inactivation de GSK3β

228

	- Inactivation de GSK3β Activation Akt Activation RhoA (WB)	- Activation Akt (WB pAkt)	,	- Activation Akt (WB pAkt)	- Akt,FAK nécessaire (inh)	-	-	- PI3K nécessaire (DN mutant)
			ı	diminution β-caténine IP avec Ncad, pas de dégradation augmentée	·	- Pas de diminution de la phosphorylation en Ser33 de la β-caténine, mais diminution interaction N-cadhérine		
WB : augmentation de la β- caténine totale, et non phosphorylée en N-term	- WB : augmentation de la β- caténine totale, et non phosphorylée en N-term		r	> =	- WB : augmentation de la β- caténine totale	8M II <i>></i>	WB : augmentation de β- caténine totale, nucléaire et en interaction avec LEF	Pas de diminution globale de la β-caténine, mais diminution de la forme dephosphorylée,
		 rapporteur TOPGAL 	KT-PCR	لم TOPFlash	V RT-PCR cyclinD1	✓ TOPflash RT-PCR	V WB cMyc, CyclinD1	Diminution TOPFLASH
	(Sen et al., 2011b)	(Lara-Castillo et al., 2015)	(Robinson et al., 2006)	(Norvell et al., 2004)	(Santos et al., 2010)	(Arnsdorf et al., 2009)	(Armstrong and Esser, 2005)	(Avvisato et al., 2007)
	Etirement biaxial du substrat avec Flexcell à 2%	Compression uniaxiale de l'avant bras a 2.25N à 2Hz + Flux de cisaillement oscillant (2 dyn/cm²)	Etirement de tibia de 7N (2 Hz) + Etirement du substrat des cellules avec Flexercell	Flux de cisaillement laminaire (10 dyn/cm²)	Flux de cisaillement oscillant 0.7 ± 0.3 Pa at 5 Hz	(10 dyn/cm²) Flux de cisaillement oscillant	Incision préliminaire des muscles plantaires et étirement des muscles pendant 7jours	Flux de cisaillement laminaire (15 dyn/cm²)
	Cellules souches mésenchymateuses de moelle	Souris + Ostéocytes MLO-Y4	<i>In vivo</i> tibia de souris + Ostéoblastes MC3T3- E1	Ostéoblastes MC3T3- E1	Ostéocytes MLO-Y4	Cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2	Souris	Cellules cancéreuses colorectales APC déficientes n'exprimant pas de E- cadhérines SW480
							Si	Pathologie

229

 Activation pY418 Src Bloquée par Pp1/Pp2/SU6656 	- kinase Ret activé (pAb)	- FAK nécessaire (inh)		I	I	V Nécessité (SU6656/PP2)
لر IF pY654	✓ IF pY654			T	ı	لا IF pY654
> =	<u>> ۳</u>	<u>></u> ۳	 IF IF Au noyau sous blebb Pas au noyau lors de Pas au noyau lors de I'application de forces à travers les E-cadhérines 	<u>у</u> п	GFP	GFP
لا Expression Myc, Twist	く Expression Myc Axine par RT-PCR	イ rapporteur TOPGAL + CyclinD1		<pre> cyclinD1 mRNA </pre>	TOPdGFP	 TOPdGFP
(Whitehead et al., 2008)	(Fernández- Sánchez et al., 2015)	(Samuel et al., 2011)	(Hirata et al., 2017)	(Schernthaner et al., 2012)	(Benham-Pyle et al., 2015)	(Benham-Pyle et al., 2016)
Compression macroscopique	Compression via des liposomes ultra- magnétiques	Augmentation de la rigidité par l'activation de ROCK	Blebbistatine + billes magnétiques	Substrat PET nanostructuré	Etirement et déformation de la monocouche de 15%	Etirement et déformation de la monocouche de 15%
Explants issus du colon de souris APC déficientes	Explants issus du colon de souris APC déficientes	Keratinocytes primaires	HaCaT (kératinocyte)	HMEC (endothéliale)	MDCK	MDCK
		snoite	nre sous perturb	tius na	ə səlnl	ləJ

Annexe : FRET-based Molecular Tension Microscopy

Abstract :

Cells generate and experience mechanical forces that may shape tissues and regulate signaling pathways in a variety of physiological or pathological situations. How forces propagate and transduce signals at the molecular level is poorly understood. The advent of FRET-based Molecular Tension Microscopy now allows to achieve mechanical force measurements at a molecular scale with molecular specificity in situ, and thereby better understand the mechanical architecture of cells and tissues, and mechanotransduction pathways. In this review, we will first expose the basic principles of FRET-based MTM and its various incarnations. We will describe different ways of measuring FRET, their advantages and drawbacks. Then, throughout the range of proteins of interest, cells and organisms to which it has been applied, we will review the tests developed to validate the approach, how molecular tension was related to cell functions, and conclude with possible developments and offshoots.

Highlights

- We review a novel methodology: Molecular Tension Microscopy (MTM).
- MTM is a unique tool to study mechanotransduction and morphogenesis.
- MTM relies on genetically encoded FRET-based biosensors of molecular tension.
- MTM is being applied to a growing variety of proteins, cells and organisms.

Methods 94 (2016) 33-42

Contents lists available at ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

FRET-based Molecular Tension Microscopy

Charlène Gayrard, Nicolas Borghi*

Institut Jacques Monod, Unité Mixe de Recherche 7592, Centre national de la recherche scientifique, Université Paris-Diderot, Paris 75013, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 26 May 2015 Received in revised form 10 July 2015 Accepted 19 July 2015 Available online 22 July 2015

Keywords: Mechanotransduction FRET microscopy Signaling Morphogenesis

ABSTRACT

Cells generate and experience mechanical forces that may shape tissues and regulate signaling pathways in a variety of physiological or pathological situations. How forces propagate and transduce signals at the molecular level is poorly understood. The advent of FRET-based Molecular Tension Microscopy now allows to achieve mechanical force measurements at a molecular scale with molecular specificity *in situ*, and thereby better understand the mechanical architecture of cells and tissues, and mechan-otransduction pathways. In this review, we will first expose the basic principles of FRET-based MTM and its various incarnations. We will describe different ways of measuring FRET, their advantages and drawbacks. Then, throughout the range of proteins of interest, cells and organisms to which it has been applied, we will review the tests developed to validate the approach, how molecular tension was related to cell functions, and conclude with possible developments and offshoots.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND licenses (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

In multicellular organisms, morphogenesis and homeostasis is thought to emerge from the combined influence of the genetic program and environmental cues on cell behaviors. As organs grow and fulfill their functions, cells generate and experience mechanical forces that propagate between and within cells throughout the organism. These forces may shape cells, tissues and organs by purely mechanical processes, that is, as a function of their mechanical properties (elasticity, viscosity, plasticity). As a matter of fact, characterization of the mechanical properties of cells has been a longtime interest [1,2]. A compelling demonstration of such morphogenic role of mechanical forces can be found in the pioneering work of Beloussov and colleagues, who monitored the recoil of tissue explants from amphibian embryos to draw a spatiotemporal map of mechanical stresses in developing tissues [3]. Today's laser ablation is a modern and increasingly popular version of this approach, but a number of other methods have been developed to apply and measure mechanical forces in biological samples [4]. Indeed, from the actin-walking myosin to the whole contracting muscle, forces and deformations occur at all scales, and a comprehensive understanding of the mechanical architecture of biological materials demands as many tools.

As postulated by Beloussov and colleagues, mechanical forces may also convert into biochemical signals [3]. This process, called

http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.010

1046-2023/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).





CrossMark



Thus, achieving mechanical force measurements at a molecular scale with molecular specificity *in situ* offers the possibilities to (1) better understand the mechanical architecture that underlies the shapes of cells, tissues or organs when combined with other force methods at different scales; (2) identify primary mechanotransducers, and more generally relate molecular tensions to molecular, cellular or tissue functions. Among all force measurement tools, FRET-based Molecular Tension Microscopy (MTM) stands out by its unique ability to do so. MTM involves a mechanical tension-sensitive FRET biosensor genetically encoded within a protein of interest. FRET microscopies on cells or organisms expressing the modified protein of interest allow to draw spatiotemporal

^{*} Corresponding author. E-mail address: nicolas.borghi@ijm.fr (N. Borghi).

maps of its molecular tensions. Since its first introduction in 2008 [9], this tool has been used in a growing variety of proteins, cells and organisms. Most of its applications and extensions are, however, likely to come.

2. Principle of FRET-based Molecular Tension Microscopy

2.1. A genetically encoded newtonmeter

Mechanical forces are measured with newtonmeters. A newtonmeter is essentially a spring of known stiffness, that is, for which the force it undergoes can be quantified from the measure of its deformation. MTM sensors are genetically encoded molecular springs that deformations are measured from the FRET between two fluorescent proteins, as FRET is very sensitive to tiny changes of distance or angle between the fluorophores (see below). By virtue of Newton's laws, newtonmeters report forces exerted on bodies attached them. The sequence of a MTM sensor can be inserted in that of a protein, at a site where tension is expected (see below).

The first MTM sensor to be published, stFRET, is based on an alpha helix assumed to lengthen under increased uniaxial tension [9] (Fig. 1a). The number of amino acids in the helix was optimized so that its resting length allowed maximum FRET. A second sensor, TSMod, contains a 40 amino acid sequence derived from the spider silk protein flagelliform, consisting in 5 amino acids repeats presumably acting as an entropic spring [10] (Fig. 1a). A third MTM sensor, sstFRET, is based on the three folded alpha-helices of a spectrin repeat, and was designed in an attempt to match the sensor and the host protein stiffness for minimal mechanical perturbation [11] (Fig. 1a). All three sensor springs are assumed to lengthen in response to uniaxial tension, which FRET between a pair of flanking fluorescent proteins reports (Fig. 1b). In contrast, a fourth sensor, cpstFRET, was designed to exploit the sensitivity of FRET to the relative orientation of the fluorophores. CpstFRET links with five amino acids two circularly permutated fluorescent proteins that are parallel at rest and expected to twist toward a perpendicular configuration under tension (Fig. 1b). As a consequence, cpstFRET is smaller than all other MTM sensors [12].

The force sensitivity of stFRET, sstFRET and cpstFRET was assessed *in vitro* by looping the purified sensors, fluorophores

SSDNA

dsDNA

forces

0-20pN

betweer

00000

C

5 -7 pN

included, with a single strand of DNA (ssDNA), subsequently mixed with its complementary strand [11,13,12] (Fig. 1c). The 60mer ssDNA has a persistence length between 1 and 4 nm and is 20 nm long, nearly twice the length of the sensor. Addition of a complementary strand of DNA creates double-stranded DNA (dsDNA) that persistence length reaches 50 nm, which generates a pushing force of 5–7 pN according to previous literature [14,15]. Measuring FRET before and after complementary strand addition evidenced a decreased in FRET, presumably due to the pushing force of the dsDNA. Whether this exceeds the force resolution range of the sensor is, however, unknown. FRET was also lower in the ssDNA-looped sensor compared to the sensor alone, showing that ssDNA looping was sufficient to stretch or twist the sensor a little. DNA digestion of the looped sensor showed the FRET change was reversible.

The TSMod sensor, in contrast, was characterized by single-molecule force spectroscopy *in vitro* on the 40 amino acid spring flanked with two organic fluorophores, which provide better photostability than fluorescent proteins, and DNA handles to stretch the sensor between a surface and an optical tweezer [10] (Fig. 1c). Cyclic stretching with simultaneous FRET measurement evidenced reversible extension and relaxation of the spring, with no hysteresis. The calibrated tweezer and fluorescence measurements appropriately corrected for FRET efficiency calculation enabled to provide a Force to FRET efficiency calculation curve (Fig. 1g), showing that the spring was most sensitive up to about 7 pN. As a consequence, the TSMod sensor stands out by its ability to provide quantitative forces from FRET efficiency measurements in cells, thanks to this calibration and provided an offset to correct for a shift in force-free FRET efficiency between *in vitro* and *in situ* conditions.

Typical forces generated by single molecular motors fall in the few pN range [16], therefore, current MTM sensors are likely to be sensitive to the action of a few motors on the proteins of interest. In addition, fluorescent proteins are unlikely to exhibit significant changes in their photophysical properties in this range [17], which should ensure that fluorescence measurements can effectively report FRET.

2.2. Förster resonance energy transfer and its measurement (Table 1)



FRET Efficiency (E)

 $1 + r^{6}/R^{6}$

Distance (r)

MTM sensors report their deformation from the amount of FRET between fluorophores. FRET is a process in which non-radiative

FRET Efficiency (E)

Force (F)

g

Force (F)

Stiffnes

Distance (r)



dipole-dipole energy transfer occurs between two fluorophores. When the donor fluorophore is in its electronic excited state, it may transfer its excitation energy to another nearby fluorophore: the acceptor. The rate of energy transfer $k_{\rm t}$ depends on the environment refractive index n and on intrinsic properties of the fluorophores: the overlap J between the emission and excitation spectra of the donor and acceptor fluorophores, respectively, and the donor fluorescence rate $k_{\rm f}$. All MTM sensors have used CFP/YFP-like donor/acceptor pairs. The advantages and drawbacks of the different CFPs or YFPs used for FRET are not specific to their use in MTM sensors and will not be discussed here. The rate of FRET also depends on the variable distance r and angle (orientation factor κ) between the fluorophores, which the sensors exploit. In brief, $k_t \sim n^{-4} J k_f \cdot \frac{\kappa^2}{r^6}$. The FRET efficiency *E* is the rate of FRET normalized to the sum of the rates of FRET, donor fluorescence and other non-radiative donor de-excitation pathways k_{n-r} : $E = \frac{k_{\rm t}}{k_{\rm f} + k_{\rm n-r} + k_{\rm t}}$

When an excited donor fluorophore is in presence of an acceptor, the donor is quenched and decays through FRET in addition to fluorescence and non-radiative de-excitation, which shortens its fluorescence lifetime and reduces its fluorescence quantum yield compared to that of the donor alone that only decays through fluorescence and other non-radiative pathways. Concomitantly, the FRET-excited, or sensitized acceptor decays through fluorescence. In addition, when donor excitation is polarized, sensitized acceptor emission is more depolarized than that of the directly excited donor or acceptor because of increased time interval between excitation and emission. FRET may therefore be measured from differences in fluorescence lifetimes, steady-state intensities or anisotropy. Below are the main measurement strategies that have been applied to MTM sensors, but others exist too [18].

Summary of	physical	quantities.
------------	----------	-------------

$k_{ m t} \sim n^{-4} J k_{ m f} \cdot rac{\kappa^2}{r^6}$	Rate of energy transfer
n	Environment refractive index
J	Spectral overlap between donor emission and
	acceptor excitation
kf	Donor fluorescence rate
r	Fluorophore interdistance
ĸ	Orientation factor
$E = \frac{k_t}{k_f + k_{n-r} + k_t}$	FRET efficiency definition
k _{n-r}	Non-radiative donor de-excitation rate
$\tau_{\rm DA} = (k_{\rm f} + k_{\rm n-r} + k_{\rm f})^{-1}$	Donor fluorescence lifetime in the presence of
	acceptor
$\tau_{\rm D} = (k_{\rm f} + k_{\rm n-r})^{-1}$	Donor fluorescence lifetime alone
$E = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}}$	FRET efficiency by quenched donor fluorescence
-0	lifetime
I _{DA}	Donor emission intensity in the presence of
	acceptor
I _D	Donor emission intensity alone
$E = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}}$	FRET efficiency by quenched donor fluorescence
	emission intensity
I _{AA}	Directly excited acceptor emission intensity
I _{AD}	Bleedthrough corrected acceptor sensitized
E las	EPET officional by consisting accorder omission
$E = \frac{I_{AD}}{I_{AD} + \gamma I_{DA}}$	intensity
IAD	Gamma factor
$\gamma = \frac{1}{I_D - I_{DA}}$	A EDET is down her consistent a constant of the second second
$\frac{I_{AD}}{I_{AD}+I_{DA}}$	A FRET Index by sensitized acceptor emission
- I	A fluorosconce anisotropy index inversely
$R = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$	correlated with EPET
L	Fluorescence emission intensity parallel to
•	excitation polarity
I	Fluorescence emission intensity orthogonal to
-	excitation polarity
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

2.2.1. Donor quenching

Donor quenching by FRET can be measured from its fluorescence lifetime. FRET efficiency *E* is directly related to the ratio between the donor fluorescence lifetime in the presence of the acceptor $\tau_{DA} = (k_{f} + k_{n-r} + k_{t})^{-1}$ and the donor fluorescence lifetime in the absence of the acceptor $\tau_{\rm D} = (k_{\rm f} + k_{\rm n-r})^{-1}$, according to the follow-ing equation: $E = 1 - \frac{\tau_{\rm DA}}{\tau_{\rm D}}$. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) allows to measure fluorescence lifetimes, which typically last several nanoseconds (Fig. 2a). As a consequence, fluorescence excitation must be pulsed (time-domain FLIM) or modulated (frequency-domain FLIM) with appropriate pulse-width and frequency. Sufficiently fast detection is achieved either with time-correlated single-photon counting detectors (TCSPC), which provide better fluorescence lifetime resolution, or fast time-gated intensified cameras, which enable shorter acquisition times than TCSPC. Fluorescence lifetimes are retrieved from a histogram of photon arrival times in TCSPC detection or from a series of fluorescence intensities from different short time windows with gated intensified cameras. FRET efficiency determination by FLIM implies that be performed two fluorescence lifetimes measurements: with and without acceptor, which is typically done in two different samples. Importantly, fluorescence lifetimes may be very sensitive to many other quenching factors from the fluorophore microenvironment besides FRET-inducing acceptors [19]. As a consequence, with- and without-acceptor fluorescence lifetime measurements may preferably be carried on donors in otherwise identical conditions to report FRET as closely as possible (changes in k_t), rather than other changes in the physical-chemistry of the environment (changes in k_{n-r}). Using the sensor-tagged protein of interest lacking the acceptor is probably one of the best controls, although not always the chosen one. FLIM-FRET was performed on TSMod in vinculin, VE-cadherin, PECAM-1, β-spectrin, MUC1 and E-cadherin, in cells and Caenorhabditis elegans [10,20,21,22,23,24,25]. FRET efficiencies measured in cells by FLIM on TSMod may directly be converted to forces using the Force to FRET Efficiency calibration (see above). Doing so, tensions in all tested proteins generally appeared to reach around a couple pN/molecule on average, depending on conditions.

Donor quenching can also be measured from fluorescence intensity on any standard fluorescence microscope equipped with a continuous excitation source. FRET efficiency E is directly related to the ratio between the donor fluorescence intensity in the presence of acceptor I_{DA} and the donor fluorescence intensity in the absence of the acceptor I_D according to the following equation: $E = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}}$. This approach implies that be performed two fluorescence intensity measurements: with and without acceptor. This may be achieved sequentially before and after photobleaching of the acceptor within the same sample to ensure no change in donor concentration, since intensity measurements are directly dependent on fluorophore concentration (Fig. 2b). This approach assumes that the totality of acceptors are effectively photobleached in the region of interest while the donors are not, which may prove difficult to verify in practice. Insufficient acceptor photobleaching, or simultaneous donor photobleaching may result in FRET underestimation. In addition, excessive acceptor photobleaching may also induce photoconversion into a donor-like emitting species, which results in false positive FRET [28]. Nevertheless, acceptor photobleaching was performed on TSMod in vinculin, VE-cadherin, MUC1 and E-cadherin in cultured cells and Drosophila [29,30,22,31,32]. FRET efficiencies measured by acceptor photobeaching on TSMod may also be used with FRET-force calibration to quantify tensions in cells, although this was not done in these cases.

Alternatively, FRET efficiency by donor quenching may be determined from I_{DA} normalized to the directly excited acceptor

a Donor guenching : fluorescence lifetime



Fig. 2. Short overview of the different microscopy techniques for measuring FRET used with MTM. (a) Donor quenching measured by FLIM. FRET efficiency E directly depends on donor lifetimes with and without acceptor. Donor excitation is pulsed. Donor fluorescence lifetimes are measured sequentially. (b) Donor quenching measured by acceptor photobleaching. FRET efficiency E directly depends on donor intensities with and without acceptor. Donor excitation is continuous. Donor intensities are measured sequentially on the same sample before and after acceptor photobleaching. (c) Acceptor sensitized emission. FRET indices depend on donor and acceptor intensities. Donor excitation is continuous, emission from donor and acceptor may be collected simultaneously by spectral imaging. Acceptor intensity corrected from spectral bleedthrough and direct excitation requires, however, additional measurements with acceptor excitation and on control constructs (see Fig. 3) [26,23]. FRET efficiency may be retrieved from determination of γ (see text) or FRET standards (see text and Fig. 3). Acceptor sensitized emission may also be measured by fluorescence anisotropy if donor excitation is polarized. Acceptor channel orthogonal and parallel intensity components may define a FRET index, and FRET efficiency retrieved after index calibration with FRET standards (see Fig. 3) [27].

intensity I_{AA} , both measured in the sample expressing the sensor, and $I_{\rm D}$ normalized to $I_{\rm AA}$ also both measured on a reference sample containing donors and acceptors in equal amounts and far enough to exhibit no FRET. 1:1 stoichimetry between donor and acceptor, and I_{AA} measurement in both samples allow to obtain normalized donor intensities independent of concentration. This approach was used on sstFRET and cpstFRET in α -actinin and spectrin, with co-transfection of donor and acceptor as a no-FRET reference, although co-transfection may not necessarily yield equal amounts of co-expressed proteins [11,12].

2.2.2. Acceptor sensitized emission

С

FRET efficiency E is also related to a ratio between acceptor fluorescence intensity I_{AD} and the donor and acceptor intensities I_{DA} and I_{AD}, all upon continuous donor excitation, according to the following equation: $E = \frac{I_{AD}}{I_{AD} + \gamma I_{DA}}$, where γ accounts for differences in fluorescence quantum yields and detector efficiencies between the donor and acceptor but can also be determined by photobleaching since $\gamma = \frac{I_{AD}}{I_D - I_{DA}}$, and where I_{AD} is corrected for spectral bleedthrough using donor- and acceptor-only constructs as well as systematic determination of acceptor level by measuring I_{AA} with every measurement of I_{AD} and I_{DA} (Fig. 2c). Alternatively, it may prove more convenient to do without γ determination, and even bleedthrough corrections since fluorophores on intramolecular FRET sensors are in 1:1 stoichiometry, by defining a FRET index, for instance $\frac{I_{AD}}{I_{AD}+I_{DA}}$ but many other definitions exist. Such approach is as fast as standard fluorescence intensity imaging can be and is therefore well suited for fast biological processes. FRET efficiency may then be retrieved after calibration of the FRET index using previously published FRET standards of known FRET efficiencies [33] (Fig. 3d). Most studies using MTM have used such sensitized emission and FRET index approaches, although calibrations were only performed for E-cadherin in culture cells and β-spectrin in C. elegans to retrieve tensions, again reaching a couple pN/molecule [26,23]. Of note, FRET efficiencies from sensitized emission matched that from FLIM for β -spectrin [23].

Finally, fluorescence anisotropy provides another way to measure acceptor sensitized emission, and to distinguish it from that of directly excited donor and acceptor emissions, which are both more polarized (Fig. 2d). Fluorescence anisotropy requires polarized excitation and orthogonal analyzing emission filters. The index $R = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$, where I_{\parallel} and I_{\perp} are the emission intensity components parallel and orthogonal, respectively, to the excitation polarity, may be calibrated with FRET efficiency standards. According to previous studies, fluorescence anisotropy measurements may achieve better FRET resolution than fluorescence lifetime measurements [34]. This approach was only applied to cpstFRET in actin [27].

In summary, while fluorescence lifetime and anisotropy approaches are usually more powerful for general intermolecular FRET measurements, their specific instrumental requirements and the fact that MTM biosensors exploit intramolecular FRET may make continuous, unpolarized excitation approaches more attractive for these applications. Finally, sensitized emission effectively assesses whether donor quenching is simultaneously compensated by acceptor excitation. As a result, it may prove much



Fig. 3. Overview of MTM constructs. (a) Sensor-tagged full-length protein: the tension sensor is inserted into a specific site of the protein of interest. (b) Tension-less control constructs: the sensor module alone, the sensor module appended at the C or N-terminus of the protein of interest, or the sensor-tagged protein truncated or mutated at one of its binding ends. (c) Fluorophore and FRET controls. Proteins with just one functional (acceptor or donor) fluorophore at the sensor insertion site or at the N- or C-terminus of the protein. Useful for localization control, intramolecular FRET control, donor fluorescence lifetime reference, and spectral bleedthrouh corrections. (d) FRET efficiency standards that FRET efficiency is known from previous measurements consist in fluorophores separated by a short peptidic sequence for high FRET and a large, rigid protein domain (such as TRAF or I27) for low FRET [33,12]. FRET efficiency standards may be used as is [26,27], or inserted in the protein of interest in lieu of the sensor [23].

less sensitive to non-FRET quenching phenomena than donor fluorescence lifetime measurements when with- and without-acceptor fluorescence lifetimes are measured in different conditions, and it also avoids artefacts of the donor quenching by photobleaching approach.

3. Insertion in proteins and protein functionality

3.1. Proteins of interest

The various FRET-based tension biosensors have now been tested on a growing range of proteins. To date, targeted proteins include cytoskeleton proteins such as α -actinin, spectrin, filamin, and actin, cell adhesion proteins such as vinculin, E-cadherin, VE cadherin, and PECAM-1, the glycocalyx protein MUC1 and the extracellular matrix protein collagen (Table 2). These proteins have been expressed in cultured cells, *C. elegans* and *Drosophila*.

In principle, the sensor can be inserted into any host protein, in any site suspected to bear mechanical forces (Fig. 3a). For instance, stFRET and TSMod were inserted between actin-binding domains of α -actinin, filamin and spectrin homodimers [9,13,23], and TSMod between the transmembrane and cytoskeleton-binding domains of E-cadherin, VE-Cadherin and PECAM-1 [26,20], and between the vinculin head and tail that bind other cell-cell or cell matrix adhesion proteins, and actin, respectively [10]. Insertion into actin filaments was attempted differently, by flanking a cpstFRET sensor with two actin monomers, so that the sensor is inserted in the polymer without being inserted within the monomer. Doing so, the sensor presumably transmit the tension from one side of the filament to the other [27].

Insertion of two fluorescent proteins and linkers that total size may exceed 600 amino acids is not, however, an innocuous modification. In practice, knowledge of the protein sequence and structure is a plus to avoid insertion sites likely to disrupt protein functions. As a rule of thumb, it is wise to avoid known binding domains, post-translationally modified sites such as phosphorylation sites, localization sequences, or highly structured domains. For instance, MTM sensors were inserted between spectrin repeats of α -actinin and spectrin, between IgG domains of filamin [9,11,12,23], or in unstructured regions of the cadherin tail [26,20]. Nevertheless, cautious design does not alleviate the need for functionality tests. To do so, a number of strategies have been devised as summarized below.

3.2. Protein functionality

The range of functionality tests is only limited by the prior knowledge of the protein functions. As a consequence, there is no sufficient set of tests to fully ensure protein functionality. Nevertheless, a variety of verifications can be performed at the molecular, cellular and organism scales.

At the molecular scale, the molecular weight and expression level of the protein expressed in the organism of choice can be assessed by western blot analysis of cell lysates [10]. Cellular and tissue localization of the sensor-tagged protein can be compared to that of the wild type by immunofluorescence on the endogenous form or expression of a validated FP-tagged construct (Fig. 3c). For instance, sensor-tagged cadherins and PECAM-1 localize to cellcell contacts, and vinculin to cell-cell contacts, Focal Adhesions or podosomes as expected [10,26,35,20,29,30,36,31,37,24,25,32] a version of stFRET-collagen localizes to expected structures in the body of C. elegans, but other versions with stFRET inserted at alternate sites did not, and were subsequently discarded [9]. Actin itself and other actin cross linkers generally localize in actin structures and a cytoplasmic pool [9,13,11,38,12,39,27,40,41]. In addition, the mobility of the sensor-tagged protein can be tested by FRAP. For instance, the recovery rate of vinculin-TSMod in Focal Adhesions was found indistinguishable from that of terminally Venus-tagged vinculin [10]. Similar mobility tests were performed on VE-cadherin-TSMod and β-spectrin-TSMod [20,22]. In principle, biochemistry methods can test for interactions between the sensor-tagged protein and its expected binding-partners. For instance, immunoprecipitation and western blot showed that VE-cadherin-TSMod indeed interacts with β-catenin, involved in its link with actin [20]. In some cases, this might prove more difficult. For instance, full-length vinculin is known to adopt in solution an auto-inhibited conformation that prevents interactions with its partners [42,43], F-actin-binding of vinculin-TSMod was thus tested by co-sedimentation from cell lysates complemented with actin and the bacterial protein IpaA that only together relieve the auto-inhibition [10].

At the cell and organism scales, rescue experiments can be performed by expression of the sensor-tagged protein in a background depleted from, or lacking its endogenous form. For instance, E-cadherin-TSMod expression was able to rescue cell-cell adhesion in L-fibroblasts, the expression of the cadherin complex protein α -catenin as well as its recruitment to cell-cell contacts C. Gayrard, N. Borghi/Methods 94 (2016) 33-42

Та	bl	e	2
----	----	---	---

38

Summary of MTM sensors and their use.

Name	Spring	Proteins	Organisms	References
stFRET	α-Helix	Collagen-19 Spectrin Filamin A ¤-Actinin	C. elegans HEK293, 3T3, BAEC	[9] Meng et al. (2008), [13] Meng et al. (2011)
TSMod	(GPGGA) ₈ from flagelliform silk protein	Vinculin	Vinculin ^{-/-} cells, BAEC, MEF, HEK293 Dendritic cells U-373 MG Primary epidermal keratinocytes <i>Xenopus</i> neural crest cells Caco-2 Mammary epithelial cells Chromaffin cells H1299	 [10] Grashoff et al. (2010) [21] Van den Dries et al. (2013) [35] Chang and Kumar (2013) [44] Gautrot et al. (2014) [30] Kuriyama et al. (2014) [36] Leerberg et al. (2014) [31] Rubashkin et al. (2014) [24] Papadopulos et al. (2015) [45] Hernández-Varas et al. (2015)
		E-cadherin	MDCK, L fibroblasts Drosophila MCF10A MDCK	 [26] Borghi et al. (2012) [29] Cai et al. (2014) [47] Rolland et al. (2014) [25] Sim et al. (2015)
		PECAM-1 VE-cadherin	BAEC, VE-cadherin ^{-/-} cells, PECAM-1 ^{-/-} cells, HUVEC HMEC or primary human pulmonary arterial endothelial cells HDMEC	[20] Conway et al. (2013) [37] Daneshjou et al. (2015)
		β-Spectrin (UNC70) MUC1	<i>C. elegans</i> Mammary epithelial cells	 [22] Formavata et al. (2013) [23] Krieg et al. (2014) [46] Kelley et al. (2015) [22] Paszek et al. (2014)
SSTFRET	3 α -helices from a spectrin repeat	α-Actinin	BAEC, HEK293 MDCK HEK293	 [11] Meng and Sachs (2011) [38] Rahimzadeh et al. (2011), [39] Verma et al. (2012), [40] Ye et al. (2014) [41] Suffoletto et al. (2015).
cpstFRET	GGGGG	α-Spectrin α-Actinin β-Actin	BAEC, HEK293, MDCK MDCK HEK293, MDCK, 3T3, BAEC	[12] Meng and Sachs (2012) [27] Guo et al. (2014)

together with β -catenin [26]. In *Drosophila*, E-cadherin-TSMod rescued β -catenin expression and border cell migration in a background RNAi-depleted of endogenous E-cadherin [29]. In *C. elegans*, β -spectrin-TSMod rescued the paralysis phenotype of a spectrin mutant [23].

