

Les molécules d'adhérence cellulaire : molécules morphogénétiques

L'adhérence intercellulaire est assurée par des glycoprotéines de membrane appelées CAM (*cell adhesion molecules*) dont il existe plusieurs types, dépendant ou non du calcium. Les cellules exprimant à un même niveau les mêmes protéines CAM tendent à se regrouper et à former des jonctions intermédiaires et des communications jonctionnelles intercellulaires. En revanche, les cellules exprimant des CAM différentes, ou à un niveau différent, vont se séparer. Le contrôle de l'expression des gènes codant pour les CAM dépend étroitement du stade de développement de chaque tissu, ces molécules d'adhérence jouant très probablement un rôle essentiel dans les ségrégations cellulaires et la formation des tissus. Les CAM ont aussi un rôle morphogénétique au niveau cellulaire et pourraient contribuer à la transduction d'un signal de programmation de l'expression génétique.

René-Marc Mège

La morphogenèse des organismes pluricellulaires dépend de la réalisation coordonnée de différents processus tels que la division, la migration, l'adhérence et la mort cellulaires, la différenciation induite par le milieu et l'induction embryonnaire. Des regroupements, des mouvements et des ségrégations de cellules se produisent au cours du développement pour former les différents tissus de l'organisme. Wilson, en 1907, découvrit que des cellules d'éponge dissociées étaient capables de se réagréger et de reconstituer un organisme fonctionnel [1]. A la suite de ces travaux pionniers, Holtfreter [2] analysa les réarrangements de fragments de tissus embryonnaires ou de cellules d'amphibien *in vitro* et leur

capacité à se différencier en fonction de leur environnement cellulaire. Puis Moscona [3] et Steinberg [4] montrèrent par des expériences de ségrégation cellulaire (regroupement des cellules d'un même type au sein d'une population hétérogène), l'existence d'adhérences spécifiques des divers tissus embryonnaires de vertébrés. Steinberg formula l'hypothèse selon laquelle la ségrégation cellulaire et la formation de tissu *in vivo* sont gouvernées de façon purement thermodynamique par les différences d'adhérence entre les divers types cellulaires [4]. Cette hypothèse ne préjugeait en rien des déterminants moléculaires responsables de l'adhérence. Sperry, sur la base de travaux sur la régénération du cortex visuel, proposa l'existence de molécules

ADRESSE ET TIRÉS À PART

R.-M. Mège : docteur ès sciences de l'université de Compiègne, chercheur boursier de l'AFM. Inserm U.153, 17, rue du Fer-à-Moulin, 75005 Paris, France.

adhésives spécifiques [5]. C'est avec le développement de l'immunologie dans les années 1970 que débute l'approche moléculaire de ce problème avec la recherche d'anticorps dirigés contre des épitopes de la surface cellulaire, capables d'inhiber l'agrégation cellulaire. Ces recherches conduisirent à la purification et à la caractérisation des molécules d'adhérence cellulaire ou CAM (*cell adhesion molecules*) (voir pour revue [6-10]). L'étude par immunohistochimie de la localisation de ces molécules dans l'embryon révéla de remarquables séquences d'expression spatiotemporelle au cours de l'embryogenèse et de l'histogenèse [11-13]. Ces observations suggérèrent que l'organisation des différents types cellulaires en tissus et des différents tissus en organes fonctionnels est orchestrée par l'expression hautement contrôlée de molécules d'adhérence [7, 14]. Au cours des cinq dernières années, les ADNc codant pour ces molécules ont été isolés puis séquencés, et le transfert génique s'est avéré être un outil extraordinaire permettant de confirmer l'adhésivité de ces molécules, de leur découvrir de nouvelles fonctions et de démontrer leur rôle morphogénétique.