3.3. Is the protein under tension?

To test whether the protein of interest is under tension, a comparison with a tension-less control construct is required. To do so, a number of constructs can be expressed: the sensor module alone, not inserted in a protein, the sensor module appended at the C or N-terminus of the protein, or the sensor-tagged protein truncated or mutated at one of its binding ends (Fig. 3b). The sensor alone localizes in the cytoplasm and nucleus while the two other constructs are designed to localize at the site of the wild type protein. The terminally-tagged control is presumably functional and may be used in a null background. The truncated or mutated ones are not functional but present the advantage of carrying the sensor at the same site as that of the full length protein.

Since all above constructs lack a binding site on at least one side of the sensor, the sensor is presumably under no tension. FRET measurements from TSMod and cadherin-TSMod lacking its cytoskeleton-binding cytoplasmic tail were indeed indistinguishable from each other, and both higher than that of cadherin-TSMod in epithelial and endothelial cells [26,20], so did actin-cpstFRET and cpstFRET compared with actin-cpstFRET-actin [27]. Similarly, the sensor alone, or truncated or terminally-tagged constructs consistently exhibited higher FRET than that of their full-length internally-tagged counterparts for vinculin and spectrin, showing that all these proteins were under tension in cultured cells or live animals [10,12,21,29,44,23,30,36, 45,46]. Not all proteins, however, exhibit constitutive tension in

any cell type. For instance, spectrin exhibits insignificant tension in HEK cells [12], so does PECAM-1 in endothelial cells not subjected to shear flow [20].

Of note, terminally-tagged spectrins exhibited lower FRET than that of corresponding cytosolic sensors, as measured by sensitized emission in cultured cells and *C. elegans* [12,23]. This result suggests that the intracellular environment may affect FRET. Interestingly, tension-insensitive FRET standards inserted into β -spectrin appeared to exhibit similar FRET to that of their host-protein-free counterparts previously measured in other conditions [23,46]. Therefore, a reasonable possibility is that protein-bound and free control sensors may effectively be under different mechanical loads in different cellular localizations, despite the lack of protein binding sites. Indeed, the TSMod sensor was found to be sensitive to compression when inserted in the glycocalyx protein MUC1 in MEC cells [22], and compression may not require specific protein interactions. Therefore, a possibility is that molecular crowding may affect the level of tension/compression on the sensor depending on its cellular localization and insertion site, and independently of specific interactions. Similarly, α -actinin-sstFRET exhibited higher FRET than cytoplasmic sstFRET in HEK and MDCK cells [13,38], suggesting a possible compression or torque on the protein, which constrains the distance or the angle between the fluorophores when embedded in the protein of interest. Nevertheless, C-terminally-tagged α -actinin-sstFRET showed higher FRET than its internally-tagged counterpart, as expected for a tension-less sensor [40,41].

4. Molecular tension and function

4.1. Cellular regulation of molecular tension

Most proteins of interest are cytoskeletal or cytoskeleton-binding, therefore are likely subjected to the

cytoskeleton mechanical activity, or merely integrity. Indeed, truncation of cytoskeleton-binding regions of cadherins or vinculin (see above) strongly supports that the cytoskeleton is able to pull on these proteins [10,26,20]. Beyond the mere traction of the cytoskeleton, the impact on molecular tensions of cellular functions of interest can generally be tested by their pharmacological, genetic or physical perturbations.

Pharmacological perturbation of actomyosin activity may be achieved with F-actin depolymerizing drugs (cytochalasin, latrunculin), inhibitors of myosin or its close activators (ROCK-targeting Y27632 and Rockout, myosin light chain kinase-targeting ML-7, blebbistatin), or conversely with indirect promoters of the active, phosphorylated form of myosin (thrombin, ionomycin, caffeine or LPA). The pleiotropy of some of these drugs may require, however, caution in result interpretation. Nevertheless, treatments inducing actin depolymerization and myosin activity inhibition led to, as expected, tension relaxation in cadherins, PECAM-1, vinculin, spectrin, actin, α -actinin in cultured cells and E-cadherins in Drosophila [10,40,26,12,35,20,21,29,27,30,36,40,45,24,25,41]. In Drosophila egg chamber, ionomycin provoked a tension increase in border cells' cadherins [29]. In cultured cells, caffeine induced increased tension in actin [27]. In contrast, thrombin appeared to cause a relaxation of α -actinin tension [13], not inconsistently with its parallel crosslinking of actin fibers, but at odds with α -actinin tension relaxation by myosin activity inhibitiors as mentioned above [38,40,41], and with LPA-induced α -actinin tension increase in MDCK Focal Adhesions [40]. Finally, in non-small lung carcinoma cells, nocodazole treatment enriched cells in Focal Adhesions with stabilized, rather than constitutively fluctuating, vinculin tension, presumably through disruption of a microtubule-dependent disassembly mechanism of those metastable adhesion complexes [45].

Genetic perturbation may be achieved by depletion of proteins or expression of mutants. For instance, depletions of Myosin IIa or N-cadherin released vinculin tension in Focal Adhesions and cellcell contacts, respectively [10,30,24]. In contrast, depletion of an LPA receptor increased vinculin tension at cell-cell contacts but not in Focal Adhesions of Xenopus neural crest cells [30], presumably through inhibition of N-cadherin endocytosis. Interestingly, inhibition of vinculin head-tail interaction by specific point mutations in the head domain increased vinculin tension in Focal Adhesions in MEC cells on rigid but not on soft substrates [31], possibly because impaired rigidity-dependent recruitment of vinculin due to the mutations can no longer buffer increased cell contractility on rigid substrates. In epithelial cells, depletion of α -catenin, which links the cadherin complex to actin, induced E-cadherin tension relaxation, as expected [26]. Expression of a dominant negative (DN) form of the actin regulator Rac also decreased tension on E-cadherin in Drosophila border cells [29]. In endothelial cells in contrast, photoactivation of Rac induced a tension decrease in VE-cadherin [37], as expected from a Rac antagonistic function to that of Rho on actomyosin contractility. In endothelial cells, a VE-cadherin-α-catenin chimera lacking binding to β-catenin exhibited the same tension response to shear flow (see below) as the full length counterpart, showing no role of β -catenin unbinding in the process. In contrast, cells null for either VE-cadherin or PECAM-1, the other cell-cell adhesion protein no longer exhibited the response in tension to shear flow of cells expressing both proteins [20]. Interestingly, depletion of the intermediate filament protein vimentin impaired PECAM-1 tension response to flow but not that of VE-cadherin [20]. In contrast, depletion of the Zonula Ocludens protein ZO-1 decreased tension on VE-cadherins [32]. In C. elegans neurons, overexpression of the tetramerization domain of α -spectrin to disrupt the spectrin cytoskeleton led to a decrease in tension in β -spectrin [23]. In MDCK cells on elastic substrates, expression the oncogene hRas in the presence of the

growth factor TGF- β 1 increased tension in actin, concomitant with stem cell-like features [27].

Physical perturbation inside cells may essentially be applied by femtosecond laser ablation. Laser ablation targeting actin stress fibers in cultured cells induced a redistribution of tension on vinculin across Focal Adhesions [35]. Ablation reduces tension across vinculin on average, but vinculin tension may increase in some Focal Adhesions. In addition, cells respond differently to ablation targeting peripheral and central stress fibers. In the same lines, axotomy in *C. elegans* relaxed β -spectrin tension over about 1 μ m away from the wound [23].

4.2. Sensitivity to extracellular cues

Determining how intracellular tensions respond to extracellular cues is key to demonstrate the possible involvement of proteins of interest in mechanotransduction pathways. Extracellular cues may comprise matrix biochemistry, growth factors, substrate rigidity, shear flow, cell or tissue deformation, cell adhesion confinement or osmotic pressure, which manipulation in cell culture may mimic physio- or pathological changes that occur in organisms.

For instance, vinculin is under tension in Focal Adhesions of cells adhered on fibronectin while it is not in cells on poly-L-lysine [10]. Interestingly, vinculin tension does not appear very sensitive to changes in substrate rigidity in MEC cells, at least in the 1–14 kPa range [31], which questions about the involvement of vinculin in rigidity-sensing. In contrast, HEK cells grown on elastic substrates into embryonic bodies exhibited higher actin tension than on glass, so did TGF β 1-treated, hRas-transformed MDCK cells [27]. In mammary epithelial cells, epithelial growth factor (EGF) increased E-cadherin tension, presumably through a CIP4-dependent control of actomyosin contraction [47].

C. elegans worms stretched with micropipettes exhibited some tension changes in collagen in regions of the body in contact with the aspirating pipette [13]. Direct stretching of epithelial cells by micromanipulation induced tension increase in E-cadherins specifically at cell–cell contacts between stretched cells, but not at the membrane not involved in cell–cell contacts [26]. Transient cell indentation induced a tension increase in actin, followed by a relaxation [27].

Mechanical stress due to shear flow can be sensed by cells. Shear flow applied on epithelial or endothelial cells indeed induced tensions changes in α -actinin, VE-cadherin or PECAM-1 [38,39,20]. In epithelial cells, reversible tension relaxation in α -actinin occurred during application of shear flow but cyclic shear flow application induced an overall tension increase, showing adaptation of the cell response [38]. In endothelial cells, shear flow triggered a tension increase in PECAM-1 while a concomitant tension decrease in VE-cadherin [20], and a tension increase in spectrin [13].

Cell adhesion confinement can be performed using patterned adhesive substrates. Specific geometries favor distinct cytoskeleton organizations in different subcellular regions. In HEK cells on T-shaped patterns, α -actinin exhibits high tension is regions that display thick actin stress fibers hanging between cell-adhesive surfaces, and lower tension in regions contacting cell-adhesive surfaces [41]. In primary epidermal keratinocytes, sub-micron adhesive patterns decreased tension on vinculin compared to larger patterns or unpatterned surfaces [44]. In contrast, in pairs of MDCK cells, E-cadherin tension at cell-cell contacts was insensitive to cell-substrate adhesion geometries that nevertheless affected cell traction forces [25].

Effects of osmotic stress were assessed on α -actinin and actin in endothelial and epithelial cells [11,27]. Results show a correlation between cell swelling and tension increase in α -actinin or actin.

Finally, tension in β -spectrin of *C. elegans* epidermis appeared to depend on the contact of the neighboring pharynx during embryo morphogenesis [46].

4.3. Is FRET measurement only sensitive to molecular tension?

Molecular tension sensors are designed to report mechanical forces from FRET measurements, indirectly derived from fluorescence lifetime or intensity ratios. Besides distinct sensitivities of lifetime and intensity ratios to other factors than FRET (see above), changes in *bona fide* FRET may not necessarily report changes in molecular tension.

Molecular tension measurement with FRET sensors assumes that changes in FRET essentially arise from changes in intramolecular FRET. Intermolecular FRET may occur, however, between donors and acceptors of sensors from adjacent proteins when they accumulate in specialized structures, are known to oligomerize, and even more when cells lack the endogenous form and only express the sensor-tagged version. A strategy to test whether intermolecular FRET occurs is to co-express two control constructs that each consist in the protein of interest bearing only one fluorophore, either by deletion or mutation of the other one (Fig. 3c). At the expression levels of control constructs, little intermolecular FRET was shown to occur for vinculin, VE-cadherin, PECAM-1 or MUC1 in cultured cells [10,20,22]. Another way to assess for intermolecular FRET is to examine whether FRET is dependent on the sensor-tagged protein concentration. Indeed, the higher the concentration, the higher the intermolecular FRET, if any. Such assay also tests for any other intermolecular FRET-independent effect of protein concentration on FRET measurement. A range of protein concentrations, assessed from the fluorescence intensity of the directly excited acceptor, may be observed within a single cell, due to the uneven recruitment of the protein of interest, or across a cell population. The relationship between FRET and protein concentration within a given experimental condition may be used to correct for the effect of a significant concentration change if such change were observed across conditions. Nevertheless, for α -actinin, E-cadherin, MUC1 and spectrin in cultured cells or *C. ele*gans, FRET changes with protein concentration were shown to be negligible or insignificant within the range or protein concentration changes that may be observed between experimental conditions [11,26,23,22].

Special attention may be given to proteins that exhibit conformation changes, as such changes may propagate to the sensor. Vinculin undergo a conformation change regulated by a head-tail interaction that competes with interactions with other molecular partners. Nevertheless, *in vitro* interaction of sensor-tagged vinculin with actin and IpaA, which disrupts the head-tail interaction and leads vinculin to change conformation, did not significantly affect FRET [10].

More generally, FRET changes across conditions due to unknown factors other than tension changes may be assessed by submitting tension-less or tension-insensitive control constructs to the same conditions as their tension sensitive counterparts, with the limitations that tension-less constructs are not necessarily load-free or functional (see above). For instance, terminally-tagged sensor in vinculin appeared to be insignificantly sensitive to substrate biochemistry, Focal Adhesion assembly, disassembly and position within the cell [10], to laser ablation targeting actin fibers [35], to myosin pharmacological perturbation [21,45] and to secretagogue stimulation in chromaffin cells [24]. Similarly, terminally-tagged sensors in β-spectrin were not sensitive to embryonic tissue localization in *C. elegans* [46] and to cell migration and cytoskeleton drugs in cultured cells [12]. In E-cadherin, terminaly-tagged sensor was insensitive to EGF stimulation in epithelial cells [47], and to the expression of a DN Rac and

to its localization in migrating border cell clusters in *Drosophila* [29]. In actin, the sensor flanked by a monomer on one side only was insensitive to substrate rigidity, hRas expression and TGF β 1 exposure, cytochalasin D, caffeine, cell indentation and osmotic pressure in cultured cells [27]. The terminally-tagged α -actinin sensor was insensitive to Focal Adhesion recruitment and myosin activity inhibition [40] and to subcellular localization in adhesion-confined cultured cells [41]. Tension-insensitive standards within β -spectrin also showed no FRET change in *C. elegans* after axotomy, and across tissues during morphogenesis [23,46]. Finally, sensor-alone controls appeared to exhibit insignificant FRET changes in cultured cells through time, under thrombin treatment, osmotic shock [11] and fluid shear flow [38]. Nevertheless, were control constructs exhibiting FRET changes, the method would allow to take into account this contribution.

Differential FRET response to a perturbation of the tension-sensitive construct in distinct cellular or tissue regions may also rule out global measurement drift due to unknown factors. For instance, stretching cells increased E-cadherin tension only at cell-cell contact and not contact-free membrane [26], laser ablation increased vinculin tension in some Focal Adhesions while decreasing it in others [35], axotomy decreased spectrin tension locally in *C. elegans* [23], and adhesion confinement induced lower α -actinin tension in substrate-contacting cell regions than in non-contacting regions [41]. Similarly, differential FRET in distinct subcellular or tissue regions during spontaneous cell or animal activity may not be accounted for global measurement drift. For instance, vinculin is under higher tension in Focal Adhesions of protruding cell regions than it is in retracting cell regions in cultured migrating cells [10] and generally exhibit temporal and spatial variations across Focal Adhesions population [35,45], E-cadherin exhibits a tension differential from front to back border cell cluster in *Drosophila* [29], α-actinin is under higher tension in growing Focal Adhesions that around [40], and β-spectrin exhibit differential tension across tissues during C. elegans embryonic development [46].

Finally, a likely source of FRET change may be sample fixation, as a result of tension change or not, since the process results in sample death and molecular crosslinking. Indeed, fixation of *Drosophila* egg chambers appeared to increase FRET in E-cadherin-TSMod, as measured by acceptor photobleaching [29]. Nevertheless, it is possible to find fixation conditions that do not significantly alter FRET, as demonstrated in endothelial cells expressing VE-cadherin-TSMod or PECAM-1-TSMod, their truncated counterpart, and with or without pharmacological treatments against myosin activity [20].

4.4. Limitations

An intrinsic limitation of all molecular tension sensors as they are designed to date is the bounded detection range that does not exceed about 7 pN [10,13] (Fig. 4a). As a consequence, the sensor is not able to discriminate between 10, 50 or even 100 pN forces and yields the same signal for all. While the stroke of a single molecular motor typically generates a few pN forces, intermolecular bonds may withstand more than 7 pN, and many motors may cooperate to pull proteins beyond the limit measurable by current sensors. Therefore, a quantitative estimate of the molecular forces as measured to date may in fact be a lower estimate of the actual forces.

In addition, MTM in proteins expressed in cultured cells and organisms has to date only been performed as an ensemble measurement. Each pixel of an image was assigned a FRET value that averaged FRET from all the proteins contained in at least a focal volume, and information on the distribution of FRET across the population was lost (Fig. 4b). While this is an intrinsic limitation



Fig. 4. Limitations of MTM measurements. To date, the smallest volume of MTM measurement in live cells contains many sensor-tagged proteins that all contribute to the overall FRET value. (a) As a result the FRET value is an average from all proteins under tension within the detection range of the force sensor (pale green area) with no information on the force distribution and whether it exceeds the detection range of the sensor. (b) FRET is also averaged over the acquisition time.

of FRET measurements based on continuous excitation, FLIM can in principle resolve to some extent multiple fluorescence lifetimes within a focal volume, although this feature has not been exploited with MTM sensors to determine sub-focal FRET heterogeneities. Such heterogeneities may arise in general from some fraction of fluorescent proteins in a dark state or from heterogeneities in donor–acceptor inter-distance and relative orientation [48,49]. In the case of MTM sensors, the latter may result from tension heterogeneities among the protein population, and therefore contain valuable information to understand the mechanisms of certain biological processes.

Moreover, MTM microscopy as it has been performed so far provides no information on the net orientations of the averaged forces, all the more so on that of individual molecular tensions. In addition, only the sensor-tagged proteins are accounted for. As a consequence, estimation of net forces applied on any particular supra-molecular region of the cell cannot be performed without very strong assumptions.

Finally, the flipside of MTM uniqueness is that it has to date not been validated by a distinct tool that can measure molecular tension with molecular specificity *in situ*, but not based on insertion of a genetically encoded newtonmeter. As a consequence, it is unknown how close is the force measurement on the chimeric construct from the actual force exerted on a wild type endogenous counterpart.

5. Perspectives

Improvements of MTM can readily be envisioned, and some of them may address the current limitations. For instance, the spring sequence may be modified to give access to different or larger force ranges, and/or better force resolution. Other fluorophores leveraging click-chemistry on genetically encoded tags or synthetic amino acids may be tested to optimize the detection of the fluorescence signal. To date, MTM sensors have been used in exogenously expressed proteins but recent emergence of versatile genome engineering tools such as CRISPR/Cas9 should now allow to directly perform MTM on endogenous proteins. Single-molecule FRET has already been performed on MTM sensors to examine tension in substrate adhesion receptors of cultured cells [50], the same approach on intracellular proteins would open the possibility to perform single-molecule force spectroscopy within live cells and overcome some of the limitations of current ensemble measurements. Complementarily, recent progress in mechanical manipulation with optical tweezers within cells should soon allow not only to measure but also to apply forces with molecular specificity on any protein of interest in situ, and thereby validate and complement MTM to investigate mechanotransduction further.

MTM is still a young tool, and is likely that we will see these implementations and others as they come along together with MTM applications to additional proteins and other biological questions. As any pioneering tool, perhaps the most exciting aspect of MTM is its ability to reveal the seemingly unexpected. Constitutive tension of E-cadherin in non-cell-cell contact membrane in epithelial cells [26], VE-cadherin tension relaxation upon shear flow on endothelial cells [20], or the absence of simple correlations between molecular- and cell-scale forces or macromolecular complexes sizes [35,25,45] are just a few examples of what we should be prepared for, and an invitation to keep questioning what we take for granted.

Acknowledgments

We thank the members of the laboratory for insightful discussions. This material is based in part upon work supported by the Centre national de la recherche scientifique (CNRS), the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer grant SFI20121205916 and the Agence nationale de la recherche (ANR) grants ANR-13-JSV5-0007-01 and ANR-14-CE09-0006-02, and the France-BioImaging infrastructure (ANR-10-INSB-04 grant).

We apologize to our colleagues whose work using MTM sensors escaped our scrutiny or were published too recently to be cited in this review.

References

- [1] W. Seifriz, An elastic value of protoplasm, with further observations on the viscosity of protoplasm, J. Exp. Biol. 2 (1) (1924) 1–11.
- [2] F.H.C. Crick, A.F.W. Hughes, The physical properties of cytoplasm, Exp. Cell Res. 1 (1) (1950) 37–80.
- [3] L.V. Beloussov, J.G. Dorfman, V.G. Cherdantzev, Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos, J. Embryol. Exp. Morphol. 34 (3) (1975) 559–574.
- [4] Forces-in-tissue workshop participants, Measuring forces and stresses *in situ* in living tissues, bioRxiv (2015), http://dx.doi.org/10.1101/016394.
- [5] Y. Sawada et al., Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate, p130Cas, Cell 127 (5) (2006) 1015–1026.
- [6] S.L. Diamond, S.G. Eskin, L.V. McIntire, Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells, Science 243 (4897) (1989) 1483–1485.
- [7] E. Farge, Mechanical induction of twist in the Drosophila foregut/stomodeal primordium, Curr. Biol. 13 (16) (2003) 1365–1377.
- [8] A.J. Engler et al., Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, Cell 126 (4) (2006) 677–689.
- [9] F. Meng, T.M. Suchyna, F. Sachs, A fluorescence energy transfer-based mechanical stress sensor for specific proteins *in situ*, FEBS J. 275 (12) (2008) 3072–3087.
- [10] C. Grashoff et al., Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics, Nature 466 (7303) (2010) 263–266.
- [11] F. Meng, F. Sachs, Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliancematched FRET sensor, J. Cell Sci. 124 (Pt 2) (2011) 261–269.
- [12] F. Meng, F. Sachs, Orientation-based FRET sensor for real-time imaging of cellular forces, J. Cell Sci. 125 (Pt 3) (2012) 743–750.
 [13] F. Meng et al., Real time FRET based detection of mechanical stress in
- [13] F. Meng et al., Real time FREI based detection of mechanical stress in cytoskeletal and extracellular matrix proteins, Cell Mol. Bioeng. 4 (2) (2011) 148–159.
- [14] G. Zocchi, Controlling proteins through molecular springs, Ann. Rev. Biophys. 38 (2009) 75–88.
- [15] C.-Y. Tseng et al., Elastic energy of protein-DNA chimeras, Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. 80 (6 Pt 1) (2009) 061912.

- [16] J.T. Finer, R.M. Simmons, J.A. Spudich, Single myosin molecule mechanics:
- piconewton forces and nanometre steps, Nature 368 (6467) (1994) 113–119. [17] J. Saeger et al., GFP's mechanical intermediate states, PLoS One 7 (10) (2012) e46962
- [18] E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, FRET imaging, Nat. Biotechnol. 21 (11) (2003) 1387-1395.
- [19] W. Becker, Fluorescence lifetime imaging-techniques and applications, J. Microsc. 247 (2) (2012) 119–136.
- [20] D.E. Conway et al., Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1, Curr. Biol. 23 (2013) 1024–1030.
- [21] K. Van den Dries et al., Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations, Nat. Commun. 4 (2013) 1412.
- [22] M.J. Paszek et al., The cancer glycocalyx mechanically primes integrinmediated growth and survival, Nature 511 (7509) (2014) 319–325.
- [23] M. Krieg, A.R. Dunn, M.B. Goodman, Mechanical control of the sense of touch by β-spectrin, Nat. Cell Biol. 16 (3) (2014) 224–233.
- [24] A. Papadopulos et al., Activity-driven relaxation of the cortical actomyosin II network synchronizes Munc18-1-dependent neurosecretory vesicle docking, Nat. Commun. 6 (2015) 6297.
- [25] J.Y. Sim et al., Spatial distribution of cell-cell and cell-ECM adhesions regulates force balance while maintaining E-cadherin molecular tension in cell pairs, Mol. Biol. Cell 26 (2015) 2456–2465.
- [26] N. Borghi et al., E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell – cell contacts upon externally applied stretch, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109 (2012) 12568–12573.
- [27] J. Guo et al., Actin stress in cell reprogramming, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (49) (2014). E5252-61.
- [28] G. Valentin et al., Photoconversion of YFP into a CFP-like species during acceptor photobleaching FRET experiments, Nat. Methods 2 (11) (2005) 801.
- [29] D. Cai et al., Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration, Cell 157 (5) (2014) 1146– 1159.
- [30] S. Kuriyama et al., *In vivo* collective cell migration requires an LPAR2dependent increase in tissue fluidity, J. Cell Biol. 206 (1) (2014) 113–127.
- [31] M.G. Rubashkin et al., Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate, Cancer Res. 74 (17) (2014) 4597–4611.
 [32] O. Tornavaca et al., ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell
- [32] O. Tornavaca et al., ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation, J. Cell Biol. 208 (6) (2015) 821– 838.

- [33] R.N. Day, C.F. Booker, A. Periasamy, Characterization of an improved donor fluorescent protein for Förster resonance energy transfer microscopy, J. Biomed. Opt. 13 (3) (2008) 031203.
- [34] M.A. Rizzo, D.W. Piston, High-contrast imaging of fluorescent protein FRET by fluorescence polarization microscopy, Biophys. J. 88 (2) (2005) L14–L16.
- [35] C.-W. Chang, S. Kumar, Vinculin tension distributions of individual stress fibers within cell-matrix adhesions, J. Cell Sci. 126 (14) (2013) 3021–3030.
 [36] J.M. Leerberg et al., Tension-sensitive actin assembly supports contractility at
- the epithelial zonula adherens, Curr. Biol. 24 (2014) 1689–1699. [37] N. Daneshjou et al., Rac1 functions as a reversible tension modulator to
- stabilize VE-cadherin trans-interaction, J. Cell Biol. 208 (1) (2015) 23–32. [38] J. Rahimzadeh et al., Real-time observation of flow-induced cytoskeletal stress
- in living cells, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 301 (3) (2011) C646–C652.
 [39] D. Verma et al., Interplay between cytoskeletal stresses and cell adaptation under chronic flow, PLoS One 7 (9) (2012) e44167.
- under chronic flow, PLoS One 7 (9) (2012) e44167. [40] N. Ye et al., Direct observation of α -actinin tension and recruitment at focal
- adhesions during contact growth, Exp. Cell Res. 327 (1) (2014) 57–67.
 [41] K. Suffoletto et al., Intracellular forces during guided cell growth on micropatterns using FRET measurement, J. Biomech. 48 (4) (2015) 627–635.
- [42] R.P. Johnson, S.W. Craig, An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding, J. Biol. Chem. 269 (17) (1994) 12611–12619.
- [43] R.P. Johnson, S.W. Craig, F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains, Nature 373 (6511) (1995) 261– 264.
- [44] J.E. Gautrot et al., The nanoscale geometrical maturation of focal adhesions controls stem cell differentiation and mechanotransduction, Nano Lett. 14 (7) (2014) 3945–3952.
- [45] P. Hernández-Varas et al., A plastic relationship between vinculin-mediated tension and adhesion complex area defines adhesion size and lifetime, Nat. Commun. 6 (2015) 7524.
- [46] M. Kelley et al., FBN-1, a fibrillin-related protein, is required for resistance of the epidermis to mechanical deformation during *C. elegans* embryogenesis, eLife 4 (2015) e06565.
- [47] Y. Rolland et al., The CDC42-interacting protein 4 controls epithelial cell cohesion and tumor dissemination, Dev. Cell 30 (5) (2014) 553–568.
- [48] S. Padilla-Parra et al., Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast FRET-FLIM acquisition, Biophys. J. 97 (8) (2009) 2368–2376.
- [49] S.S. Vogel et al., The impact of heterogeneity and dark acceptor states on FRET: implications for using fluorescent protein donors and acceptors, PLoS One 7 (11) (2012) e49593.
- [50] M. Morimatsu et al., Molecular tension sensors report forces generated by single integrin molecules in living cells, Nano Lett. 13 (9) (2013) 3985–3989.

Liste des Figures

Figure 1	- Accumulation dans le segment du milieu du tibia de l'embryon de poulet de cAMP et cGMP en pmol/ μ g d'ADN
	al 1975)
Figure 2	 - a) Schéma du dispositif expérimental pour soumettre les cellules endothéliales à des forces de cisaillement
	mimant le flux de la circulation sanguine (Issu de Francke et al. 1984). b) Profils de production de prostacyclines (PGI2) en ng/106cellules pour des cellules soumises à un flux pulsatile (rouge), un flux statique (bleu), et sans flux
	(noir). (Issu de Frangos et al. 1985). c) Sécrétion de t-PA en ng/106 cellules HUVECS en fonction du temps pour des conditions normales statiques, ou pour des HUVECS sous l'application d'un flux laminaire de cisaillement de
	4 (point verts), 15 (orange) ou 25 (rouge) dynes/cm ² (Issu de Diamond et al. 1989)
Figure 3 -	– a) Haut : Schéma d'un gel de module élastique E variant de 1 à 100kPa, d'épaisseur contrôlé, fonctionnalisé avec
	du collagène-I pour permettre l'adhésion des cellules MSCs. Bas : Images des cellules MSCs, initialement non différentiées rondes, puis avec une forme plus branchée, en demi-lune, ou polygonale lorsqu'elles sont cultivées
	respectivement sur des substrats de module élastique ~Ecerveau (0.1–1 kPa), ~Emuscle (8–17 kPa), or Erigide
	(25–40 kPa) b) Haut : Module élastique E (kPa) mesuré pour différents tissus. Bas : Intensité de fluorescence pour différents margueurs de différentiations (Neurone : p-NEH : Muscle : MvoD : Os : CBE-α-1) en fonction du
	module élastique E du substrat. (Issu de Engler et al. 2006)
Figure 4	- a) Schéma d'une force appliquée sur un ressort. b) Principes des senseurs de forces FRET. Un bas FRET indique
	que le senseur s'est déformé par l'application d'une force. Deux types de senseurs existent : celui dont la
	déformation est due à un changement de distance entre les fluorophores et celui dont la déformation est due à un changement d'angle entre les deux fluorophores
Figure 5	- Différents ressorts génétiquement encodés : hélice α (stFRET), répétition de spectrine (sstFRET), ressort
	entropique issue de la protéine flagelliforme de la soie d'araignée (TSMod) ou de 12 acides aminés, et issue du
	peptide villin-headpiece.(HP35)
Figure 6 -	- Mesure d'un ensemble de tension au sein d'un pixel. a) Exemple de distribution des forces au sein d'un ensemble
	de protéines : certaines ne sont pas sous tension, d'autres ont une tension trop élevée pour être mesurée avec le
	senseur TSMOd, seule une mesure moyenne est accessible. D) Exemple de fluctuations de tension trop rapides
Figure 7	– Elongation des filaments d'actine. a) Taux de polymérisation pour les filaments d'actine avec de l'actine GTP ou
-	ATP. Les constantes d'associations sont en μ M-1 s-1 et les constantes de dissociation sont en s-1, K est la
	constante d'équilibre de dissociation en $\mu M.$ Les constantes d'équilibre pour l'actine-ATP différent entre
	l'extrémité (+) et (-), ce qui explique le phénomène de treadmilling – illustré ici par le monomère d'actine en jaune
	En définitive, l'extrémité (+) a tendance à polymériser à partir d'actine-ATP, et l'extrémité (-) à dépolymériser.
	filament. (Adapté de (Pollard and Borisy, 2003))
Figure 8 -	– Exemple de protéines associées à l'actine (Adapté de (Pollard, 2016)) 40
Figure 9	- Représentation schématique de la myosine II. a) sous sa forme inactive, et activée après phosphorylation en
	Ser19 par la kinase MLCK par exemple. b) Exemple d'association pour les myosines II au niveau de leurs chaines
	APTase de la tête des myosines va leur permettre de changer de configuration et d'avancer le long des filaments
	antiparallèles d'actine et donc de générer des forces contractiles. (Adapté de (Vicente-Manzanares et al., 2009)).
Figure 10	
Figure 10	constitués d'une centre et des differences superstructures à actine la composant. Le contex et le lamempode sont
	fibres de stress de fibres d'actine antiparallèle contractiles. Les adhésions focales adhérentes au substrat sont
	représentées en violet. Chaque structure recrute des protéines se liant à l'actine spécifique (Blanchoin et al., 2014)
Figure 11	L – Structure des microtubules. a) Assemblage à partir d'un dimère à partir d'un monomère d'α-tubuline. avec un
0.01	de β -tubuline, puis assemblage en protofilaments, et puis en fibres sous forme de tube. b) Polarité d'un

microtubule avec une extrémité (+) polymérisant rapidement, et phénomène de catastrophes c'est-à-dire de
dépolymérisations brutales. (Adapté de Ross Lab) 45
Figure 12 – Régulateurs de l'actine : les Rho-GTPases : RhoA, Rac, Cdc42 et leurs effecteurs. (Adapté de (Bishop and Hall,
2000)
Figure 13 – Exemple de mécanotransduteurs : cil primaire, canaux ioniques, adhésion focales, jonctions adhérentes 56
Figure 14 – Schéma de l'activation des Intégrines. a) Hétérodimère formé à partir des sous unités transmembranaires α et
β sous forme courbé inactif. b) Activation des intégrines par sa liaison avec un ligand extracellulaire comme le
domaine RGD de la fibronectine : modèle Outside-In, ou par sa liaison dans le domaine cytoplasmique avec une
protéine partenaire activatrice telle que la taline : modèle Inside-Out. c) Activation complète des intégrines dès
lors sous sa forme complètement ouverte
Figure 15 – Schéma de cellule en migration. a) Dynamique des adhésions focales qui sont soient stables, soit se
dessassemblent pour s'assembler plus loin, soit augmentent de taille. b) Maturation des adhésions focales dans
un lamellipode avec la création de complexes focaux à l'avant et l'assemblage/désassemblage progressif en
fonction du front de migration
Figure 16 – Organisation moléculaire du complexe des adhésions focales. a) Les adhésions focales s'organisent en
nanodomaines 3D dont on peut distinguer plusieurs niveaux en z en fonction du recrutement des protéines. Dans
un lamellipode, à l'aval de l'adhésion focale on retrouve un fort flux rétrograde d'actine, un enrichissement en
paxilline et de fortes forces de traction exercées sur le substrat ; à l'aval les adhésions focales interagissent avec
les fibres de stress d'actine qui sont enrichies en protéines qui se lient à l'actine telles que l' α -actinine, la zyxine,
ou VASP, et ont un faible flux rétrograde d'actine et de plus faible force de traction. b) Modèle de formation et
maturation des intégrines avec l'activation du recrutement de la vinculine en fonction de la formation des
adhésions focales et au sein d'un complexe plus grand d'adhésion focale. (Issu de Case et al. 2015) 59
Figure 17 – Structure de la taline. En haut : représentation schématique ; en bas : modèle 3D de la taline défini à partir du
cristal et des données RMN. La taline est composée de différents domaines : domaine N-terminal FERM composé
de 4 sous domaines qui interagit avec les intégrines et FAK, puis de plusieurs domaines cylindriques R1-R13qui
présente des domaines VBS qui peuvent se lier à la vinculine. Notamment les domaines R1-R4 peuvent être en
configuration repliés et masquer ces domaines d'interaction avec la vinculine et s'ouvrir sous certaines conditions
quand la taline est activée (adapté David A. Calderwood et al. 2013)
Figure 18 – Structure de la paxilline et de ses différents domaines avec en N terminal 5 domaines riches en leucine (LD), et
en C terminal 4 domaines protéiques à doigt de zinc (LIM). Ces différents domaines interagissent avec différents
protéines et présentent de nombreux sites de phosphorylation qui modulent son affinité avec ses différents
partenaires (adapté de Brown et al.2004)
Figure 19 – a) Structure de la tyrosine kinase FAK et de ses différents domaine en N terminal son domaine FERM, puis son
domaine kinase, son domaine non structure et en C-terminal son domaine FAT. b) Schema de l'activation de FAK :
sous sa forme inactive FAK est en configuration ferme, une fois que ses domaines FAT et FERM sont lies a leur
partenaire, la kinase FAK s'ouvre et son domaine kinase peut alors autophosphoryler sa tyrosine Y397. Des lors le
à SAK el'austieure alue ace de activité luieure et de activité autorité de Mitre et al. 2005)
a FAK d'avoir une plus grande activite kinase et de se lier a p130cas (Adapte de Mitra et al. 2005) 61
Figure 20 – a) Structure des différents domaines de la vinculine. b) Modele 3D de la vinculine issu des donnees
cristallographiques. c) schema de l'activation de la vinculine dans sa configuration ouverte (adapte de Deivial et
al. 2004 et Bakolitsa et al. 2004)
Figure 21 – a) Schema de la structure des differents domaines des E-cadherines composée dans sa partie extracellulaires
de 5 ectodomaines, d'un domaine transmembranaire et d'une partie intracendiaire non structuree. D) schema des demaines extracellulaires de deux E cadhérines en interaction en configuration trans uniquement par les
demaines EC1 c) Différents modèles neur l'interaction entre les E cadhérines ; (i) configuration trans avec une
interaction par les domaines EC1 selon un modèle « strand dimer » selon un modèle « X dimer », ou par différents
domaines EC qui donnent lieu à une interaction par interdigitation · (ii) configuration cis avec une interaction
latérale des domaines EC1 et EC2 : (iii) formation des assemblages en cluster des E-cadhérines nar des interactions
cis et trans (adapté de Leckband and de Rooii 2014).
Figure 22 – a) Structure de la β -caténine avec en N-terminal le domaine régulant la dégradation de la β -caténine, en bleu
ciel le domaine d'interaction avec l' α -caténine et en bleu foncé les 12 domaines armadillo. b) Modèle 3D de la β -

caténine et de la queue cytoplasmique de la E-cadhérine, domaines armadillo en bleu foncé, en bleu clair domaine d'interaction avec l'a-caténine, et en multi-couleurs les 5 domaines de la queue de la E-cadhérine (Issu de Huber Figure 23 – a) Structure de l' α -caténine avec en N-terminal son domaine de liaison à la β -caténine et puis ces domaines repliées M1-2-3 et son domaine C-terminal pouvant se lier à l'actine. b) Modèle 3D de l' α -caténine issu des données cristallographiques (issu de Rangarajan and Izard, 2012 et de Ishiyama et al., 2013). c) Activation de l'αcaténine en conformation ouverte avec dépliement de ses domaines M1 à M3 permettant le recrutement de la vinculine (adapté de Leckband and de Rooij 2014)......67 Figure 24 – a) Représentation des structures 3D du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine à la membrane (issu de Takeichi 2014). b) Représentation schématique du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine lorsqu'il recrute ou non la vinculine (issu de Takeichi 2014). c) Organisation moléculaire du complexe des jonctions Figure 25 – a) Structure et organisation des complexes d'adhésion, à gauche : via les intégrines pour les adhésions focales, à droite : par les E-cadhérines pour les jonctions adhérentes. Leurs structures présentent une analogie d'organisation au niveau moléculaire et on peut diviser cette organisation avec 4 niveaux différents : les protéines transmembranaires, un niveau qui comprend les protéines pour la signalisation et l'établissement des complexes, un qui est composé des protéines permettant la transmission des forces et dont le comportement est forcedépendant, et le niveau recrutant toutes les protéines de la machinerie du cytosquelette d'actine. b) Ensemble des protéines communes aux deux complexes d'adhésion : jonctions adhérentes, et adhésions focales au niveau des kinases, des protéines adaptatrices, et des protéines qui interagissent avec le cytosquelette d'actine (adapté Figure 26 – Effet d'une force mécanique sur l'équilibre conformationnel d'une protéine. Une protéine peut avoir différentes configurations, et elle se trouve en majorité sous sa forme conformationnelle la plus stable qui correspond à une énergie minimale. Ici la protéine en conformation fermée en bleue est plus stable que sa conformation rouge et est donc majoritaire. L'application d'une force mécanique déplace les équilibres en stabilisant la conformation rouge dépliée. (Issu de Pruitt et al. 2014)......74 Figure 27 – Exemple du comportement qu'adoptent les liaisons entre deux protéines lorsqu'on les soumet à une force. On représente ici le temps de vie de la liaison en fonction de la force pour a) une liaison idéale : insensible à la force ; b) une liaison glissante « slip bond » dont l'application d'une force diminue le temps de vie de la liaison ; c) une liaison type « catch bond » dont l'application d'une force permet de stabiliser le temps de vie d'interaction entre Figure 28 - Exemples de protéines présentant un comportement de catch bond suite à l'application d'une force. Pour chaque complexe protéique : en haut : schéma de la protéine et de son ligand, milieu : système d'étude expérimental : flux, AFM, pinces optiques, bas : temps de vie d'interaction du complexe en fonction de la force. a) FimH : la protéine FimH soumise à des forces suite à l'application d'un flux présente une plus grande affinité pour son ligand le mannose (Issu de W. E. Thomas et al. 2002). b) Sélectine : la protéine d'adhésion P-sélectine présente une plus grande affinité pour son ligand PSGL-1 lorsque sa conformation est ouverte à la suite de l'application d'une force autour de 10pN (Issu de Marshall et al. 2003). c) Intégrines : les intégrines α 5 β 1, une fois liée à son ligand la fibronectine peut se déplier sous l'application d'une force (Issu de Kong et al. 2009). c) Ecadhérines : à gauche : la liaison du dimère X dimère des parties extracellulaires de la E-cadhérine se comporte comme un catch bond autour de 30pN (issu de Rakshit et al. 2012) ; à droite : le complexe E-cadhérinecyto/βcaténine/ α -caténine/F-actine est mis sous tension en appliquant une tension à l'actine par des pinces optiques et Figure 29 – Exemples de protéines dont l'application d'une force peut permettre de révéler de nouveaux sites de liaison à des protéines partenaires. Pour chaque complexe protéique : en haut : schéma de la structure de la protéine avec ou sans force (F) ; en bas : schéma du système d'étude expérimental. a) p130Cas : dépliement de la partie non structurée de p130Cas permettant de révéler 4 tyrosines pouvant être alors phosphorylées par la kinase Src (Issu de Sawada et al. 2006). b) Taline : l'application d'une force par l'utilisation de pinces magnétiques permet d'ouvrir les domaines R1-R2-R3-R4 de la taline et l'accrochage de la vinculine sur le domaine R3 (Issu de Yao et al. 2015). c) A-caténine : de même l'application d'une force par des pinces magnétiques sur l' α -caténine permet de changer la configuration de la protéine et lui permet de se lier à la vinculine par son domaine M1 dès lors révélé (Issu de

	Yao et al. 2014). d) ZO-1 : l'application d'une force avec une pince magnétique permet d'ouvrir la partie C-
	terminale de ZO-1 grâce à ses domaines non structures. (Issu de Spadaro et al., 2017)
Figure 3	0 – Exemples de protéines dont l'application d'une force peut permettre de modifier les propriétés catalytiques
	d'une enzyme. Pour chaque protéine : en haut : schéma de la structure de la protéine avec ou sans force (F) ; en
	bas : schéma du système d'étude théorique ou expérimental. a) FAK : d'après des simulations théoriques FAK
	peut s'ouvrir et donc s'autophosphoryler et s'activer sous l'application d'une force lorsque ses domaines FERM
	et FAT sont liés respectivement à la membrane et aux intégrines (Issu de Jing Zhou et al. 2015). b) Titine :
	l'application d'une force peut déplier la protéine et révéler dans son domaine kinase inhibé (Issu de Puchner et
	al. 2008). c) Myosin : l'application d'une force sur le moteur de myosin IC change son temps d'attachement moyen
	au filament d'actine et le rend plus immobile (Issu de Greenberg et al. 2012.) d) Formine : l'application d'une
	force par l'application d'un flux permet de modifier la processivité de la formine mDia1 et son taux d'élongation
	d'actine qui augmente avec la force (Issu de Jegou et al. 2013)
Figure 31	L – Exemple de l'ouverture de canaux ioniques a) par la déformation de la membrane directement après application
	d'une tension mécanique ; b) à la suite de l'application d'une force par le cytosquelette par exemple ; c) à la suite
	d'une force appliqué sur le canal à la fois par des protéines intermédiaires intra et extracellulaires ; d) à la suite
	de l'activation d'une protéine secondaire qui va jouer d'intermédiaire pour activer l'ouverture du canal. (Issu de
	Christensen and Corey 2007)
Figure 32	2 – Exemple de liaison non covalente sous l'application d'une force. a) pour des liaisons indépendantes b) pour un
	assemblage parallèle de liaisons dans un agrégat, qui sont liées entre elles
Figure 33	3 – La mécanotransduction à l'échelle de la cellule, de la sensation du signal mécanique extra-cellulaire (1) par les
	complexes protéiques mécanotransduteurs (2) qui vont pouvoir transmettre cette information mécanique en
	information biochimique, et activer des voies de signalisation biochimiques (3) dans la cellule, qui vont à leur tour
	pouvoir modifier l'expression génétique de la cellule et donc son comportement et son devenir (4)
Figure 34	4 – Activation d'une voie de signalisation qui va modifier le comportement de la cellule et pouvoir aller activer
U	certains gènes spécifiques.
Figure 3	5 – Index FRFT mesuré le senseur TSMod dans le cytoplasme, pour les cellules MDCK EcadTSMod et EcadTSModAC
- iguic of	au niveau des contacts cellule cellule et de la membrane libre (Adanté de Borghi et al. 2012)
Eiguro 20	au niveau des contacts cendre cendre et de la membrane noie. (Adapte de Bolgin et al. 2012)
Figure 50	s – a) index FRET mesure pour les centres MDCK écau Sivioù n'exprimant plus de de-caterine par sintiva, avec ou
	ishibiteur de le muerine II (25:00.001,7) eur contecte cellule et eu niveu de le membrene libre. b) A
	Infibiteur de la myosifie il (25µm ML-7) aux contacts cenule-cenule et au niveau de la membrane nore. D) A
	Gauche : Infages representatives de cendres sous ethement unhazial au niveau d'un contact cendre-cendre. A
	Droite : Index FRET mesure u niveau du contact et de la memorane libre lors de l'etirement. (Issu de Borgni et al.
	2012)
Figure 37	7 – Phosphorylations de la β-catenine. a) Structure cristallographique de la β-catenine avec ces 12 repetitions des
	domaines armadillo en jaune, du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine non structuré en rouge, et en vert de
	l' α -caténine. On peut voir que le premier domaine armadillo de la β -caténine change de conformation lorsqu'il
	interagit avec l'α-caténine. Les régions rouges en pointillées représentent les régions flexibles de la E-cadhérine.
	(Adapté de Huber and Weis 2001). b) Schéma de la structure de la β -caténine avec en violet la partie N-terminal
	de la β-caténine et ses serines et thréonines qui une fois phosphorylées conduisent à sa dégradation ; en vert les
	kinases Src, Abl, Fer, Fyn, cMet qui peuvent phosphoryler les tyrosines Y142 et Y654 de la β-caténine. La
	phosphorylation de Y142 diminue l'affinité de la β -caténine avec l' α -caténine, et la phosphorylation de Y654
	diminue l'affinité de la β-caténine avec la E-cadhérine91
Figure 38	B – Homéostasie de la β-caténine : la β-caténine est une protéine navette qui peut se localiser i) à la membrane en
	interagissant avec les E-cadhérine et pouvant être dégradée, ii) dans le cytoplasme où elle est synthétisée et est
	séquestrée par le complexe de dégradation Axine/APC, puis dégradée, iii) dans le noyau où elle interagit avec les
	facteurs de transcription TCF/LEF et où elle peut être dégradée
Figure 39	9 – Schéma hypothétique des différentes possibilités pouvant conduire à une activation de la voie de signalisation
	β-caténine : (1) par la régulation de la dégradation de la β-caténine ; (2a) par la régulation du niveau d'expression
	des E-cadhérines ou de la quantité de E-cadhérines présentes à la membrane ; (2b) par la modification post-
	traductionnelle des tyrosines de la β-caténine qui une fois phosphorylées diminue son affinité avec les E-
	cadhérines et l'a-caténine. La réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau des jonctions adhérentes peut
	potentiellement avoir un effet sur la libération de la β-caténine de la membrane en affectant plusieurs

mécanismes : le recyclage, les modifications post traductionnelles, mais aussi le regroupement en cluster, la Figure 40 – Représentation schématique de la voie de transduction du signal Wnt/ β -caténine (d'après Mosimann, Figure 41 – a) Transcription ectopique du gène Twist rapporté par le rapporteur twist-lacZ dans les embryons de Drosophile au stade 5 en réponse à la déformation du tissu dû à une compression globale de l'embryon. b) Accumulation nucléaire de la β-caténine (homologue de Armadillo chez la Drosophile) dans l'épithélium du blastoderme de Figure 42 – a) Marquage de la β -caténine dans les embryons de Drosophile au stade 5 où elle est principalement membranaire, puis au stade 7 après extension du feuillet où on la retrouve au noyau. Lorsque l'embryon est ablaté et qu'il n'y a plus d'extension, aucun marquage nucléaire de la β-caténine n'est observé. Lorsque l'embryon est ablaté et on applique une force avec un fluide magnétique, le marquage nucléaire de la β-caténine est de nouveau présent. Ce marquage n'est plus observé dans les embryons siRNA Src. Le niveau de β-caténine nucléaire dans les 4 conditions est représenté sur le graphe de droite. b) Marquage de la β -caténine dans l'embryon de poisson zèbre au stade sphérique de la blastula où la β-caténine est principalement membranaire, et puis au stade suivant où la β-caténine se trouve au noyau. Lorsque ce stade est traité avec de la blebbistatine, la β-caténine n'est plus présente dans le noyau. Le marquage peut être retrouvé chez les embryons traités avec la blebbistatine et stimulé magnétiquement avec des billes. Le marquage est cependant perdu lorsque l'embryon est traité avec un inhibiteur de Src. Le niveau de β-caténine nucléaire dans les 4 conditions est représenté sur le graphe de droite. c) Marquage de la β-caténine phosphorylée en Y667 au stade 5 avec ou sans compression magnétique dans les embryons normaux ou siRNA pour Src. d) Marquage de la β-caténine phosphorylée en Y667 dans l'embryon de poisson zèbre avant et après déformation de la blastula, dans la blastula traitée avec la blebbistatine avec ou sans stimulation magnétique, avec ou sans inhibiteur de Src. (Adapté de Desprat et al. 2008 et Brunet et al. 2013.) **Figure 43** – a) Exemple de l'accumulation de la β -caténine dans les cellules MSC en culture après 3 jours d'application d'étirement. (Issu de Ben Sen et al. 2008). b) A droite : marquage par immunofluorescence de la β -caténine dans les cellules MC3T3-E1 ostéoblastes après 1 heure en condition statique et 1 heure sous un flux FSS laminaire de 10dynes/cm². A gauche : Rapporteur de l'activité de transcription de la β-caténine avec ou sans flux FSS grâce au Figure 44 – a) Images représentatives de la localisation de β-caténine-GFP (en haut) et de TOPdGFP (bas) avec ou sans étirement de 15% de la monocouche pendant 16 heures. (Issu de Benham-Pyle et al. 2015) b) Images représentatives de la localisation de β-caténine-GFP, de la β-caténine phosphorylée en Y654 avec ou sans inhibiteur de Src, avec ou sans étirement de 15% pendant 8 heures. (Adapté de Benham-Pyle et al. 2016).... 105 Figure 46 – Cellules MDCK en migration a) sous HGF et b) lors de la migration collective de l'épithélium après libération d'une nouvelle surface. Insert Zoom : apparition de cellule leader (rouge). Echelle = HGF 20µm / Blessure 100µm. Figure 47 – a) Schéma d'une blessure avec un cône de pipette en mode « scratch ». b) Schéma d'une blessure par libération d'espace libre avec un stamp de PDMS ou de silicone. Exemple : chambre 2 puits Ibidi...... 114 Figure 48 - Représentation schématique théorique d'une expérience typique de FRAP. A t=0 la fluorescence de la zone d'intérêt est photoblanchie, le retour de fluorescence dû aux mouvements des molécules toujours fluorescentes Figure 49 – Exemple d'expérience de FRAP sur la E-cadhérine GFP à la membrane au niveau d'un contact cellule-cellule. a) Images représentatives d'un îlot de cellules E-cadhérine GFP au cours d'une acquisition lors d'une expérience de FRAP avec en bleu les zones photoblanchies, en jaune la zone de référence non photoblanchie, et en rose le fond de fluorescence. b) Intensité de retour de fluorescence normalisée à 1 pour avant le FRAP pour 20 différents contacts au cours du temps. En rouge foncée : fit et SEM issu de l'ajustement de l'ensemble des différentes courbes avec un modèle mono-exponentiel. Echelle=20µm. 117 Figure 50 – Photoconversion avec le fluorophore mMaple. a) Haut : Structure de mMaple avant et après photoconversion dans son êtat vert et puis rouge. Spectres d'excitation (poitillé) et d'émission (plein) de mMaple en vert avant photoconversion et en rouge après photoconvertion. Adapté de A L. McEvoy et al. 2012 b) Images représentatives

de la β -catenine mMaple avant photoconversion (panel du haut) et apres photoconversion avec le laser 405nm au niveau des contacts de deux cellules (panel du has). Echelle=20um
au niveau des contacts de deux cendres (paner du das). Echene-20μm.
Figure 51 – Mesure du ratio des intensites d'emission du donneur et de l'accepteur grace a un detecteur spectral par
Exemple après dile excitation du donneur en continue.
Figure 52 – Resume des differentes constructions utiles. a) Le senseur insere dans la proteine d'interet. b) Constructions
controles Zero Force : avec le senseur seul, le senseur dans une proteine tronquee ou mute, ou en C ou N terminus
de la protéine qui n'est plus sous tension. c) Construction contrôle pour la fonctionnalité de la protéine et du
senseur : protéine avec juste le fluorophore accepteur ou donneur 122
Figure 53 - Calibration des senseurs de force FRET. a) avec l'hybridation d'un brin d'ADN qui exerce sur le senseur entre 5-
7pN. b) avec des pinces optiques en exerçant de manière cyclique des forces allant de 0 à 20 pN. c) Schémas
théoriques de l'efficacité FRET en fonction de la distance des fluorophores où R06 ~ $n-4Jk$ f $\kappa^2\tau$ 0 et de la distance
en fonction de la force pour un ressort de rigidité connue, la combinaison des deux donnant la courbe de
calibration entre la force et l'efficacité FRET
Figure 54 – a) Schéma du montage avec le senseur TSMod purifié avec deux fluorochromes organiques dont une extrémité
est reliée d'une part à une surface, et de l'autre à une bille pour la caractérisation spectroscopique en molécules
uniques, b) Mesures individuelles lors des cycles d'étirement et de relâchement de l'intensité de Cy3 et Cy5 pour
TSMod25_TSMod40 et TSMod50_c) Courbe d'extension en fonction de la force montrant que TSMod se comporte
comme un ressort linéaire d) Efficacité ERET en fonction de la force appliquée pour TSMod25. TSMod40 et
TSMadE0 (Adaptá da Drannar et al. 2016/Drannar et al. 2016))
Firms EE a) Calibration antra la fama at l'afficacité EEET a un la constant (400 c). UD25 et UD25 et UD25 et l'Afficacité de
Figure 55 – a) Calibration entre la force et l'efficacité FRET pour le senseur l'Siviod (40aa), HP35 et HP35st. b) sensibilité des
senseurs TSMod, HP35, et HP35st en fonction de la force. (Adapté de (Freikamp et al., 2015)) 124
Figure 56 – a) A gauche : Image représentative des cellules MDCK exprimant la construction EcadTSMod. A droite : Spectre
d'émission de EcadTSMod pour une excitation à 458nm avec le pic d'émission de la mTFP1 autour de 495nm et
celui de la EYFP autour de 530nm. b) Image de EcadTSMod∆EYFP et spectre d'émission correspondant c) Image
de EcadTSMod Δ TFP et spectre d'émission correspondant pour une excitation à 521nm. Echelle=20 μ m 125
Figure 57 – a) Images représentatives des cellules MDCK exprimant la construction EcadTSMod (en haut) et EcadTSMod Δ C
(en bas) b) Carte d'index FRET calculée grâce au plugin PixFRET pour EcadTSMod (haut) avec des jonctions cellules-
cellules plutôt orange correspondant à un index FRET de 46 et EcadTSMod∆C (bas) avec des jonctions plus claire
représentant un index FRET autour de 55. c) Moyenne de l'index FRET mesuré pour environ 300 contacts pour
des cellules confluentes pour EcadTSMod et EcadTSMod∆C
Figure 58 – a) Images représentatives des cellules MDCK exprimant la construction TRAF (haut) et 5aa (bas) b) Spectre
d'émission de TRAF (haut) et 5aa (bas) pour une excitation à 458nm. c) Carte d'index FRET calculée grâce au plugin
PixFRET pour TRAF (haut) et 5aa (bas), d) Courbe de calibration de l'index FRET en efficacité FRET grâce aux
standards d'efficacité ERET conques 5aa (55) et TRAE (11)
Figure 59 – Calibration de la force à partir de la mesure de l'efficacité ERET nour TSMod. Courbe de calibration
avrézimentele de la calibration entre l'efficacité EDET et la force adontées de Cracheff et al. 2010
experimentale de la calibration entre l'efficacité FRET et la force adaptées de Grashoff et al. 2010
Figure 60 – Principe de fonctionnement et structure du rapporteur TOPdGFP et image typique des cellules MDCK TOPdGFP
en ilots. Echelle=20μm
Figure 61 – Fonctionnement général d'un biosenseur tyrosine kinase basé sur le FRET, composé d'un substrat spécifique de
la kinase, de deux fluorophores un donneur et un accepteur et d'un domaine SH2. Quand le substrat est
phosphorylé par la kinase active, le domaine SH2 reconnait la tyrosine phosphorylé et se lie au substrat. Ce
changement de configuration intramoléculaire conduit à une diminution du transfert FRET entre les deux
fluorophores. a) Biosenseur FRET de l'activité kinase de Src, séquence substrat de Src (WMEDYDYVHLQG). b)
Biosenseur FRET de l'activité kinase de FAK, séquence substrat de FAK (ETDDYAEIIDE). Echelle=20µm 129
Figure 62 – Stratégie d'adressage à la membrane des biosenseurs d'activité kinase grâce au tag Lyn qui s'ancre dans les
radeaux lipidiques ou au tag Kras à l'extérieur de ces domaines. (Illustration de Seong et al. 2011)
Figure 63 – a) Image et spectre d'émission représentatif des cellules MDCK Kras-Src Senseur avec ECFP/YPet issu de Na et
al. 2008, b) Image et spectre d'émission représentatif des cellules MDCK Kras-Src Senseur avec mTFP1/YPet
modifié et utilisé dans ce travail de thèse. Echelle=10um
Figure 64 $=$ a) A droite : représentation schématique du bioconsour EDET Vras fre muté dans la séquence substration
Y662F/Y664F→ FF et donc non phosphorylable par Src. A gauche : Index FRET mesuré pour le biosenseur Kras-Src

- Figure 66 a) Index FRET mesuré pour les cellules MDCK EcadTSMod lors de leur migration collective après blessure de la monocouhe, en fonction de la distance au bord du front de migration. Insert : Profil typique d'index FRET sur la même distance entre l'avant et l'arrière du front de migration. b) Index FRET mesuré sur les EcadTSMod à l'arrière du front de migration. b) Index FRET mesuré sur les EcadTSMod à l'arrière du front de migration. b) Index FRET mesuré sur les EcadTSMod à l'arrière du front de migration (~500µm) et à l'avant dans des cellules leaders après 10 heures de migration. c) Top : schéma de la construction EcadTSModΔC tronquée en C terminale et qui ne peut pas recruter le cytosquelette d'actine. Bas : Index FRET mesuré sur les EcadTSModΔC à l'arrière du front de migration (~500µm) et à l'avant dans des cellules leaders après 10 heures de migration. 140
- Figure 67 a) Profil typique d'index FRET au cours de la migration de monocouche. b) Index FRET mesuré pour les cellules EcadTSMod dans les cellules leaders et des cellules plus à l'arrière lors de la migration collective de l'épithélium. 'Contact' marque le moment où les deux fronts de migration de la blessure se rejoignent. Echelle=100μm... 141