Les CAM sont des glycoprotéines intrinsèques de la membrane cellulaire dont le domaine NH₂-terminal déborde largement dans la matrice extracellulaire. Ce sont des molécules homophiliques, c'est-à-dire qu'une CAM présente à la surface de la cellule adhère à une molécule de même type portée par une cellule adjacente. Selon leurs propriétés physicochimiques, structurales et fonctionnelles, on distingue les CAM indépendantes du calcium et les CAM dépendantes du calcium (figure 1). Les molécules de la première famille, dont la N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) [15] est le prototype, font partie de la superfamille des immunoglobulines [9]. La N-CAM initialement isolée de cerveau de poulet est codée par un seul gène dont la transcription est contrôlée au cours du développement. Il existe au moins huit polypeptides de N-CAM issus d'un même ARN messager par épissage différentiel [15]. Les trois formes majoritaires ont le même domaine extracellulaire comportant les cinq

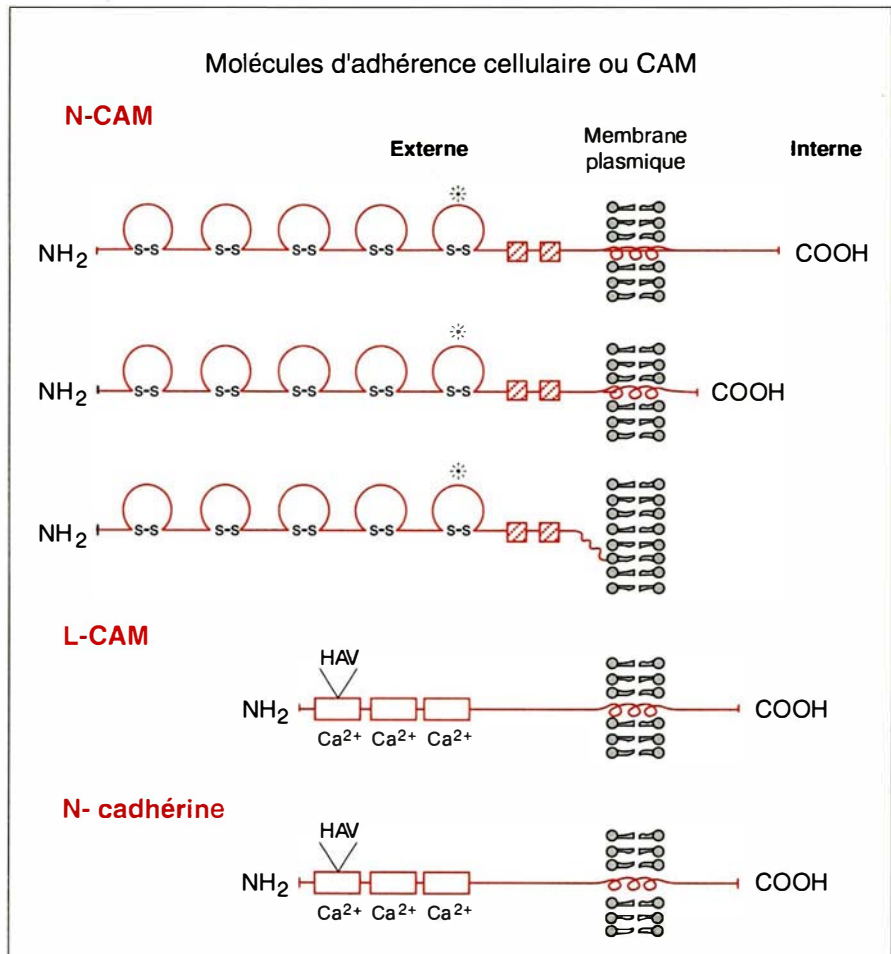


Figure 1. **Représentation schématique de la séquence primaire des molécules d'adhérence cellulaire, N-CAM, L-CAM et N-cadhérine.** N-CAM : neural cell adhesion molecule. Les trois formes majoritaires sont présentées ici, les deux premières ont des domaines cytoplasmiques de taille différente et la troisième est ancrée à la membrane plasmique par un glycolipide phosphatidyl inositol. ---S-S--- : représente les domaines de type immunoglobuline, --- : les domaines répétitifs de type III de la fibronectine et * : les sites d'attachement des acides polysialiques qui représentent jusqu'à 30 % du poids de la N-CAM et sont contrôlés au cours du développement. L-CAM : liver cell adhesion molecule est identique à la E-cadhérine et à l'uvomoruline ; la N-cadhérine est identique à la A-CAM (adherens junction specific CAM). L-CAM et N-cadhérine sont très fortement homologues. --- : représente les trois domaines d'homologie interne propres aux cadhérines. La séquence HAV constitue le site d'adhérence homophile de ces molécules et [Ca²⁺] le ou les sites d'affinité pour l'ion calcium.

domaines d'homologie des immunoglobulines. Elles ne diffèrent que par leur mode d'ancrage dans la membrane ou par la longueur de leur domaine cytoplasmique.