- Figure 75 a) Localisation de la β -caténine photoconvertible mMaple en fonction du temps dans les cellules après 4 heures de traitement avec HGF. Les pointillés délimitent la zone photoconvertie avec le laser 405nm au niveau des

contacts à t=0. La flèche indique l'accumulation nucléaire de la β-caténine mMaple photooncvertie en rouge à la membrane à t=0 après 10 minutes. b) B-caténine photoconvertie dans le noyau en fonction du temps (intensité du canal rouge au temps t sur l'intensité rouge photoconvertie à t=0 pour des cellules leaders, des cellules stimulées 4 heures avec HGF ou sans (contrôle). c) Localisation de la β-caténine photoconvertible mMaple en fonction du temps dans les cellules leaders après 5 heures de migration. Les pointillés délimitent la zone photoconvertie avec le laser 405nm au niveau du lamellipode à t=0. La flèche indique l'accumulation nucléaire de la β -caténine mMaple photoconvertie en rouge à la membrane à t=0 après 20 minutes. d) Fraction de β -caténine mMaple photoconvertie à t=0 dans le noyau après t=10 min dans les cellules non stimulées, 4 heures après ajout d'HGF et dans les cellules leaders. Echelle=20µm (HGF) et 100µm (leaders). 148 Figure 76 – a) Gauche : Déclin de fluorescence après photoconversion de la β -caténine mMaple dans le lamellipode de cellules leaders en migration. Droite : moyenne du temps de demi-déclin représentatif du temps caractéristique de sortie de la β-caténine du lamellipode. b) Gauche : Retour de fluorescence après FRAP de la β-caténine GFP, de la E-cadhérine GFP au lamellipode de cellules leaders, ainsi que de la GFP seule cytoplasmique, et de la βcaténine GFP cytoplasmique (sous LiCl). Droite : moyenne des temps de demi-retour représentatif, pour la βcaténine GFP et la E-cadhérine GFP ce temps est caractéristique de l'entrée dans le lamellipode......149 Figure 77 – Modèle cinétique de la β -caténine avec trois compartiments : membrane, cytoplasme, et noyau. Les flèches représentent les échanges entre compartiments, la synthèse et la dégradation de la β-caténine avec leur taux correspondant (k) et les constantes d'équilibre thermodynamique (K) lorsqu'elles peuvent être définies. 150 Figure 78 – A gauche : Images représentatives du retour de fluorescence de la β-caténine GFP au niveau de la cellule entière après photoblanchissement des cellules non stimulées. A droite: Fraction de β-caténine GFP de retour après le FRAP au cours du temps pour des cellules non stimulées et stimulées pendant 4 heures avec HGF. Echelle= 20µm. Figure 79 – Intensité totale de EYFP de EcadTSMod normalisée pour chaque cellule par son niveau initial au cours du temps Figure 80 – a) Haut: Images représentatives du déclin de fluorescence de la β-caténine mMaple photoconvertie en rouge à t=0 pour toutes les cellules au cours du temps. Bas : Déclin de fluorescence de la β-caténine mMaple photoconvertie en rouge au cours du temps pour les cellules non stimulées, stimulées avec HGF pendant 4 heures, les cellules leaders ou à l'arrière du front de migration. b) Moyenne du temps de demi déclin t1/2 caractéristique du taux de dégradation en fonction des différentes conditions. c) Moyenne du temps de demi déclin t1/2 caractéristique du taux de dégradation pour les mêmes conditions cellules non stimulées en ilot ou confluent avec Figure 81 – a) Retour de fluorescence de la β -caténine GFP membranaire après photoblanchiment pour des cellules non stimulées ou stimulées 4 heures avec HGF. b) Déclin de fluorescence de la β-caténine mMaple membranaire après photoconvertion en rouge pour des cellules non stimulées ou stimulées 4 heures avec HGF. c) Temps caractéristique de demi retour (tin) et demi déclin (tout) pour la β-caténine GFP et mMaple avec et sans HGF. Figure 82 – a) Retour de fluorescence de la β-caténine GFP (bleu) et de la E-cadhérine GFP (rose) après photoblanchiment au niveau d'un contact cellule-cellule ou au niveau du lamellipode pour une cellule leader. b) Temps caractéristique t1/2 en fonction du % de fraction mobile issus du fit des courbes de retour de fluorescence, pour les différentes conditions : la β-caténine GFP et la E-cadhérine GFP au niveau d'un contact cellule-cellule à confluence (HD) ou en ilots (LD), de la membrane basale, du lamellipode des cellules leaders, ainsi que de la β -Figure 83 – Modèle cinétique de la β -caténine tenant compte des évènements d'endo-exocytose. Les flèches représentent les échanges entre compartiments, la synthèse et la dégradation de la β-caténine avec leur taux correspondant (k) et les constantes d'équilibre thermodynamique (K) lorsqu'elles peuvent être définies. B, N, M et C représentent respectivement les concentrations de la β -caténine libre dans le cytoplasme, dans le noyau, du complexe β caténine/E-cadhérine à la membrane, et dans le cytoplasme......157 Figure 84 – a) Cellules MDCK β-caténine GFP traitées 5 heures avec LiCl (30mM). b) Localisation de la β-caténine

photoconvertible mMaple en fonction du temps dans les cellules après 5 heures de traitement avec LiCl. Les pointillés délimitent la zone photoconvertie avec le laser 405nm au niveau des contacts à t=0. c) Fraction de βcaténine mMaple photooconvertie initialement à la membrane dans le noyau après 10 minutes pour les cellules

non stimulées, stimulées 4 heures avec HGF, 5 heures avec LiCl, et des cellules leaders. d) Changement d'index Figure 85 – a) Images représentatives de la β -caténine GFP dans les cellules traitées avec ou sans HGF (50ng/ml) et PP1 (25µM). b) Intensité de la β-caténine GFP dans le noyau comparé au cytoplasme après 5 heures de stimulation avec ou sans HGF et PP1. c) Changement d'index FRET mesuré après 5 heures pour les cellules EcadTSMod avec Figure 86 – a) Top : Images représentatives de la localisation de la β-caténine GFP lors de la migration d'une monocouche de cellules après blessure avec ou sans PP1 (75µM) à t=0 ou t=6heures. Bas : vitesse de migration (distance moyenne parcourue par le front de migration en 1h) avec ou sans PP1 (75µM). b) Intensité de GFP présente dans le noyau après 5 heures de migration pour les cellules leaders ou au front en l'absence de leaders avec PP1 et à l'arrière avec ou sans PP1. c) Index FRET des cellules EcadTSMod mesuré pour des cellules leaders ou à défaut au front de migration avec PP1 et à l'arrière avec ou sans PP1. Échelle=100µm. 162 Figure 87 – a) Vitesse de migration (distance moyenne parcourue par le front de migration en 1h) avec ou sans PP1 à 75μM ou à 25μ M. b) Images représentatives de la localisation de la β -caténine GFP lors de la migration d'une monocouche de cellules après blessure avec ou sans PP1 (25µM) à t=0 ou t=6heures. c) Index FRET des cellules EcadTSMod traitées avec PP1 (25µM) lors de la migration collective des cellules pendant 18 heures. En noir : cellules à l'arrière du front de migration ; rouge : cellules au front au début quand la monocouche avance peu, et qui deviennent des leaders par la suite. Échelle=100µm......162 Figure 88 – a) Structure de Src comprenant en N terminal un domaine d'interaction avec la membrane, puis un domaine SH3, puis un domaine SH2, un domaine kinase, et enfin une queue en C terminale permettant de réguler l'activité kinase. b) A gauche conformation fermée inactive de la kinase ; A droite : conformation ouvert et active de Src. Figure 89 – Western blot typique du lysat de cellules MDCK stimulées ou non avec HGF après 5, 15, 30 minutes, 1, 2, 4, ou 6 heures et révélé pour Src total, la forme active de Src phosphorylée en Y419, et GAPDH (ici marqueur de la Figure 90 – a) Schéma du biosenseur FRET d'activité kinase Kras-Src. Plus il y a d'activité, plus le FRET est bas. b) Index FRET mesuré par le senseur Kras-Src dans les cellules non stimulées, stimulées 1 heure avec HGF, ou avec PP1, transfectées avec un mutant constitutivement actif de Src (Src Y530F mCherry) et stimulées plus de 10 heures Figure 91 – Index FRET mesuré pour les cellules MDCK Kras-Src, après 15 heures de migration collective, dans les cellules leaders, et les cellules à l'arrière du front de migration (point gris). Ces mêmes cellules leaders ou à l'arrière sont ensuite traitées 10 minutes sous 25µM de PP1 (point bleu). Index FRET mesuré pour les cellules MDCK Kras-Src YY-FF, senseur inactif de Src, après 15 heures de migration après blessure, dans les cellules leaders, et les cellules Figure 92 – a) Western Blot typique du lysat de cellules MDCK stimulées ou non avec HGF (5h), PP1 (5h) ou incubées 1 heure avec 50 μ M de Na3VO4 (V), révélé pour la β -caténine totale, sa forme phosphorylée Y654, et l' α -tubuline comme marqueur de charge. b) Niveau de phosphorylation pour la β-caténine en Y654 normalisé par rapport à la quantité totale de β -caténine pour les cellules traitées en a). c) Western Blot typique du lysat de cellules MDCK, MDCK β-caténine GFP, MDCK β-caténine GFP Y654E, et MDCK β-caténine GFP Y654F, révélé pour la β-caténine totale, sa forme phosphorylée Y654. En pointillés jaunes : bandes correspondants à la β -caténine GFP Y654E et Y654F qui ne peuvent pas être reconnues par l'anticorps spécifique de phosphorylation de la β -caténine en Y654. Figure 93 – a) Western blot typique des cellules MDCK β-caténine GFP, stimulées ou non avec HGF (5h), PP1 (5h), après immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP, révélé pour la β-caténine totale et les tyrosines phosphorylées. . b) Niveau de phosphorylations pour la β -caténine GFP normalisé par rapport à la quantité totale de β -caténine GFP pour les cellules traitées en a)......168 Figure 94 – a) Images représentatives de la β-caténine GFP pour les mutants Y654E (haut) et Y654F (bas) dans les cellules sans HGF et avec HGF. Les flèches soulignent la localisation à la membrane des mutants dans les conditions contrôles sans stimulation. Les étoiles indiquent la localisation nucléaire des mutants de β-caténine sous HGF. b)

Intensité de fluorescence de la GFP mesurée dans le noyau pour les cellules WT, β -caténine GFP Y654F et Y654E après 7 heures de stimulation avec ou sans HGF. c) Images représentatives de la β -caténine GFP pour les mutants

241

Y654E (à gauche) et Y654F (à droite) dans les cellules après 5 heures de migration collective. Echelle=20μm (H0	βF)
Echelle=100μm (Blessure)	69
Figure 95 - Temps caractéristique t1/2 en fonction du % de fraction mobile issus du fit des courbes de retour	de
fluorescence, pour les différentes conditions : la β -caténine GFP au niveau d'un contact cellule-cellule à bas	sse
densité avec ou sans HGF, de la membrane basale, de la eta -caténine GFP Y654F avec ou sans HGF, de la eta -catén	ne
GFP Y654E avec ou sans HGF, ainsi que la GFP libre1	70
Figure 96 – a) A droite : Schéma de la construction du mutant EcadTSMod avec la mutation Y754-755-756->FFF. A Gauch	e :
Image typique des cellules EcadTSMod YYY→FFF. b) Changement d'index FRET après 5 heures de stimulation a	/ec
ou sans HGF pour les cellules EcadTSMod YYY→FFF. c) Index FRET mesuré dans les cellules leaders et dans	les
cellules à l'arrière du front de migration 1	71
Figure 97 – a) Image représentative de la localisation de Src Y530F mCherry et FAK GFP. En jaune les images superposé	es
indiquent la colocalisation des deux protéines. b) Exemple de cellules transfectées avec Src Y530F mCherry. I	_es
flèches indiquent certains contacts dissociés formant des trous. Echelle=10µm 1	72
Figure 98 – a) Top: Cellules EcadTSMod transfectées avec Src Y530F mCherry. Les flèches indiquent les protrusions. Ba	as :
Cellules β-caténine GFP transfectées avec Src Y530F mCherry. Les étoiles indiquent l'accumulation nucléaire de	e la
β-caténine. b) Index FRET mesuré pour des cellules EcadTSMod transfectées ou non avec Src Y530F mCherry	. c)
Intensité de GFP mesuré dans le noyau des cellules β-caténine GFP transfectées ou non avec Src Y530F mCher	ry.
Echelle=20μm	72
Figure 99 – a) Schéma du biosenseur FRET d'activité kinase Lyn-FAK. Plus il y a d'activité, plus le FRET est bas. b) Index FR	ET
mesuré par le senseur Lyn-FAK dans les cellules non stimulées, stimulées 1 heure avec HGF (50ng/ml), avec P	Ρ1
(25μM) et PF228 (10μM). Echelle=20μm1	73
Figure 100 – Index FRET mesuré par le senseur Lyn-FAK dans les cellules après 15 heures de migration après blessure de	: la
monocouche pour les cellules leaders du front, et les cellules à l'arrière du front de migration avec ou sans PF2	28
(10µM)	74
Figure 101 – a) Top: Schéma de la structure de FAK et des sites tyrosine. Bas : Western Blot typique du lysat de cellu	les
stimulées ou non avec HGF (3h) avec ou non PP1 et PF228 révélé pour FAK total, les formes phosphorylées	de
FAK Y397, FAK Y576-577 et FAK Y861. b) Niveau de phosphorylation pour FAK Y397, Y576-577 et Y861 normal	isé
par rapport à la quantité totale de FAK pour les cellules traitées en a)	75
Figure 102 – a) Images représentatives de la β -caténine GFP dans les cellules traitées avec ou sans HGF (50ng/ml) et PF2	28
(10 μ M). b) Intensité de la eta -caténine GFP dans le noyau comparé au cytoplasme après 5 heures de stimulati	on
avec ou sans HGF et PF228. c) Changement d'index FRET mesuré après 5 heures pour les cellules EcadTSMod av	/ec
ou sans HGF et PF228. d) A gauche : Images représentatives de la localisation de la β -caténine GFP lors de	la
migration d'une monocouche de cellules après blessure avec ou sans PF228 (10μM) à t=0 ou t=6heures. A droit	e :
vitesse de migration (distance moyenne parcourue par le front de migration en 1h) avec ou sans PF2	28.
Echelle=20μm	76
Figure 103 – a) Cellules MDCK FAK GFP traitées 4 heures avec ou sans HGF, ou HGF et PP1 ou HGF et PF228, et marqué	es
pour avec la phalloïdine à 550nm. b) Exemple de cellules MDCK FAK GFP traitées 4 heures avec HGF et marqué	es
pour avec la phalloïdine à 550nm. c) Quantification des fibres de stress par cellules en fonctions des conditic	ns
de a). Echelle=20µm	78
Figure 104 – a) Cellules MDCK stimulées 3-4 heures avec HGF, marquées avec la phalloidine (550nm), la pMLC (488nm)	et
la β-caténine (650nm). Les flèches sur les images superposées de l'actine (rouge) et la pMLC (vert) et les conta	cts
(magenta) indiquent les fibres d'actine réorganisées en étoile. b) Quantification du pourcentage de cellu	les
comprenant ces structures riches en actine et pMLC pour des cellules avec ou sans HGF, HGF et PP1, HGF et PF2;	28,
ainsi que des cellules leaders et des cellules plus à l'arrière du front de migration. c) Cellules MDCK avec à l'ava	ant
une cellule leader, marquees avec la phalloidine (550nm), la pMLC (488nm) et la β-catenine (650nm). La flec	he
sur les images superposees de l'actine (rouge) et la pMLC (vert) et les contacts (magenta) indique les fibi	es
d'actine réorganisées en étoile. Echelle=20μm	/8
Figure 105 – a) Cellules MDCK stimulees 3-4 heures avec ou sans HGF, HGF et PP1 et HGF et PF228 et marquées avec	la
prialioidine (550nm), la pivile (488nm) et la p-catenine (650nm). b) Quantification de la densite de pMLC au nive	au
uu contex de la memorane (C) et au niveau des hores de stress (S) pour les dimerentes conditions montrees en	а). 70
Ecneile=20μm	79
- Figure 109 a) Principe des « tugging forces » ou forces de traction intercellulaire : en haut : principe illustré par un tir à la corde ; au milieu : appliqué pour une paire de cellules ; en bas au sein d'un ilot de cellules (adapté de Style et al.2014) ; b) Exemple de migration collective d'un large ilot de cellules MDCK : i) forces de traction (plein : traction normal ; vide : traction parallèle) exercées sur le substrat en fonction de la distance au bord, ii) tension intercellulaire dans la monocouche déduite de l'équilibre des forces de traction sur le substrat en fonction de la distance au bord (issu de Trepat et al., 2009).
- Figure 111 a) Modèle issu de simulation pour l'ouverture de FAK suite à l'application d'une tension après la liaison du domaine FERM à PIP2 à la membrane et du domaine FAT au cytosquelette (Issu de Zhou et al. 2015). b) Modèle de l'activation de FAK par sa liaison avec le récepteur cMet. Suite à la liaison du domaine FERM de FAK à la membrane avec PIP2 et/ou à la queue cytoplasmique de cMet activé par HGF, grâce à son domaine chargé positivement KAKTLRK dans son domaine FERM. cMet phosphoryle la tyrosine 194 du domaine FERM de FAK, ce domaine alors chargé négativement va interagir avec le domaine chargé positivement du domaine FERM, et l'autophosphorylation de Y397. Ensuite, Src peut reconnaitre grâce à son SH2 la tyrosine Y397 phosphorylée et complètement activer FAK en le phosphorylant sur ses kinases 576/577. (Issu de Chen et al. 2011). c) Modèle de l'activation de FAK par les intégrines. FAK est activé grâce à sa liaison avec PIP2 (noté PtdIns(4,5)P2 dans ce schéma) qui est enrichi à la membrane grâce à la kinase PIP5K (notée PtdIns(4)P5KIY sur le schéma). L'étape 1 consiste à l'activation des intégrines par la taline, puis le domaine FAK s'associe avec la taline, et le domaine FERM de FAK se lie aux PIP2 enrichis à la membrane. (Issu de FAK s'associe avec la taline, et le domaine FERM de FAK se lie aux PIP2 enrichis à la membrane. (Issu de FAT de FAK s'associe avec la taline, et le domaine FERM de FAK se lie aux PIP2 enrichis à la membrane. (Issu de FAT de FAK s'associe avec la taline, et le domaine FERM de FAK se lie aux PIP2 enrichis à la membrane. (Issu de Frame et al. 2010).

Figure 113 – a) i) En haut : Images représentatives des cellules MDCK traitées avec HGF pendant 2h et marquées pour la Ecadhérine (bleu), la myosine IIA (rouge) et l'actine (vert). En bas : Quantification du ratio moyen entre l'actine colocalisant avec le signal E-cadhérine à la membrane, et le signal total de l'actine dans la cellule pour différents temps après ajout de HGF. ii) Fluorescence de l'actine GFP au cours du temps après ajout de HGF. La flèche pleine montre un enrichissement ponctuel en actine. Les parenthèses montrent la dissociation en plusieurs filaments d'actine après 1h51min avec HGF. (Issu de Sperry et al. 2010). b) i) En haut : Images représentatives des cellules Caco-2 traitées avec HGF pendant 15 minutes, et marquées pour la Myosine VI et l'actine. En bas : quantification du ratio entre la myosine VI et les E-cadhérines à la membrane avec et sans HGF. ii) Kymographe du marquage avec LifeAct de l'actine à un contact pour des cellules avec ou sans HGF. (Issu de Mangold et al. 2011)...... 202 Figure 115 – a) Montage expérimental de spectroscopie de force avec des pinces magnétique appliquant une force contrôlée aux billes magnétique en fonction de la distance de l'aimant à la surface i) Exemple de la distribution des temps de vie en fonction de la force à la manière d'un catch bond dont l'interaction du complexe est plus grande sous une force donnée que sans force. ii) Orientation du complexe, avec à la surface de verre la queue cytoplasmique de la E-cadhérine (rose), la β-caténine (bleu) biotinylée accrochée à une bille magnétique fonctionnalisée avec la streptavidine (verte). b) Exemple de différentes billes magnétiques de diamètre 1 µm dans Figure 116 – Construction des plasmides pLIS-HMK à exprimer dans les bactéries codant pour a) une protéine de 63kDa avec la queue cytoplasmique de la E-cadhérine de 18kDa fusionnée en amont aux séquences avec la tag His6x, puis le MBP, puis la séquence de clivage TEV, puis une cystéine, puis l'AviTag ; b) une protéine de 132kDa avec la β-caténine de 90kDa et en amont les séguences des tag His6x, MBP, la séguence de clivage TEV, puis l'AviTag. Figure 117 – a) Stratégie de purification des protéines. b) Gel révélé au Coomassie avec dans le premier puit le marqueur (M), ensuite le lysat de bactéries après induction 3h $a37^{\circ}$ C avec 0.5M d'IPTG pour la construction avec la β caténine, puis celle pour la E-cadhérine, puis après récupération des fractions d'élution à la suite de la première purification sur billes Ni-NTA, dialyse et concentration de MBP-TEV-AviTag-β-caténine et MBP-TEV -Cys -E-Figure 118 – a) Principe de la digestion avec l'enzyme TEV. b) Gel révélé au Coomassie pour la β-caténine avec dans le premier puit le marqueur (M), ensuite His-MBP-TEV-AviTag- β -caténine après la première purification de la Figure précédente, ensuite cette construction avec l'enzyme TEV : on retrouve la construction non digéré, la β-caténine seule, et le fragment his-MBP, et l'enzyme TEV, le dernier puit représente ce qui est obtenu après passage sur les billes Ni-NTA avec la β-caténine seule purifiée. c) Même principe pour la construction His-MBP-TEV-Cis-Ecad, avec le marqueur, la construction His-MBP-TEV-Cis-Ecad, la construction His-MBP-TEV-Cis-Ecad digérée avec la TEV et on ne voit pas de bandes pour la E-cadhérine seule à 18 kDa, le dernier puit représente ce qui est obtenu après Figure 119 – Illustration de la fonctionnalisation et de l'orientation de la E-cadhérine. La surface de verre avec du SigmaCote est fonctionnalisée avec des anticorps anti-DIG adsorbées à la surface, puis un brin d'ADN permettant de nous affranchir des interactions avec la surface, ensuite un oligo A1 dont l'extrémité 3' est fonctionnalisée avec une base comportant une domaine avec 6 carbones terminés par la fonction amine NH2. Ce NH2 permet la liaison avec le NHS-Maléimide, la fonction maléimide permet, elle, de créer une liaison covalente avec l'unique cystéine Figure 120 – a) Billes Streptavidine de 1µm restant liées après lavages à la surface de verre avec les queues de E-cadhérines adsorbées sur le SigmaCote passivé avec de la BSA. b) Billes Streptavidine de 1μm fonctionnalisées avec la βcaténine biotinylée liée aux queues de E-cadhérines adsorbées sur le SigmaCote passivé avec de la BSA. Plus de Figure 121 - a) Schéma des constructions FAKTSMod, FAKTSMod mutant et FRNK TSMod. b) Image représentative des Figure 122 – a) Index FRET mesuré pour différentes adhésions focales dans une cellule pour les cellules MDCK exprimant la construction FAKTSMod, FAKTSMod mutant et FRNK. b) Index FRET mesuré pour différentes adhésions focales dans les cellules leaders à l'avant du front de migration, et les cellules à l'arrière. c) Index FRET mesuré pour différentes adhésions focales dans les cellules sous 100ng/µL d'HGF..... 215

Figure 123 - a) Exemple de cellules MDCK exprimant la construction VinTSMod : en haut au niveau des adhésions focales, en bas : pour des cellules confluentes au niveau des contacts. b) Index FRET mesuré dans les cellules MDCK VinTSMod (rond clair) et VinTL (triangle foncé) au niveau des adhésions focales pour des cellules à basse densité en ilot, et des cellules confluentes, et au niveau des jonctions adhérentes (bleu) pour des cellules à confluence. c) Index FRET mesuré dans les cellules MDCK VinTSMod (rond clair) et VinTL (triangle foncé) au niveau des adhésions Figure 124 – a) Schéma du principe de l'ablation des filaments d'actine à l'intérieur de la cellule. b) Images représentatives d'un ilot de cellules MDCK β-caténine GFP transfectées pour visualiser l'actine avec LifeAct RFP, avant l'ablation, juste après l'ablation, et 10 min après. c) En haut : Images représentatives du canal YFP des cellules MDCK EcadTSMod avant et après l'ablation à l'intérieur de la cellule proche du contact. En bas : Index FRET au cours du temps avant et après l'ablation laser pour le contact de la cellule ablaté, et les contact 1 et 2 noté sur les images Figure 125 – a) Schéma du principe de l'ablation autour d'une cellule d'intérêt. b) Intensité de la β-caténine GFP normalisée par l'intensité moyenne du contact avant l'ablation, au cours du temps pour des contacts cellule-cellule des cellules dont les voisines ont été ablatées, et pour des contacts loin de l'ablation. c) Images représentatives de la β-caténine GFP avant l'ablation et après ablation. En pointillé : région ablatée. La flèche indique les contacts où le signal de β -caténine diminue. d) Images représentatives de la β -caténine GFP avant l'ablation et après ablation. En pointillé : région ablatée. La flèche indique le contact au départ où l'intensité de la GFP diminue, puis après 30 Figure 126 – a) Images représentatives du canal YFP des cellules EcadTSMod avant et après l'ablation. Les flèches indiquent un contact en train de se rétracter et un en train de se former. b) Index FRET mesuré pour différents contacts des cellules dont les voisines ont été ablatées au cours du temps dans les premières minutes. c) Index FRET mesuré Figure 127 – a) Schéma du système de migration avec un réservoir, et plusieurs lignes de fibronectine permettant, une fois le morceau de PDMS bleu enlevé, la migration collective des cellules avec une adhérence au substrat via les adhésions focales. b) Image représentative en phase des cellules HaCaT en migration du réservoir sur les lignes et formant des ponts suspendus multicellulaires. Echelle=20µm. c) Image représentative en phase des cellules HaCaT avant ablation (à gauche) et après ablation d'une cellule leader sur la ligne de fibronectine et effondrement du Figure 128 – a) A droite : Image représentative de la surface adhésive et fonctionnalisée avec la fibronectine. A droite : Image représentative des cellules HaCaT EcadTSMod en mode spectral. b) Schéma des différentes régions d'intérêt : cellule leaders, cellules en migration sur le substrat adhésif, cellules suspendues, cellules dans le réservoir. Pour chaque cellule de ces différentes zones, différents contacts cellule-cellule sont choisis et délimités manuellement sur l'image d'intensité du canal d'émission 530nm. c) Exemple de cellules HaCat EcadTSMod dans le réservoir, sur les lignes de fibronectine formant des contacts linéaires, suspendues formant des contacts striés, Figure 129 - a) Index FRET des contacts E-cadhérines des cellules HaCaT présentes dans le réservoir, des cellules leaders, des cellules en migration sur les lignes de fibronectines, des cellules suspendues. b) A gauche : Image des cellules suspendues et des zones d'intérêt telles que les contacts au front là où il y a une forte courbure de la monocouche suspendue, et à l'arrière des cellules suspendues, ou encore alignés parallèlement ou perpendiculairement à la direction de migration. Au milieu : Index FRET pour les contacts des cellules suspendues à l'avant ou à l'arrière de la monocouche suspendue. A droite : Index FRET pour les contacts des cellules suspendues alignés parallèlement ou perpendiculairement à la direction de migration de la monocouche suspendue c) Profil d'index FRET le long de Figure 130 - a) En haut : Exemple de surface fonctionnalisée avec de la fibronectine (en rouge) comportant deux anneaux proches. En bas : Cellules MDCK EcadTSMod qui se rejoignent dans la zone du milieu où les deux anneaux sont proches. b) Exemple de deux anneaux ayant des sens de rotation opposé, l'étoile rouge désigne une cellule « étirée » triangulaire. c) Exemple de deux anneaux ayant le même sens de rotation, l'étoile orange montre une Figure 131 - Index FRET des cellules MDCK EcadTSMod mesuré pour des contacts E-cadhérines des cellules sur les bords du double anneau, dans la zone du milieu pour des cellules ayant un profil triangulaire, et pour des cellules étirées.

Liste des Tables

Table 1 – Résumé des différents senseurs de force et leurs utilisations.	
Table 2 – Récapitulatif des constantes d'affinité entre la partie cytoplasmique de la E-cadhérine et la β -caténi	ne, la β-
caténine phosphorylée par Src en Y654, et les mutants de la β-caténine Y654E et Y654F. (Roura et al. 199) 9) 92
Table 3 – Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les différents western blots.	132
Table 4 – Nombre d'expériences indépendantes répétées, et de cellules analysées au total par condition en fonc	tion des
figures	133
Table 5 – Ratio noyau-membrane N/M en fonction des différents modèles avec une faible ou importante dégradat	ion de la
β-caténine, et une quantité de E-cadhérines saturée ou non à la membrane	151
Table 6 – Résumé de différentes sollicitations mécaniques conduisant à l'activation de la voie β-caténine	228

Références Bibliographiques

- Abe, K. and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13–9.
- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R. and Hoschuetzky, H. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. J. Cell Sci. 107 (Pt 1, 3655–63.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997). Beta-Catenin Is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *EMBO J.* 16, 3797–804.
- Acharya, B. R., Wu, S. K., Lieu, Z. Z., Parton, R. G., Grill, S. W., Bershadsky, A. D., Gomez, G. A. and Yap, A. S. (2017). Mammalian Diaphanous 1 Mediates a Pathway for E-cadherin to Stabilize Epithelial Barriers through Junctional Contractility. *Cell Rep.* 18, 2854–2867.
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1438–1449.
- Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P. L., McKinney-Freeman, S., Mack, P. J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dicey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M. W., Yoder, M. C., et al. (2009). Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* 459, 1131–5.
- Adams, C. L. and Nelson, W. J. (1998). Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 572–577.
- Adams, D. S., Keller, R. and Koehl, M. a (1990). The mechanics of notochord elongation, straightening and stiffening in the embryo of Xenopus laevis. *Development* **110**, 115–130.
- Adams, C. L., Chen, Y.-T., Smith, S. J. and James Nelson, W. (1998). Mechanisms of Epithelial Cell–Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-resolution Tracking of E-Cadherin– Green Fluorescent Protein. J. Cell Biol. 142, 1105– 1119.
- Al-Kilani, A., De Freitas, O., Dufour, S. and Gallet, F. (2011). Negative feedback from integrins to cadherins: A micromechanical study. *Biophys. J.* 101, 336–344.
- Alexander, N. R., Branch, K. M., Parekh, A., Clark, E. S., Iwueke, I. C., Guelcher, S. A. and Weaver, A. M. (2008). Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity. *Curr. Biol.* **18**, 1295–1299.
- Alsteens, D., Garcia, M. C., Lipke, P. N. and Dufrene, Y. F. (2010). Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 20744–20749.
- Aman, A. and Piotrowski, T. (2008). Wnt/β-Catenin and Fgf Signaling Control Collective Cell Migration by Restricting Chemokine Receptor Expression. *Dev. Cell* 15, 749–761.
- Amini-Nik, S., Cambridge, E., Yu, W., Guo, A., Whetstone, H., Nadesan, P., Poon, R., Hinz, B. and Alman, B. A. (2014). β-Catenin – regulated myeloid cell adhesion and migration determine wound healing. J. Clin. Invest. **124**, 2599–2610.
- Ananthanarayanan, B. and Kumar, S. (2012). Cell Mechanobiology in Regenerative Medicine. In *Stem Cell Engineering*, pp. 1–16. CRC Press.
- Andrade, M. A., Petosa, C., O'Donoghue, S. I., Müller, C. W. and Bork, P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. J. Mol. Biol. 309, 1–18.
- Angres, B., Barth, A. and Nelson, W. J. (1996). Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: Kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. J. Cell Biol. 134, 549–557.
- Apte, U., Zeng, G., Muller, P., Tan, X., Micsenyi, A., Cieply, B., Dai, C., Liu, Y., Kaestner, K. H. and Monga, S. P. S. (2006). Activation of Wnt/beta-catenin pathway during hepatocyte growth factor-induced hepatomegaly in mice. *Hepatology* 44, 992–1002.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S. and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154, 1047–1059.
- Armstrong, D. D. and Esser, K. a (2005). Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overloadinduced skeletal muscle hypertrophy. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 289, C853–C859.
- Arnsdorf, E. J., Tummala, P. and Jacobs, C. R. (2009). Non-canonical Wnt signalling and N-cadherin related ??-catenin signalling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One* 4, 1–10.
- Arsenovic, P. T., Ramachandran, I., Bathula, K., Zhu, R., Narang, J. D., Noll, N. A., Lemmon, C. A., Gundersen, G. G. and Conway, D. E. (2016). Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys. J.* **110**, 34–43.
- Ashkin, A. and Dziedzic, J. M. (1989). Internal cell manipulation using infrared laser traps. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 7914– 8.
- Austen, K., Ringer, P., Mehlich, A., Chrostek-Grashoff, A., Kluger, C., Klingner, C., Sabass, B., Zent, R., Rief, M. and Grashoff,
 C. (2015). Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nat. Cell Biol.* 17, 1597–1609.
- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G. and Frame, M. C. (2002). Srcinduced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 632–638.
- Avvisato, C. L., Yang, X., Shah, S., Hoxter, B., Li, W., Gaynor, R., Pestell, R., Tozeren, A. and Byers, S. W. (2007). Mechanical force modulates global gene expression and beta-catenin signaling in colon cancer cells. J. Cell Sci. 120, 2672–2682.
- Baddam, S., Arsenovic, P., Duggan, N., Narayanan, V. and Conway, D. E. (2017). Desmosomes are Subject to Mechanical Load. *Biophys. J.* 112, 536a.

- Bakolitsa, C., Cohen, D. M., Bankston, L. A., Bobkov, A. A., Cadwell, G. W., Jennings, L., Critchley, D. R., Craig, S. W. and Liddington, R. C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* **430**, 583–586.
- Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466–472.
- Balkovetz, D. F. and Sambandam, V. (1999). Dynamics of E-cadherin and beta-catenin complexes during dedifferentiation of polarized MDCK cells. *Kidney Int.* 56, 910–921.
- Balsamo, J., Arregui, C., Leung, T. and Lilien, J. (1998). The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *J. Cell Biol.* **143**, 523–532.
- Bambardekar, K., Clément, R., Blanc, O., Chardès, C. and Lenne, P.-F. (2015). Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 1416–1421.
- Barry, A. K., Tabdili, H., Muhamed, I., Wu, J., Shashikanth, N., Gomez, G. A., Yap, A. S., Gottardi, C. J., de Rooij, J., Wang, N., et al. (2014). α-Catenin cytomechanics: role in cadherin-dependent adhesion and mechanotransduction. J. Cell Sci. 1779–1791.
- Baum, B. and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. J. Cell Biol. **192**, 907–917.
- Bays, J. L., Peng, X., Tolbert, C. E., Guilluy, C., Angell, A. E., Pan, Y., Superfine, R., Burridge, K. and DeMali, K. A. (2014). Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions. J. Cell Biol. 205, 251–263.
- Becker, N., Oroudjev, E., Mutz, S., Cleveland, J. P., Hansma, P. K., Hayashi, C. Y., Makarov, D. E. and Hansma, H. G. (2003). Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nat. Mater.* **2**, 278–283.
- Behrens, J., Behrens, J., Vakaet, L., Vakaet, L., Friis, R., Friis, R., Winterhager, E., Winterhager, E., van Roy, F., et al. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta- catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v- SRC gene. J. Cell Biol. 120, 757–766.
- Bellipanni, G., Varga, M., Maegawa, S., Imai, Y., Kelly, C., Myers, A. P., Chu, F., Talbot, W. S. and Weinberg, E. S. (2006). Essential and opposing roles of zebrafish beta-catenins in the formation of dorsal axial structures and neurectoderm. Development 133, 1299–1309.
- Beloussov, L. V, Dorfman, J. G. and Cherdantzev, V. G. (1975). Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 34, 559–574.
- Benham-Pyle, B. W., Pruitt, B. L. and Nelson, W. J. (2015). Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and catenin activation to drive cell cycle entry. *Science (80-.).* **348**, 1024–1027.
- Benham-Pyle, B. W., Sim, J. Y., Hart, K. C., Pruitt, B. L. and Nelson, W. J. (2016). Increasing β-catenin/Wnt3A activity levels drive mechanical strain-induced cell cycle progression through mitosis. *Elife* **5**, 1–34.
- Bertocchi, C., Wang, Y., Ravasio, A., Hara, Y., Wu, Y., Sailov, T., Baird, M. A., Davidson, M. W., Zaidel-Bar, R., Toyama, Y., et al. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nat. Cell Biol.* 468, 580–4.
- Bertocchi, C., Wang, Y., Ravasio, A., Hara, Y., Wu, Y., Sailov, T., Baird, M. A., Davidson, M. W., Zaidel-Bar, R., Toyama, Y., et al. (2016). Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions. *Nat. Cell Biol.* **1**,.
- Bieling, P., Li, T. De, Weichsel, J., McGorty, R., Jreij, P., Huang, B., Fletcher, D. A. and Mullins, R. D. (2016). Force Feedback Controls Motor Activity and Mechanical Properties of Self-Assembling Branched Actin Networks. *Cell* 164, 115–127.
- Bishop, A. L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348 Pt 2, 241–55.
- Biswas, K. H., Hartman, K. L., Zaidel-Bar, R. and Groves, J. T. (2016). Sustained α-catenin Activation at E-cadherin Junctions in the Absence of Mechanical Force. *Biophys. J.* **111**, 1044–1052.
- Blakely, B. L., Dumelin, C. E., Trappmann, B., McGregor, L. M., Choi, C. K., Anthony, P. C., Duesterberg, V. K., Baker, B. M., Block, S. M., Liu, D. R., et al. (2014). A DNA-based molecular probe for optically reporting cellular traction forces. *Nat. Methods* **11**, 1229–1232.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94, 235–63.
- Bois, P. R. J., O'Hara, B. P., Nietlispach, D., Kirkpatrick, J. and Izard, T. (2006). The vinculin binding sites of talin and ??actinin are sufficient to activate vinculin. J. Biol. Chem. 281, 7228–7236.
- Bonnet, I., Marcq, P., Bosveld, F., Fetler, L., Bellaiche, Y. and Graner, F. (2012). Mechanical state, material properties and continuous description of an epithelial tissue. J. R. Soc. Interface 9, 2614–2623.
- Bonvini, P., An, W. G., Rosolen, A., Nguyen, P., Trepel, J., Garcia de Herreros, A., Dunach, M. and Neckers, L. M. (2001). Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription. *Cancer Res.* **61**, 1671–1677.
- Borghi, N. and Brochard-Wyart, F. (2007). Tether Extrusion from Red Blood Cells: Integral Proteins Unbinding from Cytoskeleton. *Biophys. J.* 93, 1369–1379.
- Borghi, N., Lowndes, M., Maruthamuthu, V., Gardel, M. L. and Nelson, W. J. (2010). Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13324–9.
- Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O. G., Weis, W. I., Pruitt, B. L., Nelson, W. J., Dunn, A. R., James, W., Dunn, A. R., Sorokina, M., et al. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cellcell contacts upon externally applied stretch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 19034–19034.
- Boselli, F. and Vermot, J. (2016). Live imaging and modeling for shear stress quantification in the embryonic zebrafish heart.

Methods 94, 129-134.

- Bosse, T., Ehinger, J., Czuchra, A., Benesch, S., Steffen, A., Wu, X., Schloen, K., Niemann, H. H., Scita, G., Stradal, T. E. B., et al. (2007). Cdc42 and Phosphoinositide 3-Kinase Drive Rac-Mediated Actin Polymerization Downstream of c-Met in Distinct and Common Pathways. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6615–6628.
- Boukellal, H., Campás, O., Joanny, J. F., Prost, J. and Sykes, C. (2004). Soft Listeria: Actin-based propulsion of liquid drops. *Phys. Rev. E Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **69**, 3–6.
- Bourret, L. A. and Rodan, G. A. (1976). The role of calcium in the inhibition of cAMP accumulation in epiphyseal cartilage cells exposed to physiological pressure. J. Cell. Physiol. 88, 353–361.
- Braga, V. M., Betson, M., Li, X. and Lamarche-Vane, N. (2000). Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3703–21.
- Brembeck, F. H., Schwarz-romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* **18**, 2225–2230.
- Brennen, C. and Winet, H. (1977). Fluid Mechanics of Propulsion by Cilia and Flagella. Annu. Rev. Fluid Mech. 9, 339–398.
- Brenner, M. D., Zhou, R., Conway, D. E., Lanzano, L., Gratton, E., Schwartz, M. A. and Ha, T. (2016). Spider Silk Peptide Is a Compact, Linear Nanospring Ideal for Intracellular Tension Sensing. *Nano Lett.* **16**, 2096–2102.
- Brochard-Wyart, F., Borghi, N., Cuvelier, D. and Nassoy, P. (2006). Hydrodynamic narrowing of tubes extruded from cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7660–7663.
- Brodland, G. W., Veldhuis, J. H., Kim, S., Perrone, M., Mashburn, D. and Hutson, M. S. (2014). CellFIT: A cellular forceinference toolkit using curvilinear cell boundaries. *PLoS One* **9**,.
- Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B. and Bode, H. R. (2005). Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* **132**, 2907–2916.
- Brown, M. C. and Turner, C. E. (2004). Paxillin : Adapting to Change. 1315–1339.
- Brunet, T., Bouclet, A., Ahmadi, P., Mitrossilis, D., Driquez, B., Brunet, A.-C., Henry, L., Serman, F., Béalle, G., Ménager, C., et al. (2013). Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria. *Nat. Commun.* 4, 2821.
- Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., Nelson, W. J. and Dunn, A. R. (2014). The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science (80-.).* **346**, 1254211–1254211.
- Busch, T., Armacki, M., Eiseler, T., Joodi, G., Temme, C., Jansen, J., von Wichert, G., Omary, M. B., Spatz, J. and Seufferlein, T. (2012). Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells. J. Cell Sci. 125, 2148–2159.
- Bustamante, C., Chemla, Y. R., Forde, N. R. and Izhaky, D. (2004). Mechanical processes in biochemistry. Annu. Rev. Biochem. 73, 705–48.
- Cadigan, K. M. and Nusse, R. (1997). Wnt signalling: a common theme in animal development. Genes Dev. 11, 3286–3305.
- Cadigan, K. M. and Peifer, M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb. Perspect Biol* 1, a002881.
- Cai, D., Chen, S. C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choesmel-Cadamuro, V., Sawyer, J. K., Danuser, G. and Montell, D. J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* 157, 1146–1159.
- Calalb, M. B., Polte, T. R. and Hanks, S. K. (1995). Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Sites in the Catalytic Domain Regulates Kinase Activity: a Role for Src Family Kinases. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 954–963.
- Calderwood, D. A., Campbell, I. D. and Critchley, D. R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 503–517.
- Caldwell, B. J., Lucas, C., Kee, A. J., Gaus, K., Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Yap, A. S. and Gomez, G. A. (2014). Tropomyosin isoforms support actomyosin biogenesis to generate contractile tension at the epithelial zonula adherens. *Cytoskeleton* **71**, 663–676.
- Campàs, O. (2016). A toolbox to explore the mechanics of living embryonic tissues. Semin. Cell Dev. Biol. 55, 119–130.
- Campàs, O., Mammoto, T., Hasso, S., Sperling, R. A., O'Connell, D., Bischof, A. G., Maas, R., Weitz, D. A., Mahadevan, L. and Ingber, D. E. (2014). Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nat. Methods* 11, 183–9.
- Capaldo, C. T. and Macara, I. G. (2007). Depletion of E-Cadherin Disrupts Establishment but Not Maintenance of Cell Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* **18**, 189–200.
- Case, L. B. and Waterman, C. M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat. Cell Biol.* 1–9.
- Case, N., Ma, M., Sen, B., Xie, Z., Gross, T. S. and Rubin, J. (2008). Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. J. Biol. Chem. 283, 29196–205.
- Case, L. B., Baird, M. A., Shtengel, G., Campbell, S. L., Hess, H. F., Davidson, M. W. and Waterman, C. M. (2015). Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 17, 880–892.
- Catimel, B., Layton, M., Church, N., Ross, J., Condron, M., Faux, M., Simpson, R. J., Burgess, A. W. and Nice, E. C. (2006). In situ phosphorylation of immobilized receptors on biosensor surfaces: Application to E-cadherin/β-catenin interactions. *Anal. Biochem.* **357**, 277–288.
- Catizone, A., Ricci, G., Caruso, M., Galdieri, M., Scheri, K., Di Paolo, V. and Canipari, R. (2015). HGF Modulates Actin Cytoskeleton Remodeling and Contraction in Testicular Myoid Cells. *Biomedicines* **3**, 89–109.

- Cattaruzza, M., Lattrich, C. and Hecker, M. (2004). Focal Adhesion Protein Zyxin is a Mechanosensitive Modulator of Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* **43**, 726–730.
- Cavey, M. and Lecuit, T. (2009). Molecular Bases of Cell Cell Junctions Stability and Dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, 1–19.
- Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.-F. and Lecuit, T. (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of Ecadherin. Nature 453, 751–756.
- Chaigne, A., Campillo, C., Gov, N. S., Voituriez, R., Azoury, J., Umaña-Diaz, C., Almonacid, M., Queguiner, I., Nassoy, P., Sykes, C., et al. (2013). A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* 15, 958–966.
- Chang, C.-W. C.-W. and Kumar, S. (2013). Vinculin tension distributions of individual stress fibers within cell-matrix adhesions. J. Cell Sci. 126, 3021–3030.
- Chang, A. C., Mekhdjian, A. H., Morimatsu, M., Denisin, A. K., Pruitt, B. L. and Dunn, A. R. (2016). Single Molecule Force Measurements in Living Cells Reveal a Minimally Tensioned Integrin State. ACS Nano acsnano.6b03314.
- Charrier, E. E., Asnacios, A., Milloud, R., De Mets, R., Balland, M., Delort, F., Cardoso, O., Vicart, P., Batonnet-Pichon, S. and Hénon, S. (2016). Desmin Mutation in the C-Terminal Domain Impairs Traction Force Generation in Myoblasts. *Biophys. J.* 110, 470–480.
- Chaturvedi, L. S., Marsh, H. M. and Basson, M. D. (2006). Src and focal adhesion kinase mediate mechanical strain-induced proliferation and ERK1/2 phosphorylation in human H441 pulmonary epithelial cells. AJP Cell Physiol. 292, C1701– C1713.
- Chen, S.-Y. Y. and Chen, H.-C. C. (2006). Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase (FAK) with Met Is Required for FAK To Promote Hepatocyte Growth Factor-Induced Cell Invasion. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5155–5167.
- Chen, H.-C., Chant, P.-C., Tang, M.-J., Cheng, C.-H. and Chan, T.-J. (1998). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. 273, 25777–25782.
- Chen, Y. T., Stewart, D. B. and Nelson, W. J. (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. J. Cell Biol. 144, 687–699.
- Chen, H., Cohen, D. M., Choudhury, D. M., Kioka, N. and Craig, S. W. (2005). Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. J. Cell Biol. 169, 459–470.
- Chen, T. H., Chan, P. C., Chen, C. L. and Chen, H. C. (2011). Phosphorylation of focal adhesion kinase on tyrosine 194 by Met leads to its activation through relief of autoinhibition. *Oncogene* **30**, 153–166.
- Chen, X. L., Nam, J. O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C. T., Goka, E., Lim, S. T., Tomar, A., Tancioni, I., Uryu, S., et al. (2012). VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK. *Dev. Cell* 22, 146–157.
- Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K. and Munn, L. L. (2009). Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS One* **4**, e4632.
- Cheon, S. S., Cheah, A. Y. L., Turley, S., Nadesan, P., Poon, R., Clevers, H. and Alman, B. A. (2002). beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6973–8.
- Chien, Y. H., Jiang, N., Li, F., Zhang, F., Zhu, C. and Leckband, D. (2008). Two stage cadherin kinetics require multiple extracellular domains but not the cytoplasmic region. J. Biol. Chem. 283, 1848–1856.
- Choi, H. J., Huber, A. H. and Weis, W. I. (2006). Thermodynamics of β-catenin-ligand interactions: The roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. J. Biol. Chem. 281, 1027–1038.
- Choi, H.-J., Pokutta, S., Cadwell, G. W., Bobkov, A. A., Bankston, L. A., Liddington, R. C. and Weis, W. I. (2012). αE-catenin is an autoinhibited molecule that coactivates vinculin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8576–8581.
- Choquet, D., Felsenfeld, D. P. and Sheetz, M. P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrincytoskeleton linkages. *Cell* 88, 39–48.
- Christensen, A. P. and Corey, D. P. (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 510–521.
- Chu, Y. S., Thomas, W. A., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J. P. and Dufour, S. (2004). Force measurements in Ecadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. J. Cell Biol. 167, 1183–1194.
- Chuan, P., Spudich, J. A. and Dunn, A. R. (2011). Robust mechanosensing and tension generation by myosin VI. J. Mol. Biol. 405, 105–112.
- Clevers, H. (2006). Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. Cell 127, 469–480.
- Coburn, L., Lopez, H., Caldwell, B. J., Moussa, E., Yap, C., Priya, R., Noppe, A., Roberts, A. P., Lobaskin, V., Yap, A. S., et al. (2016). Contact inhibition of locomotion and mechanical cross-talk between cell–cell and cell–substrate adhesion determine the pattern of junctional tension in epithelial cell aggregates. *Mol. Biol. Cell* **27**, 3436–3448.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E. G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J. V., Schwarz, U. S. and Stelzer, E. H. K. (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J. Cell Sci.* **122**, 1928–1928.
- Coluccia, A. M., Vacca, A., Dunach, M., Mologni, L., Redaelli, S., Bustos, V. H., Benati, D., Pinna, L. A. and Gambacorti-Passerini, C. (2007). Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *Embo J* 26, 1456–1466.

- Connelly, J. T., Gautrot, J. E., Trappmann, B., Tan, D. W.-M., Donati, G., Huck, W. T. S. and Watt, F. M. (2010). Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions. *Nat. Cell Biol.* **12**, 711–718.
- Conway, D. E., Breckenridge, M. T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C. S. and Schwartz, M. A. (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Curr. Biol.* 23, 1024–1030.
- Conway, D. E., Coon, B. G., Budatha, M., Dejana, E., Vestweber, D. and Schwartz Correspondence, M. A. (2017). VE-Cadherin Phosphorylation Regulates Endothelial Fluid Shear Stress Responses through the Polarity Protein LGN The LGN-bound pool of VE-cadherin mediates signaling in response to flow. *Curr. Biol.* 1–7.
- Cortese, J. D., Schwab, B., Frieden, C. and Elson, E. L. (1989). Actin polymerization induces a shape change in actincontaining vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 5773–7.
- Coue, M., Lombillo, V. A. and McIntosh, J. R. (1991). Microtubule depolymerization promotes particle and chromosome movement in vitro. J. Cell Biol. 112, 1165–1175.
- Courty, S., Luccardini, C., Bellaiche, Y., Cappello, G. and Dahan, M. (2006). Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett.* 6, 1491–1495.
- Crick, F. H. C. and Hughes, A. F. W. (1950). The physical properties of cytoplasm. Exp. Cell Res. 1, 37–80.
- Cui, Y., Hameed, F. M., Yang, B., Lee, K., Pan, C. Q., Park, S. and Sheetz, M. (2015). Cyclic stretching of soft substrates induces spreading and growth. Nat. Commun. 6, 6333.
- D'arcy Thompson, W. (1917). On Growth and Form. Cambridge Univ. Press.
- Dai, J. and Sheetz, M. P. (1999). Membrane Tether Formation from Blebbing Cells. Biophys. J. 77, 3363–3370.
- Daneshjou, N., Sieracki, N., van Nieuw Amerongen, G. P., Schwartz, M. A., Komarova, Y. A. and Malik, A. B. (2015). Rac1 functions as a reversible tension modulator to stabilize VE-cadherin trans-interaction. *J. Cell Biol.* **208**, 23–32.
- Das, M., Subbayya Ithychanda, S., Qin, J. and Plow, E. F. (2014). Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 579–588.
- Das, T., Safferling, K., Rausch, S., Grabe, N., Boehm, H. and Spatz, J. P. (2015). A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells. *Nat Cell Biol* 17, 276–287.
- David, M. D., Yeramian, A., Duñach, M., Llovera, M., Cantí, C., de Herreros, A. G., Comella, J. X. and Herreros, J. (2008). Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. J. Cell Sci. 121, 2718–30.
- Davies, P. F. (1995). Flow-Mediated Mechanotransduction. Physiol. Rev. 75, 519–560.
- Davis, M. A., Ireton, R. C. and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. J. Cell Biol. 163, 525–534.
- Day, R. N., Booker, C. F. and Periasamy, A. (2008). Characterization of an improved donor fluorescent protein for Förster resonance energy transfer microscopy. J. Biomed. Opt. 13, 31203.
- de Beco, S., Gueudry, C., Amblard, F. and Coscoy, S. (2009). Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7010–5.
- de Beco, S., Perney, J.-B., Coscoy, S. and Amblard, F. (2015). Mechanosensitive Adaptation of E-Cadherin Turnover across adherens Junctions. *PLoS One* **10**, e0128281.
- De Rooij, J., Kerstens, A., Danuser, G., Schwartz, M. A. and Waterman-Storer, C. M. (2005). Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. J. Cell Biol. 171, 153–164.
- Dejardin, T., Davidson, P., Seiler, C., Girard, P., Cuvelier, D., Sykes, C., Gomes, E., Bruno, C. and Borghi, N. (2017). Mechanotransduction at the Nuclear Envelope. *Biophys. J.* **112**, 458a.
- Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D. and Riveline, D. (2004). Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2229–2234.
- Demali, K. a, Sun, X. and Bui, G. a (2014). Force Transmission at Cell Cell and Cell Matrix Adhesions. *Biochemistry* 53, 7706–7717.
- DeMali, K. A. (2004). Vinculin-a dynamic regulator of cell adhesion. Trends Biochem. Sci. 29, 565-7.
- Dembo, M., Oliver, T., Ishihara, A. and Jacobson, K. (1996). Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. *Biophys. J.* **70**, 2008–2022.
- Desprat, N., Supatto, W., Pouille, P.-A. A., Beaurepaire, E. and Farge, E. (2008). Tissue Deformation Modulates Twist Expression to Determine Anterior Midgut Differentiation in Drosophila Embryos. *Dev. Cell* **15**, 470–477.
- Diamond, S. L., Eskin, S. G. and McIntire, L. V (1989). Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secrection by cultured human endothelial cells. *Scienc* 243, 1483–1485.
- Discher, D. E., Janmey, P. and Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139–43.
- Diz-Munoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D. J., Paluch, E. and Heisenberg, C. P. (2010). Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment. *PLoS Biol.* **8**,.
- Dogterom, M. (1997). Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules. Science (80-.). 278, 856–860.
- Dogterom, M., Kerssemakers, J. W., Romet-Lemonne, G. and Janson, M. E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 67–74.
- Dorsky, R. I., Sheldahl, L. C. and Moon, R. T. (2002). A transgenic Lef1/beta-catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout zebrafish development. *Dev. Biol.* **241**, 229–37.
- Doughman, R. L., Firestone, A. J., Wojtasiak, M. L., Bunce, M. W. and Anderson, R. A. (2003). Membrane ruffling requires coordination between type I?? phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. J. Biol. Chem. 278, 23036–

23045.

- Dowrick, P. G., Prescott, A. R. and Warn, R. M. (1991). Scatter factor affects major changes in the cytoskeletal organization of epithelial cells. *Cytokine* **3**, 299–310.
- **Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. and Weis, W. I.** (2005). α-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-β-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**, 903–915.
- Du, W., Mills, I. and Sumpio, B. E. (1995). Cyclic strain causes heterogeneous induction of transcription factors, AP-1, CRE binding protein and NF-kB, in endothelial cells: Species and vascular bed diversity. J. Biomech. 28, 1485–1491.
- du Roure, O., Saez, A., Buguin, A., Austin, R. H., Chavrier, P., Silberzan, P. and Ladoux, B. (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2390–2395.
- Dukes, J. D., Whitley, P., Chalmers, A. D., Gaush, C., Hard, W., Smith, T., Datta, A., Bryant, D., Mostov, K., McCaffrey, L., et al. (2011). The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* **12**, 43.
- Dumbauld, D. W., Lee, T. T., Singh, A., Scrimgeour, J., Gersbach, C. A., Zamir, E. A., Fu, J., Chen, C. S., Curtis, J. E., Craig, S. W., et al. (2013). How vinculin regulates force transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9788–9793.
- Dupont, S. (2016). Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. Exp. Cell Res. 343, 42–53.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183.
- Eger, a, Stockinger, a, Schaffhauser, B., Beug, H. and Foisner, R. (2000). Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J. Cell Biol.* **148**, 173–88.
- Eide, B. L. and Turck, C. W. (1995). Identification of Tyr-397 as the Primary Site of Tyrosine Phosphorylation and pp60 src Association in the Focal Adhesion Kinase , pp125 FAK. 15, 2819–2827.
- Empereur, S., Djelloul, S., Di Gioia, Y., Bruyneel, E., Mareel, M., Van Hengel, J., Van Roy, F., Comoglio, P., Courtneidge, S., Paraskeva, C., et al. (1997). Progression of familial adenomatous polyposis (FAP) colonic cells after transfer of the src or polyoma middle T oncogenes: cooperation between src and HGF/Met in invasion. *Br. J. Cancer* 75, 241–50.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. and Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.
- Erami, Z., Timpson, P., Yao, W., Zaidel-Bar, R. and Anderson, K. I. (2015). There are four dynamically and functionally distinct populations of E-cadherin in cell junctions. *Biol. Open* 1481–1489.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature 420, 629-635.
- Evans, E. and Yeung, A. (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys. J.* 56, 151–160.
- Evans, E. A., Waugh, R. and Melnik, L. (1976). Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys. J.* 16, 585–595.
- Fagotto, F., Glück, U. and Gumbiner, B. M. (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherinindependent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol.* 8, 181–90.
- Farge, E. (2003). Mechanical induction of Twist in the Drosophila foregut/stomodeal primordium. Curr. Biol. 13, 1365–1377.
- Fernandez-Gonzalez, R., Simoes, S. de M., Röper, J. C., Eaton, S. and Zallen, J. A. (2009). Myosin II Dynamics Are Regulated by Tension in Intercalating Cells. *Dev. Cell* 17, 736–743.
- Fernández-Sánchez, M. E., Barbier, S., Whitehead, J., Béalle, G., Michel, A., Latorre-Ossa, H., Rey, C., Fouassier, L., Claperon, A., Brullé, L., et al. (2015). Mechanical induction of the tumorigenic β-catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature* **523**, 92–95.
- Ferrando, I. M., Chaerkady, R., Zhong, J., Molina, H., Jacob, H. K. C., Herbst-Robinson, K., Dancy, B. M., Katju, V., Bose, R., Zhang, J., et al. (2012). Identification of Targets of c-Src Tyrosine Kinase by Chemical Complementation and Phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 355–369.
- Fets, L., Nichols, J. M. E. and Kay, R. R. (2014). A PIP5 kinase essential for efficient chemotactic signaling. Curr. Biol. 24, 415–421.
- Finer, J. T., Simmons, R. M. and Spudich, J. a (1994). Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. Nature 368, 113–119.
- Flitney, E. W., Kuczmarski, E. R., Adam, S. A. and Goldman, R. D. (2009). Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. FASEB J. 23, 2110–2119.
- Fluck, M., Carson, J. A., Gordon, S. E., Ziemiecki, A. and Booth, F. W. (1999). Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle. Am J Physiol 277, C152-62.
- **Fodde, R. and Brabletz, T.** (2007). Wnt/β-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 150–158.
- Footer, M., Kerssemakers, J., Theriot, J. and Dogterom, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 2181–2186.
- Forgacs, G., Foty, R. a, Shafrir, Y. and Steinberg, M. S. (1998). Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study. *Biophys. J.* 74, 2227–34.
- Foty, R. A., Forgacs, G., Pfleger, C. M. and Steinberg, M. S. (1994). Liquid properties of embryonic tissues: Measurement of interfacial tensions. *Phys. Rev. Lett.* **72**, 2298–2301.
- Frame, M. C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D. and Eck, M. J. (2010). The FERM domain: organizing the structure and function

of FAK. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 802-814.

- Frangos, J. A., Eskin, S. G., McIntire, L. V and Ives, C. L. (1985). Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227, 1477–9.
- Franke, W. W. (2009). Discovering the molecular components of intercellular junctions- a historical view. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a003061.
- Franke, R.-P., Gräfe, M., Seiffge, D., Mittermayer, C. and Drenckhahn, D. (1984). Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* **307**, 648–649.
- Freikamp, A., Mehlich, A., Klingner, C. and Grashoff, C. (2015). Investigating piconewton forces in cells by FRET-based molecular force microscopy. J. Struct. Biol. 197, 37–42.
- Freund, J. B., Goetz, J. G., Hill, K. L. and Vermot, J. (2012). Fluid flows and forces in development: functions, features and biophysical principles. *Development* 139, 1229–1245.
- Fritton, S. P., J. McLeod, K. and Rubin, C. T. (2000). Quantifying the strain history of bone: Spatial uniformity and selfsimilarity of low-magnitude strains. J. Biomech. 33, 317–325.
- Fritzsche, M. and Charras, G. (2015). Dissecting protein reaction dynamics in living cells by fluorescence recovery after photobleaching. Nat. Protoc. 10, 660–80.
- Fuchs, S. Y., Chen, A., Xiong, Y., Pan, Z. Q. and Ronai, Z. (1999). HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of IkappaB and beta-catenin. Oncogene 18, 2039–2046.
- Fujimoto, J. G., Pitris, C., Boppart, S. A. and Brezinski, M. E. (2000). Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy. *Neoplasia* 2, 9–25.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., Sommer, T. and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat. Cell Biol.* **4**, 222–231.
- Ganz, A., Lambert, M., Saez, A., Silberzan, P., Buguin, A., Mège, R. M. and Ladoux, B. (2006). Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol. Cell* 98, 721–730.
- Gardel, M. L., Sabass, B., Ji, L., Danuser, G., Schwarz, U. S. and Waterman, C. M. (2008). Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde fl ow speed. *J. Cell Biol.* **183**, 999–1005.
- Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y. and Waterman, C. M. (2010). Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333.
- Gates, J. and Peifer, M. (2005). Can 1000 reviews be wrong? Actin, α-catenin, and adherens junctions. Cell 123, 769–772.
- Gautrot, J. E., Malmström, J., Sundh, M., Margadant, C., Sonnenberg, A. and Sutherland, D. S. (2014). The nanoscale geometrical maturation of focal adhesions controls stem cell differentiation and mechanotransduction. *Nano Lett.* 14, 3945–3952.
- Gayrard, C. and Borghi, N. (2016). FRET-based Molecular Tension Microscopy. Methods 94, 33-42.
- Giles, R. H., Van Es, J. H. and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1653, 1–24.
- Gladden, A. B., Hebert, A. M., Schneeberger, E. E. and McClatchey, A. I. (2010). The NF2 Tumor Suppressor, Merlin, Regulates Epidermal Development through the Establishment of a Junctional Polarity Complex. Dev. Cell 19, 727– 739.
- Goldmann, W. H., Auernheimer, V., Thievessen, I. and Fabry, B. (2013). Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion. *Cell Biol. Int.* **37**, 397–405.
- Goldyn, A. M., Rioja, B. A., Spatz, J. P., Ballestrem, C. and Kemkemer, R. (2009). Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding. *J. Cell Sci.* **122**, 3644–3651.
- Gottardi, C. J. and Gumbiner, B. M. (2004). Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. J. Cell Biol. 167, 339–349.
- **Gottardi, C. J., Wong, E. and Gumbiner, B. M.** (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting β-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* **153**, 1049–1059.
- Grano, M., Galimi, F., Zambonin, G., Colucci, S., Cottone, E., Zallone, a Z. and Comoglio, P. M. (1996). Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7644–8.
- Grant, B. D. and Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608.
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466, 263–6.
- Greenberg, M. J., Lin, T., Goldman, Y. E., Shuman, H. and Ostap, E. M. (2012). Myosin IC generates power over a range of loads via a new tension-sensing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2433–E2440.
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. and Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: Conditional loss- and gain-of-function mutations of ??-catenin in mice. *Genes Dev.* 22, 2308–2341.
- Grishchuk, E. L., Molodtsov, M. I., Ataullakhanov, F. I. and McIntosh, J. R. (2005). Force production by disassembling microtubules. *Nature* **438**, 384–388.
- Grumolato, L., Liu, G., Haremaki, T., Mungamuri, S. K., Mong, P., Akiri, G., Lopez-Bergami, P., Arita, A., Anouar, Y., Mlodzik, M., et al. (2013). β-Catenin-Independent Activation of TCF1/LEF1 in Human Hematopoietic Tumor Cells through Interaction with ATF2 Transcription Factors. *PLoS Genet.* 9,.