Les CAM dépendantes du calcium : L-CAM (*liver CAM*, [16]) ou E-cadhérine [14], N-cadhérine (*neural cadherin*) [14, 17] et P-cadhérine (*pla-*

central cadherin) [14, 17] ont des séquences peptidiques et des structures fortement homologues. Leur adhérence est dépendante de la présence du Ca²⁺ dans le milieu extracellulaire. La L-CAM fut initialement isolée de foie de poulet, mais on la trouve au cours du développement dans divers épithéliums [13].

La L-CAM est codée par un seul gène. Elle apparaît dès les étapes les plus précoces de l'embryogenèse en même temps que la N-CAM. L'équivalent chez la souris de la L-CAM, l'uvomoruline, fut caractérisée par son rôle dans la condensation des blastomères [18]. Le neuroépithélium de même que les tissus musculaires, cardiaques et nerveux expriment une autre CAM dépendante du calcium : la N-cadhérine [12], identique à la A-CAM (*adherens-junction specific CAM*) [13, 19]. L-CAM et N-cadhérine sont fortement modulées lors de la transformation réversible épithélium-mésenchyme [7, 12, 13], processus fondamental intervenant à différentes étapes de la morphogénèse [20]. L'expression de ces CAM diminue lors de la formation du mésenchyme et augmente lorsque celui-ci se condense pour former un épithélium [13]. L'expression de L-CAM et de N-cadhérine est aussi contrôlée lors de la réorganisation des épithéliums, par exemple lors de la formation de la plaque neurale [13]. Ces molécules sont donc fortement impliquées dans la formation et la réorganisation des épithéliums.

Des avancées décisives dans l'élucidation de la fonction des CAM et de leur rôle morphogénétique ont été obtenues en transfectant les ADNc codant pour ces CAM. L'étude des changements de morphologie induits par l'expression de ces molécules a permis de démontrer : (1) que N-CAM, L-CAM et N-cadhérine possèdent des propriétés d'adhérence homophile [21] ; (2) que l'expression d'une CAM dépendante du Ca^{2+} induit l'épithélialisation des cellules mésenchymateuses [22, 24] ; (3) que les CAM contribuent à la formation d'ensembles cellulaires, à leur ségrégation *in vitro* et probablement à la formation de tissus *in vivo* [25, 26] (figure 2).

Les CAM induisent une agrégation cellulaire spécifique

De nombreuses études ont montré que les anticorps dirigés contre la N-CAM ou la L-CAM étaient capables d'inhiber l'agrégation cellulaire et que des molécules de N-CAM purifiées, portées par divers supports arti-

ficiels (billes de verre ou liposomes) conféraient une adhérence spécifique à ces particules (voir pour revue : [7]), mais aucune démonstration directe de l'adhérence homophile de N-CAM, L-CAM et N-cadhérine n'a été obtenue par ces méthodes. Le transfert génique a permis de démontrer le caractère homophile de l'adhérence de ces trois molécules dans un système cellulaire homogène. De par la pluralité des types cellulaires exprimant la N-CAM, la L-CAM et la N-cadhérine au cours de l'embryogenèse, beaucoup de lignées cellulaires expriment l'une de ces trois CAM. Cependant, les cellules fibroblastiques de souris

LM (TK⁻) et les cellules de sarcome de souris S180 n'expriment aucune de ces molécules. Les ADNc codant pour les trois formes majeures de N-CAM, la L-CAM et la N-cadhérine de poulet sous le contrôle du promoteur viral de la région précoce de SV40 (*simian virus 40*) ont pu être introduits par transfection dans ces cellules. Des lignées cellulaires transfectées exprimant de façon permanente l'une ou l'autre de ces molécules ont ainsi été sélectionnées. Des expériences d'immunoelectrophorèse et de marquage immunofluorescent de la surface cellulaire ont montré que les trois formes de N-CAM, la L-CAM et la N-