- Guevorkian, K., Colbert, M. J., Durth, M., Dufour, S. and Brochard-Wyart, F. (2010). Aspiration of biological viscoelastic drops. *Phys. Rev. Lett.* **104**, 1–4.
- Guharay, F. and Sachs, F. (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. J. Physiol. 352, 685–701.
- Guilak, F., Butler, D. L., Goldstein, S. A. and Baaijens, F. P. T. (2014). Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering. J. Biomech. 47, 1933–40.
- Guilluy, C., Swaminathan, V., Garcia-Mata, R., Timothy O'Brien, E., Superfine, R. and Burridge, K. (2011). The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 724–729.
- Guilluy, C., Osborne, L. D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R. and Burridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* **16**, 376–381.
- Guo, P., Weinstein, A. M. and Weinbaum, S. (2000). A hydrodynamic mechanosensory hypothesis for brush border microvilli. Am. J. Physiol. Physiol. 10031, F698–F712.
- Guo, J., Wang, Y., Sachs, F. and Meng, F. (2014). Actin stress in cell reprogramming. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, E5252-61.
- Gustin, M. C., Zhou, X., Martinac, B. and Kung, C. (1988). A Mechanosensitive Ion Channel in the Yeast Plasma Membrane. Science (80-.). 242, 762–765.
- Haase, K. and Pelling, A. E. (2015). Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. J. R. Soc. Interface 12, 20140970.
- Hadjipanayi, E., Mudera, V. and Brown, R. A. (2009). Guiding cell migration in 3D: A collagen matrix with graded directional stiffness. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 121–128.
- Halka, A. T., Turner, N. J., Carter, A., Ghosh, J., Murphy, M. O., Kirton, J. P., Kielty, C. M. and Walker, M. G. (2008). The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Cardiovasc. Pathol.* **17**, 98–102.
- Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S. and Hakoshima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J.* **19**, 4449–4462.
- Hamaguchi, M., Matsuyoshi, N., Ohnishi, Y., Gotoh, B., Takeichi, M. and Nagai, Y. (1993). p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J.* **12**, 307–14.
- Hamill, O. P. and Martinac, B. (2001). Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells. Physiol. Rev. 81, 685–740.
- Han, M. K. L. and de Rooij, J. (2016). Converging and Unique Mechanisms of Mechanotransduction at Adhesion Sites. *Trends Cell Biol.* 26, 612–623.
- Hanna, M., Liu, H., Amir, J., Sun, Y., Morris, S. W., Siddiqui, M. A. Q., Lau, L. F. and Chaqour, B. (2009). Mechanical regulation of the proangiogenic factor CCN1/CYR61 gene requires the combined activities of MRTF-A and CREBbinding protein histone acetyltransferase. J. Biol. Chem. 284, 23125–23136.
- Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J.-W., Spinler, K. R., Athirasala, A., Diegmiller, R., Dingal, P. C. D. P., Ivanovska, I. L. and Discher, D. E. (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. J. Cell Biol. 204, 669–682.
- Harlepp, S., Thalmann, F., Follain, G. and Goetz, J. G. (2017). Hemodynamic forces can be accurately measured in vivo with optical tweezers. 5–7.
- Harris, A. K., Wild, P. and Stopak, D. (1980). Silicone Rubber Substrata : A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion. *Science (80-.).* 208, 177–179.
- Harrison, O. J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Brasch, J., Wu, Y., Vendome, J., Felsovalyi, K., Hampton, C. M., Troyanovsky, R.
 B., et al. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherin.
 19, 244–256.
- Hartsock, A. and Nelson, W. J. (2008). Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connection to the Actin Cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778, 660–669.
- Haudenschild, D. R., Chen, J., Pang, N., Lotz, M. K. and D'Lima, D. D. (2010). Rho kinase???dependent activation of SOX9 in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 62, 191–200.
- Hayashi, S., Rubinfeld, B., Souza, B., Polakis, P., Wieschaus, E. and Levine, A. J. (1997). A Drosophila homolog of the tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli down-regulates -catenin but its zygotic expression is not essential for the regulation of Armadillo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 242–247.
- Hazan, R. B. and Norton, L. (1998). The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. J Biol Chem 273, 9078–9084.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C. Y. and Wylie,
 C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of β-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early Xenopus embryos. *Cell* **79**, 791–803.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H.-C., Lee, V. M. Y. and Klein, P. S. (1997). Activation of the Wnt Signaling Pathway: A Molecular Mechanism for Lithium Action. *Dev. Biol.* **185**, 82–91.
- Heinemann, F., Doschke, H. and Radmacher, M. (2011). Keratocyte lamellipodial protrusion is characterized by a concave force-velocity relation. *Biophys. J.* 100, 1420–1427.
- Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A. and Gallet, F. (1999). A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers. *Biophys. J.* 76, 1145–1151.
- Hens, J. R., Wilson, K. M., Dann, P., Chen, X., Horowitz, M. C. and Wysolmerski, J. J. (2005). TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1103–13.

- Herbomel, G., Hatte, G., Roul, J., Padilla-Parra, S., Tassan, J.-P. and Tramier, M. (2017). Actomyosin-generated tension on cadherin is similar between dividing and non-dividing epithelial cells in early Xenopus laevis embryos. *Sci. Rep.* 7, 45058.
- Hernández-Varas, P., Berge, U., Lock, J. G. and Strömblad, S. (2015). A plastic relationship between vinculin-mediated tension and adhesion complex area defines adhesion size and lifetime. *Nat. Commun.* 6, 7524.
- Herzig, M., Savarese, F., Novatchkova, M., Semb, H. and Christofori, G. (2007). Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of β-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene* 26, 2290–2298.
- Heuberger, J. and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002915.
- Hill, T. L. and Kirschner, M. W. (1982). Bioenergetics and kinetics of microtubule and actin filament assembly-disassembly. Int. Rev. Cytol. 78, 1–125.
- Hinck, L., Näthke, I. S., Papkoff, J. and Nelson, W. J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* **125**, 1327–1340.
- Hinck L, Nelson WJ, P. J. (1994). Wnt-1 Modulates Cell-Cell Adhesion in Mammalian Cells by Stabilizing beta-cat binding to the Cell Adhesion Protein Cadherin. Jcb 124, 729–741.
- Hinz, B. (2009). Tissue stiffness, latent TGF-??1 Activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 11, 120–126.
- Hirata, H., Samsonov, M. and Sokabe, M. (2017). Actomyosin contractility provokes contact inhibition in E-cadherin-ligated keratinocytes. *Sci. Rep.* **7**, 46326.
- Hochmuth, R. M. (2000). Micropipette aspiration of living cells. J. Biomech. 33, 15–22.
- Hochmuth, R. M., Mohandas, N. and Blackshear, P. L. (1973). Measurement of the Elastic Modulus for Red Cell Membrane Using a Fluid Mechanical Technique. *Biophys. J.* **13**, 747–762.
- Hoffmans, R. and Basler, K. (2007). BCL9-2 binds Arm/beta-catenin in a Tyr142-independent manner and requires Pygopus for its function in Wg/Wnt signaling. *Mech. Dev.* **124**, 59–67.
- Hoger, J. H., Ilyin, V. I., Forsyth, S. and Hoger, A. (2002). Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7780–5.
- Honda, a, Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, a J., Frohman, M. a, et al. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521–532.
- Hoon, J. L., Tan, M. H. and Koh, C.-G. (2016). The Regulation of Cellular Responses to Mechanical Cues by Rho GTPases. *Cells* 5, 17.
- Hove, J. R., Koster, R. W., Forouhar, A. S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S. E. and Gharib, M. (2003). Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* **421**, 172–177.
- Howard, J. (2001). Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. (ed. Sunderland, M. : S. A.).
- **Howard, S., Deroo, T., Fujita, Y. and Itasaki, N.** (2011). A positive role of cadherin in Wnt/β-catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **6**, e23899.
- Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J., et al. (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. J. Cell Biol. 160, 753–767.
- Huang, H. and He, X. (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 119–125.
- Huber, A. H. and Weis, W. I. (2001). The structure of the B-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by B-catenin. *Cell* **105**, 391–402.
- Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V, Nelson, W. J. and Weis, W. I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. J. Biol. Chem. 276, 12301–9.
- Hulpiau, P. and van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 349–369.
- Huveneers, S., Oldenburg, J., Spanjaard, E., van der Krogt, G., Grigoriev, I., Akhmanova, A., Rehmann, H. and de Rooij, J. (2012). Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J. Cell Biol.* 196, 641–652.
- Ingber, D. (2003). Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. Ann. Med. 35, 564–577.
- Ishibe, S., Haydu, J. E., Togawa, A., Marlier, A. and Cantley, L. G. (2006). Cell Confluence Regulates Hepatocyte Growth Factor-Stimulated Cell Morphogenesis in a -Catenin-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9232–9243.
- Ishihara, S. and Sugimura, K. (2012). Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis. J. Theor. Biol. 313, 201– 211.
- Ishihara, S., Sugimura, K., Cox, S. J., Bonnet, I., Bellaïche, Y. and Graner, F. (2013a). Comparative study of non-invasive force and stress inference methods in tissue. *Eur. Phys. J. E* **36**, 45.
- Ishihara, S., Yasuda, M., Harada, I., Mizutani, T., Kawabata, K. and Haga, H. (2013b). Substrate stiffness regulates temporary NF-??B activation via actomyosin contractions. *Exp. Cell Res.* **319**, 2916–2927.
- Ishiyama, N. and Ikura, M. (2012). Adherens Junctions: from Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease. Subcell. Biochem. 60, 39–62.
- Ishiyama, N., Lee, S. H., Liu, S., Li, G. Y., Smith, M. J., Reichardt, L. F. and Ikura, M. (2010). Dynamic and Static Interactions between p120 Catenin and E-Cadherin Regulate the Stability of Cell-Cell Adhesion. *Cell* 141, 117–128.
- Ishiyama, N., Tanaka, N., Abe, K., Yang, Y. J., Abbas, Y. M., Umitsu, M., Nagar, B., Bueler, S. A., Rubinstein, J. L., Takeichi,

M., et al. (2013). An autoinhibited structure of α -catenin and its implications for vinculin recruitment to adherens junctions. *J. Biol. Chem.* **288**, 15913–15925.

- Ito, K., Okamoto, I., Araki, N., Kawano, Y., Nakao, M., Fujiyama, S., Tomita, K., Mimori, T. and Saya, H. (1999). Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. Oncogene 18, 7080–7090.
- Ivanov, A. I. (2003). Endocytosis of Epithelial Apical Junctional Proteins by a Clathrin-mediated Pathway into a Unique Storage Compartment. *Mol. Biol. Cell* **15**, 176–188.
- Iwashita, M., Kataoka, N., Toida, K. and Kosodo, Y. (2014). Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain. *Development* 141, 3793–3798.
- Izard, T., Evans, G., Borgon, R. A., Rush, C. L., Bricogne, G. and Bois, P. R. J. (2004). Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature* **427**, 171–175.
- Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K. and Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. J. Cell Biol. 166, 237–248.
- Jaalouk, D. E. and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 63–73.
- Jang, H., Notbohm, J., Gweon, B., Cho, Y., Park, C. Y., Kee, S.-H., Fredberg, J. J., Shin, J. H. and Park, Y. (2017). Homogenizing cellular tension by hepatocyte growth factor in expanding epithelial monolayer. *Sci. Rep.* 8, 45844.
- Jares-Erijman, E. a and Jovin, T. M. (2003). FRET imaging. Nat. Biotechnol. 21, 1387–1395.
- Jasaitis, A., Estevez, M., Heysch, J., Ladoux, B. and Dufour, S. (2012). E-cadherin-dependent stimulation of traction force at focal adhesions via the Src and PI3K signaling pathways. *Biophys. J.* **103**, 175–184.
- Jean, C., Blanc, A., Prade-Houdellier, N., Ysebaert, L., Hernandez-Pigeon, H., Saati, T. Al, Haure, M. J., Coluccia, A. M. L., Charveron, M., Delabesse, E., et al. (2009). Epidermal growth factor receptor/β-catenin/t-cell factor 4/matrix metalloproteinase 1: A new pathway for regulating keratinocyte invasiveness after UVA irradiation. *Cancer Res.* **69**, 3291–3299.
- Jégou, A., Carlier, M.-F. and Romet-Lemonne, G. (2013). Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments. *Nat. Commun.* 4, 1883.
- Kadono, Y., Okada, Y., Namiki, M., Seiki, M. and Sato, H. (1998). Transformation of epithelial Madin-Darby canine kidney cells with p60(v-src) induces expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness. *Cancer Res.* 58, 2240–2244.
- Kahn, J., Shwartz, Y., Blitz, E., Krief, S., Sharir, A., Breitel, D. A., Rattenbach, R., Relaix, F., Maire, P., Rountree, R. B., et al. (2009). Muscle Contraction Is Necessary to Maintain Joint Progenitor Cell Fate. *Dev. Cell* **16**, 734–743.
- Kam, Y. and Quaranta, V. (2009). Cadherin-bound beta-catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between beta-catenin pools. *PLoS One* **4**, e4580.
- Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T., Kodama, a, Yokoyama, S., Peng, Y. F., Nakano, K., Takaishi, K. and Takai, Y. (1999). Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. Oncogene 18, 6776–84.
- Kamimura, S. and Takahashi, K. (1981). Direct measurement of the force of microtubule sliding in flagella. *Nature* 293, 566–568.
- Kanungo, J., Pratt, S. J., Marie, H. and Longmore, G. D. (2000). Ajuba, a cytosolic LIM protein, shuttles into the nucleus and affects embryonal cell proliferation and fate decisions. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3299–3313.
- Kartenbeck, J., Schmid, E., Franke, W. W. and Geiger, B. (1982). Different modes of internalization of proteins associated with adhaerens junctions and desmosomes: experimental separation of lateral contacts induces endocytosis of desmosomal plaque material. *EMBO J.* 1, 725–32.
- Kelley, M., Yochem, J., Krieg, M., Calixto, A., Heiman, M. G., Kuzmanov, A., Meli, V., Chalfie, M., Goodman, M. B., Shaham, S., et al. (2015). FBN-1, a fibrillin-related protein, is required for resistance of the epidermis to mechanical deformation during\n C. elegans\n embryogenesis. *Elife* 4, 1–30.
- Khachigian, L. M., Resnick, N., Gimbrone, M. A. and Collins, T. (1995). Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. J. Clin. Invest. 96, 1169–1175.
- Kim, K. M., Choi, Y. J., Hwang, J. H., Kim, A. R., Cho, H. J., Hwang, E. S., Park, J. Y., Lee, S. H. and Hong, J. H. (2014). Shear stress induced by an interstitial level of slow flow increases the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through TAZ activation. *PLoS One* 9,.
- Kim, T. J., Zheng, S., Sun, J., Muhamed, I., Wu, J., Lei, L., Kong, X., Leckband, D. E. and Wang, Y. (2015). Dynamic visualization of ??-catenin reveals rapid, reversible conformation switching between tension states. *Curr. Biol.* 25, 218–224.
- Kim, M., Kim, S., Lee, S.-H., Kim, W., Sohn, M.-J., Kim, H.-S., Kim, J. and Jho, E.-H. (2016). Merlin inhibits Wnt/β-catenin signaling by blocking LRP6 phosphorylation. *Cell Death Differ*. 23, 1638–1647.
- Kinch, M. S., Clark, G. J., Der, C. J. and Burridge, K. (1995). Tyrosine Phosphorylation Regulates the Adhesions of Rastransformed Breast Epithelia. J. Cell Biol. 130, 461–471.
- Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. J. Cell Biol. 130, 67–77.
- Koike, M., Kose, S., Furuta, M., Taniguchi, N., Yokoya, F., Yoneda, Y. and Imamoto, N. (2004). B-Catenin Shows an Overlapping Sequence Requirement But Distinct Molecular Interactions for Its Bidirectional Passage Through Nuclear Pores. J. Biol. Chem. 279, 34038–34047.

- Kolodney, M. S. and Elson, E. L. (1995). Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10252–10256.
- Kong, F., García, A. J., Mould, A. P., Humphries, M. J. and Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. J. Cell Biol. 185, 1275–1284.
- Kong, F., Li, Z., Parks, W. M., Dumbauld, D. W., García, A. J., Mould, A. P., Humphries, M. J. and Zhu, C. (2013). Cyclic mechanical reinforcement of integrin-ligand interactions. *Mol. Cell* 49, 1060–1068.
- Koraishy, F. M., Silva, C., Mason, S., Wu, D. and Cantley, L. G. (2014). Hepatocyte growth factor (Hgf) stimulates low density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) 5/6 phosphorylation and promotes canonical Wnt signaling. J. Biol. Chem. 289, 14341–14350.
- Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 14725–14730.
- Kowalczyk, A. P. and Nanes, B. A. (2012). Adherens Junction Turnover: Regulating Adhesion Through Cadherin Endocytosis, Degradation, and Recycling. In (ed. Harris, T.), pp. 197–222. Dordrecht.
- Kraning-Rush, C. M., Carey, S. P., Califano, J. P., Smith, B. N. and Reinhart-King, C. A. (2011). The role of the cytoskeleton in cellular force generation in 2D and 3D environments. *Phys. Biol.* 8, 15009.
- Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.-H., Käfer, J., Graner, F., Müller, D. J. and Heisenberg, C.-P. C.-P. (2008). Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat. Cell Biol.* **10**, 429–36.
- Krieg, M., Dunn, A. R. and Goodman, M. B. (2014). Mechanical control of the sense of touch by β-spectrin. Nat. Cell Biol. 16, 224–33.
- Krieghoff, E., Behrens, J. and Mayr, B. (2006). Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. J. *Cell Sci.* **119**, 1453–63.
- Kumar, A., Murphy, R., Robinson, P., Wei, L. and Boriek, A. M. (2004). Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF-kappaB transcription factor. FASEB J. 18, 1524– 1535.
- Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., Mazur, E. and Ingber, D. E. (2006). Viscoelastic Retraction of Single Living Stress Fibers and Its Impact on Cell Shape, Cytoskeletal Organization, and Extracellular Matrix Mechanics. *Biophys. J.* **90**, 3762–3773.
- Kumar, A., Ouyang, M., Van den Dries, K., McGhee, E. J., Tanaka, K., Anderson, M. D., Groisman, A., Goult, B. T., Anderson, K. I. and Schwartz, M. A. (2016). Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. J. Cell Biol. 213, 371–383.
- Kuphal, F. and Behrens, J. (2006). E-cadherin modulates Wht-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wht-independent gene expression in fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **312**, 457–467.
- Kuriyama, S., Theveneau, E., Benedetto, A., Parsons, M., Tanaka, M., Charras, G., Kabla, A. and Mayor, R. (2014). In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity. J. Cell Biol. 206, 113–127.
- LaCroix, A. S., Rothenberg, K. E. and Hoffman, B. D. (2015). Molecular-Scale Tools for Studying Mechanotransduction. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 17, 287–316.
- Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P. and Mège, R. M. (2010). Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophys. J.* **98**, 534–542.
- Lai, J. F., Kao, S. C., Jiang, S. T., Tang, M. J., Chan, P. C. and Chen, H. C. (2000). Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells. J. Biol. Chem. 275, 7474–80.
- Lallemand, D., Curto, M., Saotome, I., Giovannini, M. and McClatchey, A. I. (2003). NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev.* **17**, 1090–1100.
- Lambert, M., Choquet, D. and Mège, R. M. (2002). Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. J. Cell Biol. 157, 469–479.
- Lapébie, P., Gazave, E., Ereskovsky, A., Derelle, R., Bézac, C., Renard, E., Houliston, E. and Borchiellini, C. (2009). WNT/βcatenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge Oscarella. *PLoS One* **4**, 1–7.
- Lara-Castillo, N., Kim-Weroha, N. A., Kamel, M. A., Javaheri, B., Ellies, D. L., Krumlauf, R. E., Thiagarajan, G. and Johnson, M. L. (2015). In vivo mechanical loading rapidly activates ??-catenin signaling in osteocytes through a prostaglandin mediated mechanism. *Bone* 76, 58–66.
- Lawler, K., O'Sullivan, G., Long, A. and Kenny, D. (2009). Shear stress induces internalization of E-cadherin and invasiveness in metastatic oesophageal cancer cells by a Src-dependent pathway. *Cancer Sci.* **100**, 1082–1087.
- Lázaro-Diéguez, F. and Müsch, A. (2017). Cell–cell adhesion accounts for the different orientation of columnar and hepatocytic cell divisions. *J. Cell Biol.* jcb.201608065.
- Le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D. and De Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates Ecadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin IIdependent manner. J. Cell Biol. 189, 1107–1115.
- Leckband, D. E. and de Rooij, J. (2014). Cadherin Adhesion and Mechanotransduction. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 30, 291– 315.
- Lee, L. M. and Liu, A. P. (2015). A microfluidic pipette array for mechanophenotyping of cancer cells and mechanical gating of mechanosensitive channels. *Lab Chip* 15, 264–73.
- Lee, J., Leonard, M., T.liver, Ishihara, A. and Jacobson, K. (1994). Traction Forces Generated by Locomting Keratocytes. J. Cell Biol. 127, 1957–1964.
- Lee, H. S., Millward-Sadler, S. J., Wright, M. O., Nuki, G. and Salter, D. M. (2000). Integrin and mechanosensitive ion

channel-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and beta-catenin in human articular chondrocytes after mechanical stimulation. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 1501–9.

- Lee, E., Salic, A., Krüger, R., Heinrich, R. and Kirschner, M. W. (2003). The roles of APC and axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol.* **1**, 116–132.
- Leerberg, J. M., Gomez, G. A., Verma, S., Moussa, E. J., Wu, S. K., Priya, R., Hoffman, B. D., Grashoff, C., Schwartz, M. A. and Yap, A. S. (2014). Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Curr. Biol.* 24, 1689–1699.
- Lele, T. P., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J. and Ingber, D. E. (2006). Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. J. Cell. Physiol. 207, 187–194.
- Lessey, E. C., Guilluy, C. and Burridge, K. (2012). From mechanical force to RhoA activation. Biochemistry 51, 7420–7432.
- Levental, I., Georges, P. C. and Janmey, P. A. (2007). Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 3, 299–306.
- Li, F., Guo, W. yi, Li, W. jie, Zhang, D. xin, Lv, A. lin, Luan, R. hua, Liu, B. and Wang, H. chang (2009). Cyclic stretch upregulates SDF-1α/CXCR4 axis in human saphenous vein smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 247–251.
- Li, W., You, L., Cooper, J., Schiavon, G., Pepe-caprio, A., Zhou, L., Ishii, R., Giovannini, M., Hanemann, C. O., Long, S. B., et al. (2010). Merlin / NF2 Suppresses Tumorigenesis by Inhibiting the E3 Ubiquitin Ligase CRL4 DCAF1 in the Nucleus. *Cell* 140, 477–490.
- Li, W., Cooper, J., Karajannis, M. A. and Giancotti, F. G. (2012). Merlin: a tumour suppressor with functions at the cell cortex and in the nucleus. *EMBO Rep.* 13, 204–15.
- Li, W., Cooper, J., Zhou, L., Yang, C., Erdjument-Bromage, H., Zagzag, D., Snuderl, M., Ladanyi, M., Hanemann, C. O., Zhou,
 P., et al. (2014). Merlin/NF2 Loss-Driven Tumorigenesis Linked to CRL4DCAF1-Mediated Inhibition of the Hippo Pathway Kinases Lats1 and 2 in the Nucleus. *Cancer Cell* 26, 48–60.
- Li, R., Knight, J. F., Park, M. and Pendergast, A. M. (2015). Abl kinases regulate HGF/Met signaling required for epithelial cell scattering, tubulogenesis and motility. *PLoS One* 10, 1–23.
- Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B. I., Freund, J. N. and Kemler, R. (2000). Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. Development 127, 3805–3813.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F. J., Li, Y., Schaller, M. D. and Eck, M. J. (2007). Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell* **129**, 1177–1187.
- Liou, G. I., Matragoon, S., Samuel, S., Behzadian, M. A., Tsai, N.-T., Gu, X., Roon, P., Hunt, D. M., Hunt, R. C., Caldwell, R. B., et al. (2002). MAP kinase and beta-catenin signaling in HGF induced RPE migration. *Mol. Vis.* **8**, 483–93.
- Liu, W. F., Nelson, C. M., Tan, J. L. and Chen, C. S. (2007). Cadherins, RhoA, and Rac1 are differentially required for stretchmediated proliferation in endothelial versus smooth muscle cells. *Circ. Res.* **101**,.
- Liu, Z., Tan, J. L., Cohen, D. M., Yang, M. T., Sniadecki, N. J., Alom, S., Nelson, C. M. and Chen, C. S. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell cell junctions.
- Liu, Z., Bun, P., Audugé, N., Coppey-Moisan, M. and Borghi, N. (2016). Vinculin head-tail interaction defines multiple early mechanisms for cell substrate rigidity sensing. *Integr. Biol.* 8, 693–703.
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. and Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79, 144–152.
- Loerke, D., le Duc, Q., Blonk, I., Kerstens, a., Spanjaard, E., Machacek, M., Danuser, G. and de Rooij, J. (2012). Quantitative Imaging of Epithelial Cell Scattering Identifies Specific Inhibitors of Cell Motility and Cell-Cell Dissociation. *Sci. Signal.* 5, rs5-rs5.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z. and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of Ecadherin, increased transcriptional activity of ??-catenin, and enhanced tumor cell invasion. Cancer Cell 4, 499–515.
- Lyons, J. P., Mueller, U. W., Ji, H., Everett, C., Fang, X., Hsieh, J. C., Barth, A. M. and McCrea, P. D. (2004). Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: Functional implications of Wnt/betacatenin activity in kidney epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 298, 369–387.
- MacLean, A. L., Rosen, Z., Byrne, H. M. and Harrington, H. A. (2015). Parameter-free methods distinguish Wnt pathway models and guide design of experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 2652–2657.
- Maher, M. T., Flozak, A. S., Stocker, A. M., Chenn, A. and Gottardi, C. J. (2009). Activity of the β-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. J. Cell Biol. 186, 219–228.
- Maître, J.-L., Berthoumieux, H., Krens, S. F. G., Salbreux, G., Jülicher, F., Paluch, E., Heisenberg, C.-P. C.-P., Maitre, J.-L., Berthoumieux, H., Krens, S. F. G., et al. (2012). Adhesion Functions in Cell Sorting by Mechanically Coupling the Cortices of Adhering Cells. *Science* 338, 253–6.
- Maître, J.-L., Turlier, H., Illukkumbura, R., Eismann, B., Niwayama, R., Nédélec, F. and Hiiragi, T. (2016). Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* **536**, 344–348.
- Mangold, S., Wu, S. K., Norwood, S. J., Collins, B. M., Hamilton, N. A., Thorn, P. and Yap, A. S. (2011). Hepatocyte growth factor acutely perturbs actin filament anchorage at the epithelial zonula adherens. *Curr. Biol.* **21**, 503–507.
- Manosas, M., Perumal, S. K., Bianco, P., Ritort, F., Benkovic, S. J. and Croquette, V. (2013). RecG and UvsW catalyse robust DNA rewinding critical for stalled DNA replication fork rescue. *Nat. Commun.* **4**, 1–11.
- Mao, W., Irby, R., Coppola, D., Fu, L., Wloch, M., Turner, J., Yu, H., Garcia, R., Jove, R. and Yeatman, T. J. (1997). Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential. *Oncogene* **15**, 3083–

3090

- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao,
 Z., et al. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 21, 1948–56.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.-F. and Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion: A direct measurement by micromanipulation. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 5992–5997.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 9182–9187.
- Margadant, F., Chew, L. L., Hu, X., Yu, H., Bate, N., Zhang, X. and Sheetz, M. (2011). Mechanotransduction in vivo by repeated talin stretch-relaxation events depends upon vinculin. *PLoS Biol.* **9**,.
- Marie, H., Pratt, S. J., Betson, M., Epple, H., Kittler, J. T., Meek, L., Moss, S. J., Troyanovsky, S., Attwell, D., Longmore, G.
 D., et al. (2003). The LIM protein ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with α-catenin. J. Biol. Chem. 278, 1220–1228.
- Marsden, M. and DeSimone, D. W. (2003). Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in Xenopus. *Curr. Biol.* 13, 1182–1191.
- Marshall, B. T., Long, M., Piper, J. W., Yago, T., McEver, R. P. and Zhu, C. (2003). Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* 423, 190–193.
- Martinac, B. (2004). Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. J. Cell Sci. 117, 2449–2460.
- Martinez-Rico, C., Pincet, F., Thiery, J.-P. and Dufour, S. (2010). Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. J. Cell Sci. 123, 712–722.
- Martynova, N. Y., Eroshkin, F. M., Ermolina, L. V., Ermakova, G. V., Korotaeva, A. L., Smurova, K. M., Gyoeva, F. K. and Zaraisky, A. G. (2008). The LIM-domain protein zyxin binds the homeodomain factor Xanf1/Hesx1 and modulates its activity in the anterior neural plate of Xenopus laevis embryo. *Dev. Dyn.* 237, 736–749.
- Maruthamuthu, V. and Gardel, M. L. (2014). Protrusive activity guides changes in cell-cell tension during epithelial cell scattering. *Biophys. J.* 107, 555–563.
- Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U. S. and Gardel, M. L. (2011). Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4708–13.
- Masszi, A., Fan, L., Rosivall, L., McCulloch, C. A., Rotstein, O. D., Mucsi, I. and Kapus, A. (2004). Integrity of Cell-Cell Contacts Is a Critical Regulator of TGF-β1-Induced Epithelial-to-Myofibroblast Transition. *Am. J. Pathol.* **165**, 1955– 1967.
- Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S. and Nishida, E. (2004). ERK Activation Propagates in Epithelial Cell Sheets and Regulates Their Migration during Wound Healing. *Curr. Biol.* **14**, 731–735.
- Matsuyoshi, N., Hamaguchi, M., Taniguchi, S., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1992). Cadherin-mediated cellcell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. J. Cell Biol. 118, 703–714.
- Matteucci, E., Ridolfi, E. and Desiderio, M. A. (2006). Hepatocyte growth factor differently influences Met-E-cadherin phosphorylation and downstream signaling pathway in two models of breast cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2016–2026.
- Mayer, M., Depken, M., Bois, J. S., Jülicher, F. and Grill, S. W. (2010). Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature* **467**, 617–621.
- Mazuel, F., Reffay, M., Du, V., Bacri, J. C., Rieu, J. P. and Wilhelm, C. (2015). Magnetic flattening of stem-cell spheroids indicates a size-dependent elastocapillary transition. *Phys. Rev. Lett.* **114**, 1–5.
- McBride, D. W. and Hamill, O. P. (1992). Pressure-clamp: a method for rapid step perturbation of mechanosensitive channels. *Pflugers Arch.* **421**, 606–12.
- McCain, M. L., Lee, H., Aratyn-Schaus, Y., Kleber, A. G. and Parker, K. K. (2012). Cooperative coupling of cell-matrix and cell-cell adhesions in cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9881–9886.
- McCrea, P. and Gumbiner, B. M. (1991). Purification of a 92-kDa Cytoplasmic Protein Tightly Associated with the Cell-Cell Adhesion Molecule E-cadherin (Uvomorulin). 266, 4514–4520.
- McEvoy, A. L., Hoi, H., Bates, M., Platonova, E., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Davidson, M. W., Ewers, H., Liphardt, J. and Campbell, R. E. (2012). mMaple: A Photoconvertible Fluorescent Protein for Use in Multiple Imaging Modalities. *PLoS One* 7,.
- McEwen, A. E., Maher, M. T., Mo, R. and Gottardi, C. J. (2014). E-cadherin phosphorylation occurs during its biosynthesis to promote its cell surface stability and adhesion. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2365–2374.
- Mège, R. M. and Ishiyama, N. (2017). Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. a028738.
- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S. and Cheney, R. E. (1999). Myosin-V is a processive actinbased motor. *Nature* 400, 590–3.
- Meng, F. and Sachs, F. (2011). Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched FRET sensor. J. Cell Sci. 124, 261–269.
- Meng, F. and Sachs, F. (2012). Orientation-based FRET sensor for real-time imaging of cellular forces. J. Cell Sci. 125, 743–750.
- Meng, F., Suchyna, T. M. and Sachs, F. (2008). A FRET based mechanical stress sensor for specific proteins in situ. FEBS J 275, 3072–3087.
- Menke, A. and Giehl, K. (2012). Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. Arch. Biochem. Biophys.

524, 48–55.

- Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. and Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**, 50–53.
- Mertz, A. F., Che, Y., Banerjee, S., Goldstein, J. M., Rosowski, K. a and Revilla, S. F. (2013). Epithelial Cell Matrix Traction Forces. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 842–847.
- Mgharbel, A., Delanoë-Ayari, H. and Rieu, J.-P. (2009). Measuring accurately liquid and tissue surface tension with a compression plate tensiometer. *HFSP J.* **3**, 213–21.
- Michael, M., Meiring, J. C. M., Acharya, B. R., Matthews, D. R., Verma, S., Han, S. P., Hill, M. M., Parton, R. G., Gomez, G. A. and Yap, A. S. (2016). Coronin 1B Reorganizes the Architecture of F-Actin Networks for Contractility at Steady-State and Apoptotic Adherens Junctions. *Dev. Cell* 37, 58–71.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I. and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329–342.
- Miroshnikova, Y. A., Rozenberg, G. I., Cassereau, L., Pickup, M., Mouw, J. K., Ou, G., Templeman, K. L., Elloumi-Hannachi,
 I., Gooch, K. J., Sarang-Sieminski, A. L., et al. (2017). α5β1-integrinpromotes tension-dependent mammary epithelial cell invasion by engaging the fibronectin synergy site. *Mol. Biol. Cell* mbc.E17-02-0126.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 56–68.
- Miura, H., Nishimura, K., Tsujimura, A., Matsumiya, K., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Okuyama, A. (2001). Effects of hepatocyte growth factor on E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in DU145 prostate cancer cells. Urology 58, 1064–1069.
- Miyata, H., Nishiyama, S., Akashi, K. and Kinosita, K. (1999). Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2048–2053.
- Moalli, M. R., Wang, S., Caldwell, N. J., Patil, P. V and Maynard, C. R. (2001). Mechanical stimulation induces pp125FAK and pp60 src activity in an in vivo model of trabecular bone formation. *J. Appl. Physiol.* **91**, 912.
- Mogilner, A. and Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. Biophys. J. 71, 3030–3045.
- Mogilner, A. and Rubinstein, B. (2005). The Physics of Filopodial Protrusion. Biophys. J. 89, 782–795.
- Mohan, S., Koyoma, K., Thangasamy, A., Nakano, H., Glickman, R. D. and Mohan, N. (2006). Low shear stress preferentially enhances IKK activity through selective sources of ROS for persistent activation of NF- B in endothelial cells. *AJP Cell Physiol.* 292, C362–C371.
- Moissoglu, K. and Gelman, I. H. (2003). v-Src Rescues Actin-based Cytoskeletal Architecture and Cell Motility and Induces Enhanced Anchorage Independence during Oncogenic Transformation of Focal Adhesion Kinase-null Fibroblasts. J. Biol. Chem. 278, 47946–47959.
- Molenaar, M., Van De Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destrée,
 O. and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in xenopus embryos. *Cell* 86, 391–399.
- Molina, T., Kabsch, K., Alonso, a, Kohl, a, Komposch, G. and Tomakidi, P. (2001). Topographic changes of focal adhesion components and modulation of p125FAK activation in stretched human periodontal ligament fibroblasts. J. Dent. Res. 80, 1984–1989.
- Molino, D., Quignard, S., Gruget, C., Pincet, F., Chen, Y., Piel, M. and Fattaccioli, J. (2016). On-Chip Quantitative Measurement of Mechanical Stresses During Cell Migration with Emulsion Droplets. *Sci. Rep.* 6, 29113.
- Monga, S. P. S., Mars, W. M., Pediaditakis, P., Bell, A., Mule, K., Bowen, W. C., Wang, X., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.
 K., Mulé, K., et al. (2002). Hepatocyte Growth Factor Induces Wnt-independent Nuclear Translocation of {beta}-Catenin after Met-{beta}-Catenin Dissociation in Hepatocytes. *Cancer Res.* 62, 2064–2071.
- Montoya-Durango, D. E., Velu, C. S., Kazanjian, A., Rojas, M. E. B., Jay, C. M., Longmore, G. D. and Grimes, H. L. (2008). Ajuba functions as a histone deacetylase-dependent co-repressor for autoregulation of the growth factorindependent-1 transcription factor. J. Biol. Chem. **283**, 32056–32065.
- Montross, W. T., Ji, H. and McCrea, P. D. (2000). A beta-catenin/engrailed chimera selectively suppresses Wnt signaling. J Cell Sci 113 (Pt 1, 1759–1770.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691–701.
- Moore, A. R. and Burt, A. S. (1939). On the locus and nature of the forces causing gastrulation in the embryos of Dendraster excentricus. J. Exp. Zool. 82, 159–171.
- Morimatsu, M., Mekhdjian, A. H., Adhikari, A. S. and Dunn, A. R. (2013). Molecular tension sensors report forces generated by single integrin molecules in living cells. *Nano Lett.* **13**, 3985–3989.
- Morin, P. J. (1999). Signaling and Cancer. *BioEssays* **21**, 1021–1030.
- Muhamed, I., Wu, J., Sehgal, P., Kong, X., Tajik, A., Wang, N. and Leckband, D. E. (2016). E-cadherin-mediated force transduction signals regulate global cell mechanics. *J. Cell Sci.* **129**, 1843–1854.
- Mui, K. L., Chen, C. S. and Assoian, R. K. (2016). The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. J. Cell Sci. 129, 1093–1100.
- Mukherjee, M., Chow, S. Y., Yusoff, P., Seetharaman, J., Ng, C., Sinniah, S., Koh, X. W., Asgar, N. F. M., Li, D., Yim, D., et al. (2012). Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. *EMBO J.* 31, 1308– 1319.
- Mukundan, V., Nelson, W. J. and Pruitt, B. L. (2013). Microactuator device for integrated measurement of epithelium

mechanics. Biomed. Microdevices 15, 117-123.

- Müller, T. (2002). Regulation of Epithelial Cell Migration and Tumor Formation by β-Catenin Signaling. *Exp. Cell Res.* **280**, 119–133.
- Muranen, T., Grönholm, M., Renkema, G. H. and Carpén, O. (2005). Cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling of the neurofibromatosis 2 tumour suppressor merlin. *Oncogene* 24, 1150–1158.
- Murase, S., Mosser, E. and Schuman, E. M. (2002). Depolarization drives β-catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* **35**, 91–105.
- Na, S., Collin, O., Chowdhury, F., Tay, B., Ouyang, M., Wang, Y. and Wang, N. (2008). Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6626–6631.
- Nagafuchi, A., Ishihara, S. and Tsukita, S. (1994). The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: Functional analysis of E-cadherin-?? catenin fusion molecules. J. Cell Biol. 127, 235–245.
- Nahas, A., Bauer, M., Roux, S. and Boccara, A. C. (2013). 3D static elastography at the micrometer scale using Full Field OCT. *Biomed. Opt. Express* 4, 2138.
- Nakayama, K., Obara, K., Tanabe, Y., Saito, M., Ishikawa, T. and Nishizawa, S. (2003). Interactive role of tyrosine kinase, protein kinase C, and Rho/Rho kinase systems in the mechanotransduction of vascular smooth muscles. *Biorheology* 40, 307–14.
- Nanes, B. A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A. M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P. A. and Kowalczyk,
 A. P. (2012). P120-Catenin Binding Masks an Endocytic Signal Conserved in Classical Cadherins. J. Cell Biol. 199, 365–380.
- Nelson, C. M., Pirone, D. M., Tan, J. L. and Chen, C. S. (2004). Vascular Endothelial-Cadherin Regulates Cytoskeletal Tension, Cell Spreading, and Focal Adhesions by Stimulating RhoA. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2943–2953.
- Ng, M. R. osa, Besser, A., Brugge, J. S. and Danuser, G. (2014). Mapping the dynamics of force transduction at cell-cell junctions of epithelial clusters. *Elife* 3, e03282.
- Nichols, S. A., Roberts, B. W., Richter, D. J., Fairclough, S. R. and King, N. (2012). Origin of metazoan cadherin diversity and the antiquity of the classical cadherin/β-catenin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13046–51.
- Nier, V., Jain, S., Lim, C. T., Ishihara, S., Ladoux, B. and Marcq, P. (2016). Inference of Internal Stress in a Cell Monolayer. Biophys. J. 110, 1625–1635.
- Niessen, C. M., Leckband, D. and Yap, A. S. (2011). Tissue Organization by Cadherin Adhesion Molecules: Dynamic Molecular and Cellular Mechanisms of Morphogenetic Regulation. *Physiol. Rev.* **91**, 691–731.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Noireaux, V., Golsteyn, R. M., Friederich, E., Prost, J., Antony, C., Louvard, D. and Sykes, C. (2000). Growing an Actin Gel on Spherical Surfaces. *Biophys. J.* 78, 1643–1654.
- Nordenfelt, P., Elliott, H. L. and Springer, T. A. (2016). Coordinated integrin activation by actin-dependent force during Tcell migration. *Nat. Commun.* 7, 13119.
- Norvell, S. M., Alvarez, M., Bidwell, J. P. and Pavalko, F. M. (2004). Fluid shear stress induces β-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* **75**, 396–404.
- Notbohm, J., Kim, J. H., Asthagiri, A. R. and Ravichandran, G. (2012). Three-dimensional analysis of the effect of epidermal growth factor on cell-cell adhesion in epithelial cell clusters. *Biophys. J.* **102**, 1323–1330.
- Ohashi, T., Galiacy, S. D., Briscoe, G. and Erickson, H. P. (2007). An experimental study of GFP-based FRET, with application to intrinsically unstructured proteins. *Protein Sci.* 16, 1429–1438.
- Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G. D., Sidhu, S. S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., et al. (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* **432**, 461–478.
- **Oldenburg**, J., van der Krogt, G., Twiss, F., Bongaarts, A., Habani, Y., Slotman, J. A., Houtsmuller, A., Huveneers, S. and de **Rooij**, J. (2015). VASP, zyxin and TES are tension-dependent members of Focal Adherens Junctions independent of the α-catenin-vinculin module. *Sci. Rep.* **5**, 17225.
- Olson, E. N. and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 353–65.
- Omelchenko, T., Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M., Feder, H. H. and Bonder, E. M. (2003). Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 10788–93.
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S. and Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Organ, S. L. and Tsao, M.-S. (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. Ther. Adv. Med. Oncol. 3, S7–S19.
- Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S. and Kemler, R. (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. J. Cell Sci. 112 (Pt 8, 1237–1245.
- Palacios, F. and D'Souza-Schorey, C. (2003). Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. J. Biol. Chem. 278, 17395–17400.
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G. and D'Souza-Schorey, C. (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J.* 20, 4973–4986.
- Palacios, F., Schweitzer, J. K., Boshans, R. L. and D'Souza-Schorey, C. (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat. Cell Biol.* **4**, 929–936.
- Palacios, F., Tushir, J. S., Fujita, Y. and D'Souza-Schorey, C. (2005). Lysosomal Targeting of E-Cadherin: a Unique Mechanism

for the Down-Regulation of Cell-Cell Adhesion during Epithelial to Mesenchymal Transitions. *Mol. Cell. Biol.* 25, 389–402.

- Palka-Hamblin, H. L., Gierut, J. J., Bie, W., Brauer, P. M., Zheng, Y., Asara, J. M. and Tyner, A. L. (2010). Identification of beta-catenin as a target of the intracellular tyrosine kinase PTK6. *J. Cell Sci.* **123**, 236–245.
- Palovuori, R., Sormunen, R. and Eskelinen, S. (2003). SRC-induced disintegration of adherens junctions of madin-darby canine kidney cells is dependent on endocytosis of cadherin and antagonized by Tiam-1. *Lab. Invest.* 83, 1901–1915.
- Papadopulos, A., Gomez, G. a, Martin, S., Jackson, J., Gormal, R. S., Keating, D. J., Yap, A. S. and Meunier, F. a (2015). Activity-driven relaxation of the cortical actomyosin II network synchronizes Munc18-1-dependent neurosecretory vesicle docking. *Nat. Commun.* 6, 6297.
- Papkoff, J. (1997). Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. J. Biol. Chem. 272, 4536–43.
- **Papkoff, J. and Aikawa, M.** (1998). WNT-1 and HGF Regulate GSK3β Activity and β-Catenin Signaling in Mammary Epithelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 851–858.
- Parisini, E., Higgins, J. M. G., Liu, J., Brenner, M. B. and Wang, J. (2007). The Crystal Structure of Human E-cadherin Domains 1 and 2, and Comparison with other Cadherins in the Context of Adhesion Mechanism. J. Mol. Biol. **373**, 401–411.
- Pasapera, A. M., Schneider, I. C., Rericha, E., Schlaepfer, D. D. and Waterman, C. M. (2010). Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. J. Cell Biol. 188, 877–890.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241– 254.
- Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J. K., Godula, K., Hudak, J. E., Lakins, J. N., Wijekoon, A. C., Cassereau, L., et al. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* 511, 319–25.
- Paul, R. J., Bowman, P. S., Kolodney, M. S., Bowman, P. S. U. E., Richard, J. and Michael, S. (2013). Effects of microtubule disruption on force, velocity, stiffness and [Ca2+]i in porcine coronary arteries. Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 279, 2493–2501.
- Pedrigi, R. M., Papadimitriou, K. I., Kondiboyina, A., Sidhu, S., Chau, J., Patel, M. B., Baeriswyl, D. C., Drakakis, E. M. and Krams, R. (2017). Disturbed Cyclical Stretch of Endothelial Cells Promotes Nuclear Expression of the Pro-Atherogenic Transcription Factor NF-??B. Ann. Biomed. Eng. 45, 898–909.
- Peifer, M. and Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell* 63, 1167–76.
- Pellon-Cardenas, O., Clancy, J., Uwimpuhwe, H. and D'Souza-Schorey, C. (2013). ARF6-Regulated Endocytosis of Growth Factor Receptors Links Cadherin-Based Adhesion to Canonical Wnt Signaling in Epithelia. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2963– 2975.
- Peng, X., Cuff, L. E., Lawton, C. D. and DeMali, K. A. (2010). Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to -catenin. J. Cell Sci. 123, 567–577.
- Perez-jimenez, R., Liu, R., Roca-cusachs, P., Julio, M. and Sheetz, M. P. (2016). Stretching Single Talin Rod. Science (80-.). 323, 638–641.
- Petitjean, L., Reffay, M., Grasland-Mongrain, E., Poujade, M., Ladoux, B., Buguin, A. and Silberzan, P. (2010). Velocity fields in a collectively migrating epithelium. *Biophys. J.* **98**, 1790–1800.
- Petrie, R. J. and Yamada, K. M. (2016). Multiple mechanisms of 3D migration: The origins of plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 42, 7–12.
- Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T. and Frachisse, J.-M. (2014). Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. Front. Plant Sci. 5, 558.
- Phillips, B. T. and Kimble, J. (2014). A new look at TCF and β-catenin through the lens of a divergent C. elegans Wnt pathway. Dev. Cell 17, 27–34.
- Phoon, C. K. L., Aristizábal, O. and Turnbull, D. H. (2002). Spatial velocity profile in mouse embryonic aorta and Dopplerderived volumetric flow: a preliminary model. Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 283, H908–H916.
- Piccolo, S., Dupont, S. and Cordenonsi, M. (2014). The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiol. Rev.* 94, 1287–1312.
- Piedra, J., Martinez, D., Castano, J., Miravet, S., Dunach, M. and de Herreros, a G. (2001). Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 20436–43.
- Piedra, J., Miravet, S., Castaño, J., Héctor, G., Heisterkamp, N., Herreros, A. G. De, Castan, J. and Dun, M. (2003). p120Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate β -Catenin Tyr-142 Phosphorylation and β -Catenin- α -Catenin Interaction p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate * -Catenin Tyr-142

Phosphorylation and "-Catenin – _ -Ca. Mol. Cell. Biol. 23, 2287–2297.

- Pirruccello, M., Nandez, R., Idevall-hagren, O., Alcazar-roman, A., Abriola, L., Berwick, S. A., Lucast, L., Morel, D. and Camilli, P. De (2014). Identi fi cation of Inhibitors of Inositol 5 - Phosphatases through Multiple Screening Strategies.
- Pokutta, S. and Weis, W. I. (2000). Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol. Cell* 5, 533–43.
- Pokutta, S., Drees, F., Takai, Y., Nelson, W. J. and Weis, W. I. (2002). Biochemical and structural definition of the l-afadinand actin-binding sites of alpha-catenin. J. Biol. Chem. 277, 18868–74.

- **Pokutta, S., Choi, H.-J., Ahlsen, G., Hansen, S. D. and Weis, W. I.** (2014a). Structural and Thermodynamic Characterization of Cadherin-β-catenin-α-catenin Complex Formation. *J. Biol. Chem.* **289**, 13589–13601.
- **Pokutta, S., Choi, H.-J., Ahlsen, G., Hansen, S. D. and Weis, W. I.** (2014b). Structural and thermodynamic characterization of cadherin-β-catenin-α-catenin complex formation. *J. Biol. Chem.* **289**, 13589–601.
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 8, a018226.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–465.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. and Comoglio, P.
 M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261–271.
- Popsueva, A., Poteryaev, D., Arighi, E., Meng, X., Angers-Loustau, A., Kaplan, D., Saarma, M. and Sariola, H. (2003). GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. J. Cell Biol. 161, 119–129.
- Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, a, Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, a and Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15988–15993.
- Prass, M., Jacobson, K., Mogilner, A. and Radmacher, M. (2006). Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. J. Cell Biol. 174, 767–772.
- Price, A. J. and Dunn, A. R. (2016). Abstract 19413: A Genetically Encoded Tension Sensor for Desmoplakin. *Circulation* 134, A19413 LP-A19413.
- Price, C., Zhou, X., Li, W. and Wang, L. (2011). Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: Direct evidence for load-induced fluid flow. J. Bone Miner. Res. 26, 277–285.
- Priya, R., Gomez, G. A., Budnar, S., Verma, S., Cox, H. L., Hamilton, N. A. and Yap, A. S. (2015). Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1282–1293.
- Provenzano, P. P. and Keely, P. J. (2011). Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. J. Cell Sci. 124, 1195–1205.
- Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W. and Keely, P. J. (2009). Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. Oncogene 28, 4326–43.
- Pruitt, B. L., Dunn, A. R., Weis, W. I. and Nelson, W. J. (2014). Mechano-Transduction: From Molecules to Tissues. *PLoS Biol.* 12,.
- Puchner, E. M., Alexandrovich, A., Kho, A. L., Hensen, U., Schafer, L. V., Brandmeier, B., Grater, F., Grubmuller, H., Gaub, H. E. and Gautel, M. (2008). Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13385–13390.
- Purcell, T. J., Sweeney, H. L. and Spudich, J. a (2005). A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 13873–13878.
- Purcell, R., Childs, M., Maibach, R., Miles, C., Turner, C., Zimmermann, A. and Sullivan, M. (2011). HGF/c-Met related activation of β-catenin in hepatoblastoma. J. Exp. Clin. Cancer Res. 30, 96.
- Qi, Y. X., Qu, M. J., Yan, Z. Q., Zhao, D., Jiang, X. H., Shen, B. R. and Jiang, Z. L. (2010). Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDI??, Rac1, and p38 pathway. J. Cell. Biochem. 109, 906– 914.
- Qiu, Y., Wang, Y., Xu, Y., Chandra, N., Haorah, J., Hubbi, B., Pfister, B. J. and Liu, X. (2016). Quantitative optical coherence elastography based on fiber-optic probe for in situ measurement of tissue mechanical properties. *Biomed. Opt. Express* 7, 688.
- Quadri, S. K. (2012). Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: Role in regulating endothelial barrier function. *Microvasc. Res.* 83, 3–11.
- Rahimi, N., Hung, W., Tremblay, E., Saulnier, R. and Elliott, B. (1998). c-Src Kinase Activity Is Required for Hepatocyte Growth Factor-induced Motility and Anchorage-independent Growth of Mammary Carcinoma Cells. J. Biol. Chem. 273, 33714–33721.
- Rahimzadeh, J., Meng, F., Sachs, F., Wang, J., Verma, D. and Hua, S. Z. (2011). Real-time observation of flow-induced cytoskeletal stress in living cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, C646–C652.
- Rakshit, S., Zhang, Y., Manibog, K., Shafraz, O. and Sivasankar, S. (2012). Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 18815–18820.
- Ramms, L., Fabris, G., Windoffer, R., Schwarz, N., Springer, R., Zhou, C., Lazar, J., Stiefel, S., Hersch, N., Schnakenberg, U., et al. (2013). Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 18513–18518.
- Rand, R. P. and Burton, A. C. (1964). Mechanical Properties of the Red Cell Membrane: I. Membrane Stiffness and Intracellular Pressure. *Biophys. J.* 4, 115–135.
- Rangarajan, E. S. and Izard, T. (2012). The cytoskeletal protein alpha-catenin unfurls upon binding to vinculin. J. Biol. Chem. 287, 18492–18499.
- Rape, A., Guo, W. and Wang, Y. (2011). Microtubule depolymerization induces traction force increase through two distinct pathways. J. Cell Sci. 124, 4233–4240.
- Rasola, A., Fassetta, M., De Bacco, F., D 'alessandro, L., Gramaglia, D., Renzo, D. and Comoglio, P. (2007). A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and b-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. Oncogene 26, 1078–1087.

- Ratheesh, A., Gomez, G. A., Priya, R., Verma, S., Kovacs, E. M., Jiang, K., Brown, N. H., Akhmanova, A., Stehbens, S. J. and Yap, A. S. (2012). Centralspindlin and α-catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. *Nat. Cell Biol.* 14, 818–828.
- Rauch, C., Brunet, A.-C., Deleule, J. and Farge, E. (2002). C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C235–C243.
- Rauskolb, C., Sun, S., Sun, G., Pan, Y. and Irvine, K. D. (2014). Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell* **158**, 143–156.
- Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T. and Lenne, P.-F. (2008). Nature and anisotropy of cortical forces orienting Drosophila tissue morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1401–10.
- Reck-Peterson, S. L., Yildiz, A., Carter, A. P., Gennerich, A., Zhang, N. and Vale, R. D. (2006). Single-Molecule Analysis of Dynein Processivity and Stepping Behavior. *Cell* **126**, 335–348.
- Reffay, M., Parrini, M. C., Cochet-Escartin, O., Ladoux, B., Buguin, A., Coscoy, S., Amblard, F., Camonis, J. and Silberzan, P. (2014). Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat. Cell Biol.* 16, 217–23.
- Reich, K. M. and Frangos, J. A. (1991). Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* 261, C428-32.
- **Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P.** (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell–cell adhesion and β-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* **24**, 742–752.
- Revenu, C. and Gilmour, D. (2009). EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 338–342.
- Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J. and Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8333–42.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16, 522–529.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. J. Cell Biol. 153, 1175–1185.
- Robinson, J. A., Chatterjee-Kishore, M., Yaworsky, P. J., Cullen, D. M., Zhao, W., Li, C., Kharode, Y., Sauter, L., Babij, P., Brown, E. L., et al. (2006). Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. J. Biol. Chem. 281, 31720–31728.
- Roca-Cusachs, P., Gauthier, N. C., Del Rio, A. and Sheetz, M. P. (2009). Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16245–16250.
- Roca-Cusachs, P., Conte, V. and Trepat, X. (2017). Quantifying forces in cell biology. Nat. Cell Biol.
- Rodan, G. A., Bourret, L. A., Harvey, A. and Mensi, T. (1975). Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodeling. *Science* **189**, 467–9.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (80-.).* 234, 364–368.
- Rolland, Y., Marighetti, P., Malinverno, C., Confalonieri, S., Luise, C., Ducano, N., Palamidessi, A., Bisi, S., Kajiho, H., Troglio, F., et al. (2014). The CDC42-interacting protein 4 controls epithelial cell cohesion and tumor dissemination. Dev. Cell 30, 553–568.
- Rosen, E. M., Meromsky, L., Goldberg, I., Bhargava, M. and Setter, E. (1990). Studies on the mechanism of scatter factor. Effects of agents that modulate intracellular signal transduction, macromolecule synthesis and cytoskeleton assembly. J. Cell Sci. 96 (Pt 4), 639–649.
- Rossier, O., Octeau, V., Sibarita, J.-B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albigès-Rizo, C., Tampé, R., et al. (2012). Integrins β1 and β3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 14, 1057–1067.
- Rothenberg, K. E., Neibart, S. S., LaCroix, A. S. and Hoffman, B. D. (2015). Controlling Cell Geometry Affects the Spatial Distribution of Load Across Vinculin. *Cell. Mol. Bioeng.* **8**, 364–382.
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., García de Herreros, A. and Duñach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin Association by Tyrosine Phosphorylation. J. Biol. Chem. 274, 36734–36740.
- Rubashkin, M. G., Cassereau, L., Bainer, R., DuFort, C. C., Yui, Y., Ou, G., Paszek, M. J., Davidson, M. W., Chen, Y. Y. and Weaver, V. M. (2014). Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. *Cancer Res.* 74, 4597–4611.
- Saez, A., Ghibaudo, M., Buguin, A., Silberzan, P. and Ladoux, B. (2007). Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8281–6.
- Saez, A., Anon, E., Ghibaudo, M., du Roure, O., Di Meglio, J.-M., Hersen, P., Silberzan, P., Buguin, A. and Ladoux, B. (2010). Traction forces exerted by epithelial cell sheets. J. Phys. Condens. Matter 22, 194119.
- Sahai, E. and Marshall, C. J. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4, 408–415.
- Sai, X., Naruse, K. and Sokabe, M. (1999). Activation of pp60(src) is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts. J. Cell Sci. 112 (Pt 9, 1365–1373.
- Sampietro, J., Dahlberg, C. L., Cho, U. S., Hinds, T. R., Kimelman, D. and Xu, W. (2006). Crystal structure of a beta-

catenin/BCL9/Tcf4 complex. Mol. Cell 24, 293-300.