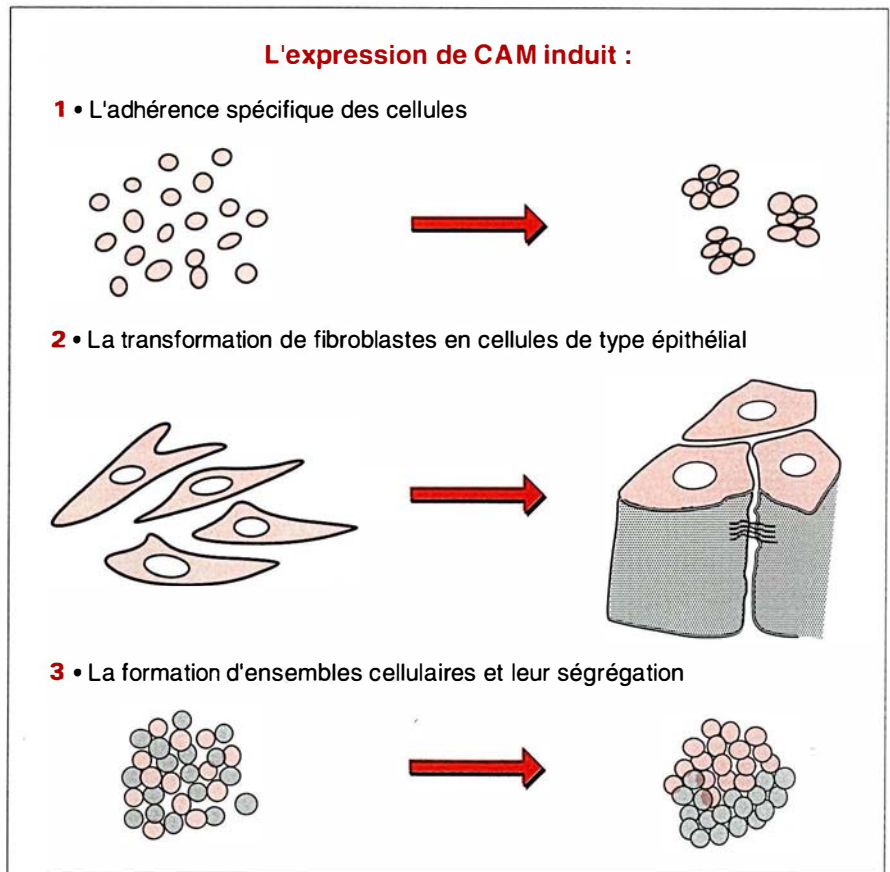


Figure 2. **Stratégie d'étude du rôle morphogénétique des CAM par transfert génique *in vitro*.** Les ADNc codant pour les CAM de poulet représentés schématiquement dans la figure 1 sont placés sous le contrôle du promoteur viral précoce de SV40 (simian virus 40), permettant ainsi l'expression de ces protéines dans des cellules eucaryotes. Après transfection de ces constructions dans les fibroblastes de souris LM(TK⁻) ou S180, une fraction des cellules incorpore l'ADN exogène dans leur patrimoine génétique et expriment les CAM à leur surface. La comparaison du phénotype de ces cellules au phénotype des cellules non transfectées permet la définition de l'adhésivité, des capacités de ségrégation et des changements de morphologie induits par l'expression des molécules d'adhérence cellulaire.

cadhérine sont exprimées à la surface des fibroblastes transfectés. Les cellules exprimant la N-CAM à leur surface sont capables de fixer des vésicules membranaires de cerveau de poulet, riches en N-CAM. Les cellules LM(TK⁻) ou S180 exprimant le plus haut niveau de N-CAM sont aussi capables de s'agréger en suspension. La fixation de vésicules membranaires de cerveau de poulet et l'agrégation sont inhibées par les anticorps anti-N-CAM. Les cellules LM(TK⁻) et S180 qui expriment de façon stable la L-CAM ou la N-cadhérine, ont acquis une adhésivité très forte, bien plus forte que l'adhésivité acquise par les cellules exprimant la N-CAM. Leur agrégation est inhibée par la suppression du calcium dans le milieu extracellulaire et elle est bloquée respectivement par les anticorps spécifiques anti-L-CAM et anti-N-cadhérine.

L'expression de CAM confère aux cellules une adhésivité spécifique. Cette « adhésivité » est de caractère homophile car les cellules transfectées n'adhèrent pas aux cellules parentales, non transfectées. L'adhérence induite par la N-CAM apparaît plus faible que celle induite par les molécules d'adhérence dépendantes du calcium, en accord avec les observations anciennes montrant que l'adhésion dépendante du calcium dans divers tissus est toujours plus forte que l'adhérence indépendante du calcium. La faible adhésivité de la N-CAM de même que la diversité de ses isoformes, de leur localisation cellulaire et subcellulaire semblent en concordance avec le rôle proposé pour la N-CAM dans le guidage des axones et la formation de réseaux neuronaux [7, 8]. Quant aux molécules d'adhérence dépendantes du calcium, l'adhérence forte qu'elles induisent va dans le sens d'un rôle dans la condensation des cellules lors de la formation de l'épithélium [27].

Induction de l'épithélialisation des fibroblastes

Si un tel rôle inducteur des molécules d'adhérence dépendantes du calcium sur la formation des épithéliums existe, on est en droit de supposer *a priori* que l'expression de ces molécules

m/s n° 6, vol. 7, juin-juillet 91

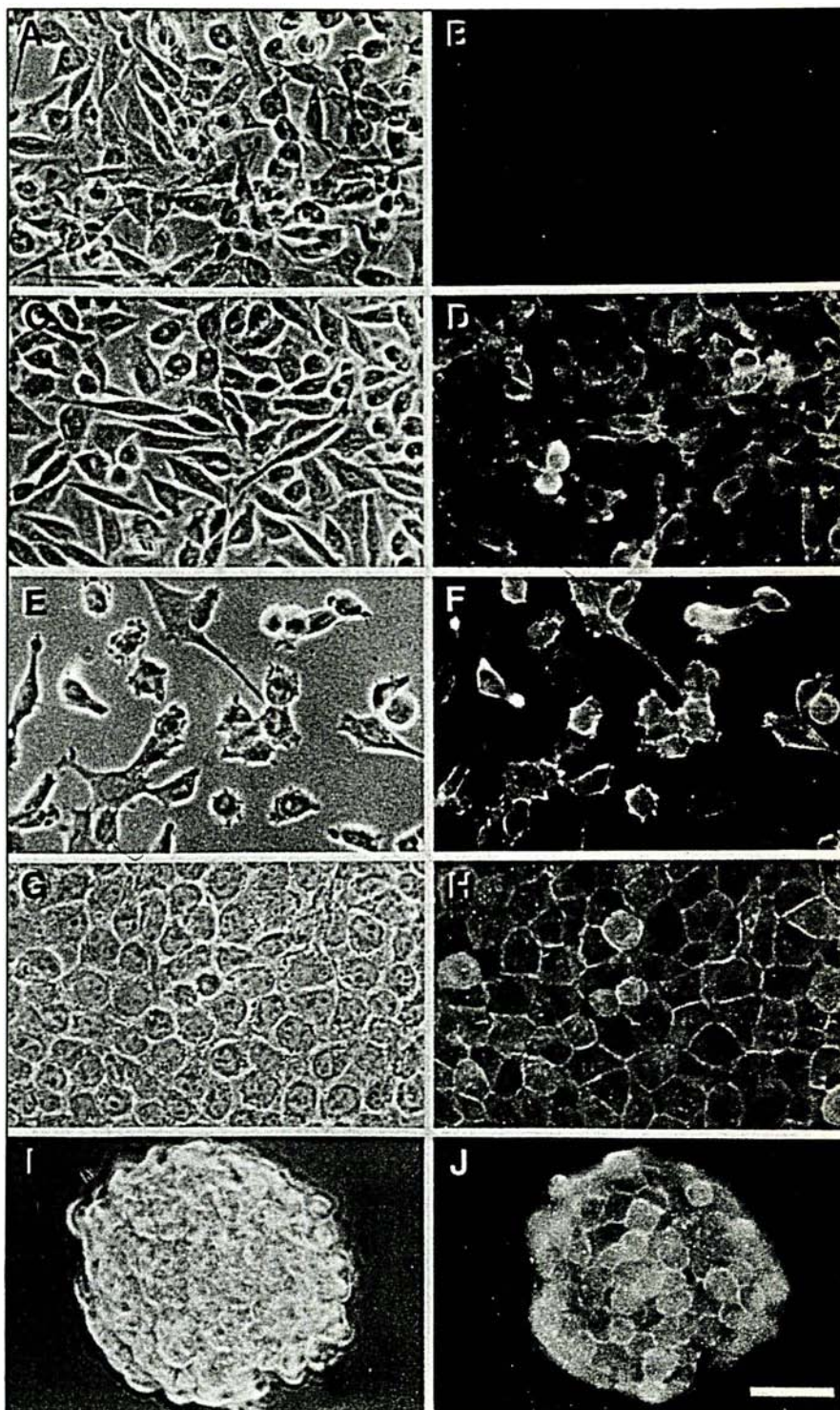


Figure 3. **Épithélialisation des fibroblastes exprimant la L-CAM.** Les cellules S180 (A, B) sont des cellules de sarcome de souris de type fibroblastique, l'expression de N-CAM dans ces cellules ne change en rien la morphologie des cellules (C, D). En revanche, l'expression de L-CAM induit une épithélialisation des cellules (E-H) qui forment à confluence un feuillet compact de cellules polygonales (G, H). En suspension, ces cellules forment des amas denses témoignant de la très forte adhésivité de ces cellules (I, J). (A-C, E, G, I) : contraste de phase. (B, D, F, H, J) : immunofluorescence anti-CAM. Barre : 50 μ m.

RÉFÉRENCES

1. Wilson HV. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool* 1907 ; 5 : 245-58.
2. Townes PA, Holtfreter J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool* 1955 ; 128 : 53-120.
3. Moscona A. Patterns and mechanisms of tissue reconstruction from dissociated cells. In : Rudnick D, éd. *Developing Cell Systems and Their Control*. New York : Ronald Press, 1960 : 45-70.
4. Steinberg MS. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis ? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J Exp Zool* 1970 ; 173 : 395-434.
5. Sperry RW. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963 ; 50 : 703-10.
6. Öbrink B. Epithelial cell adhesion molecules. *Exp Cell Res* 1986 ; 163 : 1-21.
7. Edelman GM. Morphoregulatory molecules. *Biochemistry* 1988 ; 27 : 3533-43.
8. Jessel TM. Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. *Neuron* 1988 ; 1 : 3-13.
9. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily. Domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol* 1988 ; 6 : 341-405.