- Samuel, M. S., Lopez, J. I., McGhee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schröder, E., Zhou, J., Brunton,
 V. G., et al. (2011). Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and β-Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth. *Cancer Cell* 19, 776–791.
- Sanson, B., White, P., Vincent, J. P., Sanson, P. and Vincent, J. P. (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in Drosophila. *Nature* 383, 627–630.
- Santos, A., Bakker, A. D., Zandieh-Doulabi, B., de Blieck-Hogervorst, J. M. A. and Klein-Nulend, J. (2010). Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 364–369.
- Sarangi, B. R., Gupta, M., Doss, B. L., Tissot, N., Lam, F., Mège, R.-M., Borghi, N. and Ladoux, B. (2016). Coordination between Intra- and Extracellular Forces Regulates Focal Adhesion Dynamics. *Nano Lett.* acs.nanolett.6b04364.
- Sarvazyan, A. P., Rudenko, O. V, Swanson, S. D., Fowlkes, J. B. and Emelianov, S. Y. (1998). Shear Wave Elasticity Imaging : A new ultrasonic technology of medical diagnostic. *Ultrasound Med. Biol.* 24, 1419–1435.
- Sato, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M. and Kusumi, A. (1998). Cytoplasmic Regulation of the Movement of E-Cadherin on the Free Cell Surface as Studied by Optical Tweezers and Single Particle Tracking: Coralling and Tethering by the Membrane Skeleton. J. Cell. Biol. 140, 1227–1240.
- Sauer, M. M., Jakob, R. P., Eras, J., Baday, S., Eriş, D., Navarra, G., Bernèche, S., Ernst, B., Maier, T. and Glockshuber, R. (2016). Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nat. Commun.* **7**, 10738.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S. and Sheetz, M. P. (2006). Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas. *Cell* **127**, 1015–1026.
- Schaller, M. D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. J. Cell Sci. 123, 1007–1013.
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. A. Y. W., Vines, R. R. and Parsons, J. T. (1994). Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase , pp125FAK Directs SH2-Dependent Binding of pp60src. 14, 1680–1688.
- Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D. and Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillan bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. J. Cell Biol. 130, 1181–1187.
- Schernthaner, M., Reisinger, B., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Trantina-Yates, A., Fahrner, M., Romanin, C., Itani, H., Stifter, D., Leitinger, G., et al. (2012). Nanopatterned polymer substrates promote endothelial proliferation by initiation of β-catenin transcriptional signaling. *Acta Biomater.* **8**, 2953–2962.
- Schlaepfer, D. D. and Hunter, T. (1996). Evidence for In Vivo Phosphorylation of the Grb2 SH2-Domain Binding Site on Focal Adhesion Kinase by Src-Family Protein-Tyrosine Kinases. 16, 5623–5633.
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszak, J., Rodriguez, J. R., Zhou, D., Kreger, B. T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T. R., et al. (2011). Yap1 acts downstream of beta-catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 144, 782–795.
- Schmitz, Y., Rateitschak, K. and Wolkenhauer, O. (2013). Analysing the impact of nucleo-cytoplasmic shuttling of β-catenin and its antagonists APC, Axin and GSK3 on Wnt/β-catenin signalling. *Cell. Signal.* **25**, 2210–2221.
- Schneider, S. Q. and Bowerman, B. (2007). β-Catenin Asymmetries after All Animal/Vegetal- Oriented Cell Divisions in Platynereis dumerilii Embryos Mediate Binary Cell-Fate Specification. *Dev. Cell* **13**, 73–86.
- Schötz, E., Burdine, R. D., Jülicher, F., Steinberg, M. S., Heisenberg, C. and Foty, R. A. (2008). Quantitative differences in tissue surface tension influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP J.* **2**, 42–56.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K. and Blum, M. (2007). Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in Xenopus. *Curr. Biol.* **17**, 60–66.
- Seeling, J. M., Miller, J. R., Gil, R., Moon, R. T., White, R. and Virshup, D. M. (1999). Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science (80-.).* 283, 2089–2091.
- Sen, B., Xie, Z., Case, N., Ma, M., Rubin, C. and Rubin, J. (2008). Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology* 149, 6065–6075.
- Sen, B., Styner, M., Xie, Z., Case, N., Rubin, C. T. and Rubin, J. (2009). Mechanical loading regulates NFATc1 and betacatenin signaling through a GSK3b control node. J. Biol. Chem. 284, 34607–34617.
- Sen, B., Xie, Z., Case, N., Styner, M., Rubin, C. T. and Rubin, J. (2011a). Mechanical signal influence on mesenchymal stem cell fate is enhanced by incorporation of refractory periods into the loading regimen. J. Biomech. 44, 593–599.
- Sen, B., Guilluy, C., Xie, Z., Case, N., Styner, M., Thomas, J., Oguz, I., Rubin, C., Burridge, K. and Rubin, J. (2011b). Mechanically induced focal adhesion assembly amplifies anti-adipogenic pathways in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 29, 1829–1836.
- Seo, D., Southard, K. M., Kim, J. W., Lee, H. J., Farlow, J., Lee, J. U., Litt, D. B., Haas, T., Alivisatos, A. P., Cheon, J., et al. (2016). A mechanogenetic toolkit for interrogating cell signaling in space and time. *Cell* **165**, 1507–1518.
- Seong, J., Lu, S. and Wang, Y. (2011a). Live cell Imaging of Src/FAK Signalling by FRET. Cell Mol Bioeng 2, 138–147.
- Seong, J., Ouyang, M., Kim, T., Sun, J., Wen, P. C., Lu, S., Zhuo, Y., Llewellyn, N. M., Schlaepfer, D. D., Guan, J. L., et al. (2011b). Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer. *Nat Commun* 2, 406.
- Shapiro, L., Fannon, a M., Kwong, P. D., Thompson, a, Lehmann, M. S., Grübel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R. and Hendrickson, W. a (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327–337.
- Shaw, R. J., Paez, J. G., Curto, M., Yaktine, A., Pruitt, W. M., Saotome, I., O'Bryan, J. P., Gupta, V., Ratner, N., Der, C. J., et al. (2001). The Nf2 Tumor Suppressor, Merlin, Functions in Rac-Dependent Signaling. *Dev. Cell* **1**, 63–72.

- Sheetz, M. P. and Spudich, J. A. (1983). Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature* **303**, 31–35.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M. and Ito, F. (1994). Tyrosine phosphorylation of β-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes. Commun.* **1**, 295–305.
- Shih, Y. R. V, Tseng, K. F., Lai, H. Y., Lin, C. H. and Lee, O. K. (2011). Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J. Bone Miner. Res. 26, 730–738.
- Shin, J. W. and Mooney, D. J. (2016). Improving Stem Cell Therapeutics with Mechanobiology. Cell Stem Cell 18, 16–19.
- Shore, E. M. and Nelson, W. J. (1991). Biosynthesis of the Cell Adhesion Molecule Uvomorulin (E-Cadherin) in MAdin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. J. Biol. Chem. 266, 19672–19680.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H. and Schlaepfer, D. D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* **2**, 249–256.
- Silvis, M. R., Kreger, B. T., Lien, W.-H., Klezovitch, O., Rudakova, G. M., Camargo, F. D., Lantz, D. M., Seykora, J. T. and Vasioukhin, V. (2011). α-Catenin Is a Tumor Suppressor That Controls Cell Accumulation by Regulating the Localization and Activity of the Transcriptional Coactivator Yap1. Sci. Signal. 4, ra33-ra33.
- Sim, J. Y., Moeller, J., Hart, K. C., Ramallo, D., Vogel, V., Dunn, A. R., Nelson, W. J. and Pruitt, B. L. (2015). Spatial distribution of cell-cell and cell-ECM adhesions regulates force balance while main taining E-cadherin molecular tension in cell pairs. *Mol. Biol. Cell* 26, 2456–2465.
- Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G. P., Stephanopoulos, G. N., Wang, D. I., Whitesides, G. M. and Ingber, D. E. (1994). Engineering cell shape and function. *Science (80-.).* **264**, 696–8.
- Sit, S.-T. and Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. J. Cell Sci. 124, 679–683.
- Sivasankar, S., Gumbiner, B. and Leckband, D. (2001). Direct Measurements of Multiple Adhesive Alignments and Unbinding Trajectories between Cadherin Extracellular Domains. *Biophys. J.* 80, 1758–1768.
- Slack-Davis, J. K., Martin, K. H., Tilghman, R. W., Iwanicki, M., Ung, E. J., Autry, C., Luzzio, M. J., Cooper, B., Kath, J. C., Roberts, W. G., et al. (2007). Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. J. Biol. Chem. 282, 14845–14852.
- Smith, M. L., Long, D. S., Damiano, E. R. and Ley, K. (2003). Near-Wall μ-PIV Reveals a Hydrodynamically Relevant Endothelial Surface Layer in Venules In Vivo. *Biophys. J.* 85, 637–645.
- Smits, R., Hofland, N., Edelmann, W., Geugien, M., Jagmohan-Changur, S., Albuquerque, C., Breukel, C., Kucherlapati, R., Kielman, M. F. and Fodde, R. (2000). Somatic Apc mutations are selected upon their capacity to inactivate the ??catenin downregulating activity. *Genes Chromosom. Cancer* 29, 229–239.
- Soiné, J. R. D., Brand, C. A., Stricker, J., Oakes, P. W., Gardel, M. L. and Schwarz, U. S. (2015). Model-based Traction Force Microscopy Reveals Differential Tension in Cellular Actin Bundles. *PLoS Comput. Biol.* **11**, 1–16.
- Sokabe, M., Naruse, K., Sai, S., Yamada, T., Kawakami, K., Inoue, M., Murase, K. and Miyazu, M. (1997). Mechanotransduction and intracellular signaling mechanisms of stretch-induced remodeling in endothelial cells. *Heart Vessels* Suppl 12, 191–3.
- Soldati, C., Biagioni, S., Poiana, G. and Augusti-Tocco, G. (2008). beta-Catenin and actin reorganization in HGF/SF response of ST14A cells. J. Neurosci. Res. 86, 1044–1052.
- Somogyi, K. and Rørth, P. (2004). Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. Dev. Cell 7, 85–93.
- Song, J. L., Nigam, P., Tektas, S. S. and Selva, E. (2015). microRNA regulation of Wnt signaling pathways in development and disease. *Cell Signal* 27, 1380–1391.
- Spadaro, D., Le, S., Laroche, T. T. T., Mean, I., Jond, L., Yan, J. and Citi, S. (2017). Tension-dependent stretching and folding of ZO-1 controls the localization of its interactors. *bioRxiv*.
- Sperry, R. B., Bishop, N. H., Bramwell, J. J., Brodeur, M. N., Carter, M. J., Fowler, B. T., Lewis, Z. B., Maxfield, S. D., Staley, D. M., Vellinga, R. M., et al. (2010). Zyxin controls migration in epithelial-mesenchymal transition by mediating actinmembrane linkages at cell-cell junctions. J. Cell. Physiol. 222, 612–624.
- Springer, T. A. and Dustin, M. L. (2012). Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 107–115.
- Stamenkovic, I. and Yu, Q. (2010). Merlin, a "magic" linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**, 471–484.
- Steinhusen, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K. and Huber, O. (2001). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. J. Biol. Chem. 276, 4972–80.
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M. and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**, 239–242.
- Strale, P. O., Duchesne, L., Peyret, G., Montel, L., Nguyen, T., Png, E., Tampé, R., Troyanovsky, S., Hénon, S., Ladoux, B., et al. (2015). The formation of ordered nanoclusters controls cadherin anchoring to actin and cell-cell contact fluidity. J. Cell Biol. 210, 333–346.
- Stricker, J., Aratyn-Schaus, Y., Oakes, P. W. and Gardel, M. L. (2011). Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions. *Biophys. J.* 100, 2883–2893.
- Style, R. W., Boltyanskiy, R., German, G. K., Hyland, C., MacMinn, C. W., Mertz, A. F., Wilen, L. A., Xu, Y. and Dufresne, E. R. (2014). Traction force microscopy in physics and biology. *Soft Matter* **10**, 4047.

- Suffoletto, K., Ye, N., Meng, F., Verma, D. and Hua, S. Z. (2015). Intracellular forces during guided cell growth on micropatterns using FRET measurement. J. Biomech. 48, 627–635.
- Sugimura, K. and Ishihara, S. (2013). The mechanical anisotropy in a tissue promotes ordering in hexagonal cell packing. Development 140, 4091–101.
- Sugimura, K., Lenne, P.-F. P.-F., Graner, F., Addae-Mensah, K. A., Wikswo, J. P., Aegerter-Wilmsen, T., Aegerter, C. M., Hafen, E., Basler, K., Bambardekar, K., et al. (2015). Measuring forces and stresses in situ in living tissues. Development 143, 16394.
- Suh, E. K. and Gumbiner, B. M. (2003). Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FGrich nucleoporins. *Exp. Cell Res.* 290, 447–456.
- Sun, Y. B., Yong, K. M. A., Villa-Diaz, L. G., Zhang, X. L., Chen, W. Q., Philson, R., Weng, S. N., Xu, H. X., Krebsbach, P. H. and Fu, J. P. (2014). Hippo/YAP-mediated rigidity-dependent motor neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat. Mater.* 13, 599–604.
- Sun, Z., Guo, S. S. and Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. 215,.
- Supatto, W., Fraser, S. E. and Vermot, J. (2009). An all-optical approach for probing microscopic flows in living embryos (Biophysical Journal (2008) 95, (L29-31)). *Biophys. J.* 96, 2548.
- Suresh Babu, S., Wojtowicz, A., Freichel, M., Birnbaumer, L., Hecker, M. and Cattaruzza, M. (2012). Mechanism of stretchinduced activation of the mechanotransducer zyxin in vascular cells. *Sci. Signal.* **5**, ra91.
- Suzuki, A., Badger, B. L., Haase, J., Ohashi, T., Erickson, H. P., Salmon, E. D. and Bloom, K. (2016). How the kinetochore couples microtubule force and centromere stretch to move chromosomes. *Nat. Cell Biol.* 18, 382–392.
- Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J. and Block, S. M. (1993). Direct Observation of Kinesin Stepping by Optical Trapping Interferometry. *NatureNature* **365**, 721–727.
- Swift, J., Ivanovska, I. L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P. C. D. P., Pinter, J., Pajerowski, J. D., Spinler, K. R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013). Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. Science (80-.). 341, 1240104–1240104.
- Tabdanov, E., Borghi, N., Brochard-Wyart, F., Dufour, S. and Thiery, J. P. (2009). Role of E-cadherin in membrane-cortex interaction probed by nanotube extrusion. *Biophys. J.* 96, 2457–2465.
- Tabdili, H., Barry, A. K., Langer, M. D., Chien, Y.-H., Shi, Q., Lee, K. J., Lu, S. and Leckband, D. E. (2012a). Cadherin point mutations alter cell sorting and modulate GTPase signaling. J. Cell Sci. 125, 3299–309.
- Tabdili, H., Langer, M., Shi, Q., Poh, Y.-C., Wang, N. and Leckband, D. (2012b). Cadherin-dependent mechanotransduction depends on ligand identity but not affinity. *J. Cell Sci.* **125**, 4362–4371.
- Takeda, H., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. S. S., Behrens, J., Birchmeier, W. and Tsukita, S. S. S. (1995). V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and β catenin is not required for the shift. *J. Cell Biol.* **131**, 1839–1847.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 397–410.
- Tambe, D. T., Hardin, C. C., Angelini, T. E., Rajendran, K., Park, C. Y., Serra-Picamal, X., Zhou, E. H., Zaman, M. H., Butler, J. P., Weitz, D. a, et al. (2011). Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nat. Mater.* 10, 469–75.
- Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K. and Chen, C. S. (2003). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1484–9.
- Tan, C. W., Gardiner, B. S., Hirokawa, Y., Layton, M. J., Smith, D. W. and Burgess, A. W. (2012). Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells. *PLoS One* 7,.
- Tan, J., Benham-Pyle, B. W., Weis, W. I. and Nelson, W. J. (2016). Regulation of Cadherin--Catenin Biology by Mechanical Force and Phosphorylation. In *The Cadherin Superfamily: Key Regulators of Animal Development and Physiology* (ed. Suzuki, S. T.) and Hirano, S.), pp. 93–114. Tokyo: Springer Japan.
- Tanner, K., Boudreau, A., Bissell, M. J. and Kumar, S. (2010). Dissecting regional variations in stress fiber mechanics in living cells with laser nanosurgery. *Biophys. J.* **99**, 2775–2783.
- Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular Listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357, 257–260.
- Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–42.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. Cell 139, 871–890.
- Thomas, W. E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V. and Sokurenko, E. V. (2002). Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* **109**, 913–923.
- Thomas, W. E., Vogel, V. and Sokurenko, E. (2008). Biophysics of Catch Bonds. Annu. Rev. Biophys. 37, 399-416.
- Thomas, W. A., Boscher, C., Chu, Y. S., Cuvelier, D., Martinez-Rico, C., Seddiki, R., Heysch, J., Ladoux, B., Thiery, J. P., Mege, R. M., et al. (2013). α-Catenin and vinculin cooperate to promote high E-cadherin-based adhesion strength. J. Biol. Chem. 288, 4957–4969.
- Thomasy, S. M., Morgan, J. T., Wood, J. A., Murphy, C. J. and Russell, P. (2013). Substratum stiffness and latrunculin B modulate the gene expression of the mechanotransducers YAP and TAZ in human trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res.* 113, 66–73.
- Thoumine, O. and Ott, A. (1997). Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 1**, 2109–2116.

- Thouvenin, O., Apelian, C., Nahas, A., Fink, M. and Boccara, C. (2017). Full-Field Optical Coherence Tomography as a Diagnosis Tool: Recent Progress with Multimodal Imaging. *Appl. Sci.* **7**, 236.
- Tinevez, J.-Y., Schulze, U., Salbreux, G., Roensch, J., Joanny, J.-F. and Paluch, E. (2009). Role of cortical tension in bleb growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 18581–18586.
- Toh, Y. C., Xing, J. and Yu, H. (2015). Modulation of integrin and E-cadherin-mediated adhesions to spatially control heterogeneity in human pluripotent stem cell differentiation. *Biomaterials* **50**, 87–97.
- **Tominaga, J., Fukunaga, Y., Abelardo, E. and Nagafuchi, A.** (2008). Defining the function of β-catenin tyrosine phosphorylation in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Genes to Cells* **13**, 67–77.
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., Schwartz, M. A., Matter, K. and Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. J. Cell Biol. 208, 821–838.
- Toutant, M., Costa, A., Studler, J.-M., Kadare, G., Carnaud, M. and Girault, J.-A. (2002). Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7731–7743.
- Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoué, S. and Chang, F. (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J. Cell Biol.* **153**, 397–411.
- Trepat, X. and Fredberg, J. J. (2011). Plithotaxis and emergent dynamics in collective cellular migration. *Trends Cell Biol.* **21**, 638–646.
- Trepat, X., Wasserman, M. R., Angelini, T. E., Millet, E., Weitz, D. A., Butler, J. P. and Fredberg, J. J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nat. Phys.* 5, 426–430.
- Troyanovsky, R. B., Sokolov, E. P. and Troyanovsky, S. M. (2006). Endocytosis of cadherin from intracellular junctions is the driving force for cadherin adhesive dimer disassembly. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3484–93.
- Truong Quang, B. A., Mani, M., Markova, O., Lecuit, T. and Lenne, P. F. (2013). Principles of E-cadherin supramolecular organization in vivo. Curr. Biol. 23, 2197–2207.
- Trusolino, L., Bertotti, A. and Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 834–848.
- Tse, J. M., Cheng, G., Tyrrell, J. A., Wilcox-Adelman, S. A., Boucher, Y., Jain, R. K. and Munn, L. L. (2012). Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 911–916.
- Tseng, C. Y., Wang, A., Zocchi, G., Rolih, B. and Levine, A. J. (2009). Elastic energy of protein-DNA chimeras. Phys. Rev. E -Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys. 80, 1–4.
- Twiss, F., Oldenkamp, M., Hiemstra, A., Zhou, H., Matheron, L., Mohammed, S. and de Rooij, J. (2013). HGF signaling regulates Claudin-3 dynamics through its C-terminal tyrosine residues. *Tissue Barriers* 1, e27425.
- Tzima, E., MA, del P., SJ, S., S, C. and MA., S. (2001). Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J.* 20, 4639–4647.
- Ulrich, T. A., De Juan Pardo, E. M. and Kumar, S. (2009). The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* 69, 4167–4174.
- Valbuena, A., Vera, A. M., Oroz, J., Menéndez, M. and Carrión-Vázquez, M. (2012). Mechanical properties of β-catenin revealed by single-molecule experiments. *Biophys. J.* **103**, 1744–1752.
- Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., De Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., Van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., et al. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241–250.
- van den Dries, K., Meddens, M. B. M., de Keijzer, S., Shekhar, S., Subramaniam, V., Figdor, C. G. and Cambi, A. (2013). Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. *Nat. Commun.* **4**, 1412.
- van Leeuwen, I. M. M., Byrne, H. M., Jensen, O. E. and King, J. R. (2007). Elucidating the interactions between the adhesive and transcriptional functions of ??-catenin in normal and cancerous cells. J. Theor. Biol. 247, 77–102.
- van Veelen, W., Le, N. H., Helvensteijn, W., Blonden, L., Theeuwes, M., Bakker, E. R. M., Franken, P. F., van Gurp, L., Meijlink, F., van der Valk, M. a, et al. (2011). Beta-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* 60, 1204–1212.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B. G., Rossant, J. and Wrana, J. L. (2010). The Crumbs Complex Couples Cell Density Sensing to Hippo-Dependent Control of the TGF-??-SMAD Pathway. Dev. Cell 19, 831–844.
- Vassilev, A. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* 15, 1229–1241.
- Vedula, S. R. K., Hirata, H., Nai, M. H., Brugués, A., Toyama, Y., Trepat, X., Lim, C. and Ladoux, B. (2014). Epithelial bridges maintain tissue integrity during collective cell migration. *Nat. Mater.* **13**, 87–96.
- Verma, D., Ye, N., Meng, F., Sachs, F., Rahimzadeh, J. and Hua, S. Z. (2012). Interplay between Cytoskeletal Stresses and Cell Adaptation under Chronic Flow. *PLoS One* 7,.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. and Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration . *Nat. Rev. cell Biol.* **10**, 778–790.
- Vogel, V. and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 265–75.
- Volberg, T., Zick, Y., Dror, R., Sabanay, L., Gilon, C., Levitzki, A. and Geiger, B. (1992). The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *Embo J.* **11**, 1733–1742.

- Vonna, L., Wiedemann, A., Aepfelbacher, M. and Sackmann, E. (2007). Micromechanics of filopodia mediated capture of pathogens by macrophages. Eur. Biophys. J. 36, 145–151.
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S. and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138, 3907–3914.
- Wang, Y. and Gilmore, T. D. (2003). Zyxin and paxillin proteins: Focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1593, 115–120.
- Wang, X. and Ha, T. (2013). Defining Single Molecular Forces Required to Activate Integrin and Notch Signaling. *Science* (80-.). **340**, 991–994.
- Wang, N. and Suo, Z. (2005). Long-distance propagation of forces in a cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1133–1138.
- Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the. Science (80-.). 260, 1124–1127.
- Wang, N., Naruse, K., Stamenovic, D., Fredberg, J. J., Mijailovich, S. M., Tolic-Norrelykke, I. M., Polte, T., Mannix, R. and Ingber, D. E. (2001a). Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7765–7770.
- Wang, J. G., Miyazu, M., Matsushita, E., Sokabe, M. and Naruse, K. (2001b). Uniaxial Cyclic Stretch Induces Focal Adhesion Kinase (FAK) Tyrosine Phosphorylation Followed by Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 356–361.
- Wang, Y., Botvinick, E. L., Zhao, Y., Berns, M. W., Usami, S., Tsien, R. Y. and Chien, S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434, 1040–1045.
- Wang, N., Tytell, J. D. and Ingber, D. E. (2009a). Mechanical forces influence the growth and shape of virtually every tissue and organ in our bodies. 10, 75–82.
- Wang, H., Dembo, M. and Wang, Y. (2009b). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. J. Biol. Chem. 1605, 1345–1350.
- Wang, J., ITO, M., ZHONG, W., SUGITA, S., MICHIUE, T., TSUBOI, T., KITAGUCHI, T. and MATSUMOTO, T. (2016). Observations of intracellular tension dynamics of MC3T3-E1 cells during substrate adhesion using a FRET-based actinin tension sensor. J. Biomech. Sci. Eng. 11, 1–11.
- Weber, G. F., Bjerke, M. A. and DeSimone, D. W. (2011). Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. J. Cell Sci. 124, 1183–1193.
- Weidner, K. M., Arakakit, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida Ii, T., Daikuharat, Y., et al. (1991). Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor (motility factor/tumor cell invasion/chromosomal localization/c-met tyrosine kinase receptor/lung fibroblast-derived mitogen). *Cell Biol.* 88, 7001–7005.
- Weinbaum, S., Cowin, S. C. and Zeng, Y. (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J. Biomech.* 27, 339–60.
- Weiss, E. E., Kroemker, M., Rüdiger, A. H., Jockusch, B. M. and Rüdiger, M. (1998). Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: Complex formation between α-catenin and vinculin. J. Cell Biol. 141, 755–764.
- Whitehead, J., Vignjevic, D., Fütterer, C., Beaurepaire, E., Robine, S. and Farge, E. (2008). Mechanical factors activate betacatenin-dependent oncogene expression in APC mouse colon. *HFSP J.* 2, 286–94.
- Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M. F. and Pantaloni, D. (2003). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. J. Cell Biol. 160, 387–398.
- Wolff, J. (1986). The Law of Bone Remodeling. Berlin Heidelberg New York: Springer ranslation of the German 1892 edition.
 Woodcock, S. A., Rooney, C., Liontos, M., Connolly, Y., Zoumpourlis, V., Whetton, A. D., Gorgoulis, V. G. and Malliri, A. (2009). Src-Induced Disassembly of Adherens Junctions Requires Localized Phosphorylation and Degradation of the Rac Activator Tiam1. *Mol. Cell* 33, 639–653.
- Wozniak, M. a and Chen, C. S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 34–43.
- Wozniak, M., Fausto, A., Carron, C. P., Meyer, D. M. and Hruska, K. A. (2000). Mechanically strained cells of the osteoblast lineage organize their extracellular matrix through unique sites of alphavbeta3-integrin expression. J. Bone Miner. Res. 15, 1731–45.
- Wozniak, M. a, Desai, R., Solski, P. a, Der, C. J. and Keely, P. J. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* 163, 583–595.
- Wu, S. K., Gomez, G. A., Michael, M., Verma, S., Cox, H. L., Lefevre, J. G., Parton, R. G., Hamilton, N. A., Neufeld, Z. and Yap, A. S. (2014). Cortical F-actin stabilization generates apical–lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nat. Cell Biol.* 16, 167–178.
- Wu, Y., Kanchanawong, P. and Zaidel-Bar, R. (2015). Actin-Delimited Adhesion-Independent Clustering of E-Cadherin Forms the Nanoscale Building Blocks of Adherens Junctions. *Dev. Cell* 32, 139–154.
- Wu, Y., Zhang, K., Seong, J., Fan, J., Chien, S., Wang, Y. and Lu, S. (2016). In-situ coupling between kinase activities and protein dynamics within single focal adhesions. *Sci. Rep.* 6, 29377.
- Xiao, K., Oas, R. G., Chiasson, C. M. and Kowalczyk, A. P. (2007). Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1773, 8–16.
- Xu, G., Craig, A. W. B., Greer, P., Miller, M., Anastasiadis, P. Z., Lilien, J. and Balsamo, J. (2004). Continuous association of

cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. J. Cell Sci. 117, 3207–3219.

- Yamada, S. and Nelson, W. J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. J. Cell Biol. 178, 517–527.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. and Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889–901.
- Yamashita, S., Tsuboi, T., Ishinabe, N., Kitaguchi, T. and Michiue, T. (2016). Wide and high resolution tension measurement using FRET in embryo. *Sci. Rep.* 6, 28535.
- Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K. and Lu, Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates βcatenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* **478**, 118–122.
- Yao, M., Qiu, W., Liu, R., Efremov, A. K., Cong, P., Seddiki, R., Payre, M., Lim, C. T., Ladoux, B., Mège, R.-M., et al. (2014). Force-dependent conformational switch of α-catenin controls vinculin binding. *Nat. Commun.* **5**,
- Yao, M., Goult, B. T., Chen, H., Cong, P., Sheetz, M. P. and Yan, J. (2015). Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci. Rep.* 4, 4610.
- Yao, M., Goult, B. T., Klapholz, B., Hu, X., Toseland, C. P., Guo, Y., Cong, P., Sheetz, M. P. and Yan, J. (2016). The mechanical response of talin. *Nat. Commun.* 7, 11966.
- Yap, A. S., Brieher, W. M., Pruschy, M. and Gumbiner, B. M. (1997). Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* 7, 308–315.
- Yap, A. S., Crampton, M. S. and Hardin, J. (2007). Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 508–514.
- Ye, N., Verma, D., Meng, F., Davidson, M. W., Suffoletto, K. and Hua, S. Z. (2014). Direct observation of α-actinin tension and recruitment at focal adhesions during contact growth. *Exp. Cell Res.* **327**, 57–67.
- Ye, A. A., Cane, S. and Maresca, T. J. (2016). Chromosome biorientation produces hundreds of piconewtons at a metazoan kinetochore. *Nat. Commun.* 7, 13221.
- Yeaman, C. (2004). Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells. J. Cell Sci. 117, 559–570.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. and Shibata, M. (2010). α-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat. Cell Biol.* **12**, 533–542.
- Yoshida, C. and Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28, 217–224.
- You, L., Cowin, S. C., Schaffler, M. B. and Weinbaum, S. (2001). A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J. Biomech.* **34**, 1375–1386.
- Young, S. R. L., Hum, J. M., Rodenberg, E., Turner, C. H. and Pavalko, F. M. (2011). Non-overlapping functions for Pyk2 and FAK in osteoblasts during fluid shear stress-induced mechanotransduction. *PLoS One* **6**,.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z. and Geiger, B. (2006). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. J. Cell Sci. 120, 137–148.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* 9, 858–67.
- Zebda, N., Dubrovskyi, O. and Birukov, K. G. C. N.-C. (2012). Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions. *Microvasc Res* 83, 71–81.
- **Zeng, G., Apte, U., Micsenyi, A., Bell, A. and Monga, S. P. S. S.** (2006). Tyrosine residues 654 and 670 in β-catenin are crucial in regulation of Met–β-catenin interactions. *Exp. Cell Res.* **312**, 3620–3630.
- Zhang, J., Li, W., Sanders, M. a, Sumpio, B. E., Panja, A. and Basson, M. D. (2003). Regulation of the intestinal epithelial response to cyclic strain by extracellular matrix proteins. *FASEB J.* 17, 926–8.
- Zhang, D. L., Gu, L. J., Liu, L., Wang, C. Y., Sun, B. S., Li, Z. and Sung, C. K. (2009). Effect of Wnt signaling pathway on wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 149–151.
- Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M. and Labouesse, M. (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* **471**, 99–103.
- Zhang, Y., Ge, C., Zhu, C. and Salaita, K. (2014). DNA-based digital tension probes reveal integrin forces during early cell adhesion. Nat. Commun. 5, 5167.
- Zhao, X.-H., Laschinger, C., Arora, P., Szaszi, K., Kapus, A. and McCulloch, C. A. (2007a). Force activates smooth muscle actin promoter activity through the Rho signaling pathway. J. Cell Sci. 120, 1801–1809.
- Zhao, B., Zhao, B., Wei, X., Wei, X., Li, W., Li, W., Udan, R. S., Udan, R. S., Yang, Q., Yang, Q., et al. (2007b). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21, 2747–2761.
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C. Y., Yu, J. and Guan, K. L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 26, 54–68.
- Zhong, W., Tian, K., Zheng, X., Li, L., Zhang, W., Wang, S. and Qin, J. (2013). Mesenchymal stem cell and chondrocyte fates in a multishear microdevice are regulated by Yes-associated protein. *Stem Cells Dev.* 22, 2083–2093.
- Zhou, J., Aponte-Santamar??a, C., Sturm, S., Bullerjahn, J. T., Bronowska, A. and Gr??ter, F. (2015). Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing. *PLoS Comput. Biol.* **11**, 1–16.
- Zhuo, Y., Qian, T., Wu, Y., Seong, J., Gong, Y., Ma, H., Wang, Y. and Lu, S. (2015). Subcellular and Dynamic Coordination between Src Activity and Cell Protrusion in Microenvironment. *Sci. Rep.* 5, 12963.
- Zocchi, G. (2009). Controlling proteins through molecular springs. Annu. Rev. Biophys. 38, 75-88.

Žoldák, G., Stigler, J., Pelz, B., Li, H. and Rief, M. (2013). Ultrafast folding kinetics and cooperativity of villin headpiece in single molecule autocorrelation force spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18156–61.

Zondag, G. C. M., Evers, E. E., Ten Klooster, J. P., Janssen, L., Van Der Kammen, R. A. and Collard, J. G. (2000). Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. J. Cell Biol. 149, 775–781.