10. Anderson H. Adhesion molecules and animal development. *Experientia* 1990 ; 46 : 2-13.
11. Thiery JP, Delouée A, Gallin WJ, Cunningham BA, Edelman GM. Ontogenetic expression of cell adhesion molecules : L-CAM is found in epithelia derived from the three primary germ layers. *Dev Biol* 1984 ; 102 : 61-78.
12. Hatta K, Takagi S, Fujisawa M, Takeichi M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 1987 ; 120 : 215-27.
13. Duband JL, Volberg T, Sabanay I, Thiery JP, Geiger B. Spatial and temporal distribution of the adherens-junction-associated adhesion molecule A-CAM during avian embryogenesis. *Development* 1988 ; 103 : 325-44.
14. Takeichi M. The cadherins : cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988 ; 102 : 639-55.
15. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule : structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987 ; 236 : 729-40.
16. Gallin WJ, Sorkin BC, Edelman GM, Cunningham BA. Sequence analysis of a cDNA clone encoding the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 2808-12.

les dans des fibroblastes modifie la morphologie des cellules. C'est en effet ce que l'on observe pour les cellules S180 exprimant la L-CAM (S180L) et la N-cadhérine (S180N-cad) (figure 3). Les cellules S180 parentales sont des cellules de type fibroblastique. Alors que l'expression de N-CAM ne modifie en rien la morphologie de ces cellules, l'expression de L-CAM induit la formation de feuillettes de cellules polygonales d'aspect épithélial [22]. La L-CAM est concentrée aux régions de contact entre cellules S180L et elle est codistribuée avec l'actine sous-membranaire. Les anticorps anti-L-CAM dissocient les feuillettes épithéliales de cellules S180L. Afin de définir plus précisément la nature et les limites du changement de morphologie de ces cellules, nous avons recherché au microscope électronique la présence de jonctions intercellulaires (figure 4). Nous avons observé dans les cellules transfectées la présence de jonctions intermédiaires, de type *adherens** [28], et des jonctions communicantes, de type *gap** [29]. La présence de ces jonctions communicantes est confirmée par une très forte augmentation du couplage métabolique des cellules transfectées*. De plus, la fréquence des deux types de jonctions intercellulaires et des cellules couplées est très fortement diminuée sous l'effet des anticorps anti-L-CAM. L'expression de L-CAM dans les cellules S180 induit le franchissement d'une étape primordiale de la transformation de fibroblastes en cellules épithéliales, caractérisée par la redistribution de l'actine et la formation de jonctions intermédiaires et de jonctions communicantes. Ce changement de phénotype implique sûrement l'expression de gènes épithéliaux induite par la L-CAM, suggérant que cette molécule n'est pas uniquement une colle cellulaire, mais qu'elle peut — par un mécanisme encore inconnu — assurer la transduction d'un signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule.

L'expression de N-cadhérine dans les cellules S180 induit le même changement de morphologie que l'expression de la L-CAM [24]. Comme nous l'avons observé pour la L-CAM, la N-cadhérine accumulée aux zones de contact entre cellules est

* LEXIQUE *

Les jonctions intermédiaires encore appelées jonctions adhérentes ou *zonulae adherens* se rencontrent dans différents types cellulaires parmi lesquels les épithéliums. En microscopie électronique classique, elles se caractérisent par des zones où les membranes cellulaires des deux cellules adjacentes sont séparées par une distance constante de 15 nm. La face cytoplasmique de la membrane plasmique est associée à des filaments d'actine. Les molécules d'adhérence dépendantes du calcium, L-CAM et N-cadhérine, sont les ligands transmembranaires de ces jonctions. Dans l'épithélium polarisé, ces jonctions forment une ceinture continue autour de chaque cellule (*zonulae adherens*) située au pôle apical de la cellule, juste en dessous des jonctions serrées ou jonctions de type *tight* encore appelées jonctions étanches ou *zonulae occludens*. Les jonctions intermédiaires sont, avec les desmosomes auxquels elles sont souvent assimilées à tort, des jonctions d'adhérence et jouent un rôle architectural important en unissant entre eux les cytosquelettes des cellules adjacentes.

Les jonctions communicantes ou jonctions « *gap* » apparaissent en microscopie électronique classique sous forme de zones de directe apposition des membranes plasmiques. Les répliques obtenues par cryofracture de ces jonctions présentent un réseau de canaux hexagonaux qui possèdent en leur centre une ouverture de 1,5 nm. Chaque particule hexagonale est formée par six protéines transmembranaires ou connexines, formant en leur centre le canal, elles font face à six autres connexines arrangées pareillement dans la membrane de la cellule adjacente. Les jonctions intermédiaires permettent le libre passage d'ions et de molécules de poids moléculaire inférieur à 1 000 d'une cellule à l'autre. Les autres types de jonctions communicantes rencontrées dans les cellules eucaryotes sont les synapses chimiques.

* Voir lexique, ci-contre.

colocalisée avec l'actine corticale. L'observation au microscope électronique des cellules S180N-cad a montré que l'expression de N-cadhérine induit la formation de jonctions intermédiaires et de jonctions communicantes tout comme l'expression de L-CAM, et que les anticorps anti-N-cadhérine empêchent cette induction. La N-cadhérine et la L-CAM marquées à l'immunoperoxydase sont présentes sur l'ensemble de la surface des cellules transfectées mais sont particulièrement abondantes au niveau des jonctions intermédiaires. La cytochalasine D, qui dépolymérise les filaments d'actine, inhibe l'agrégation des cellules S180 exprimant la L-CAM aussi bien que la N-cadhérine, suggérant que les filaments d'actine sous-membranaire jouent un rôle actif dans les interactions entre ces protéines d'adhérence [30].

In vivo, la N-cadhérine disparaît en même temps que les jonctions intermédiaires lorsque les cellules de la crête neurale se séparent de la plaque neurale pour commencer leur migration [11-13]. Elle apparaît lorsque le mésoderme se condense pour former les somites. Elle disparaît ensuite des cellules mésenchymateuses qui se détachent des somites pour former le sclérotome. Dans les cellules exprimant normalement la N-cadhérine, comme dans les cellules S180 N-cad, cette molécule est accumulée dans les jonctions intermédiaires, dont elle est le ligand [14, 19]. Ces résultats suggèrent que l'expression d'une CAM dépendante du calcium est une étape nécessaire à la transformation mésenchyme-épithélium *in vivo*, favorisant la formation des *zonula adherens*, qui permettraient la formation des autres types de jonctions intercellulaires épithéliales.

Les CAM induisent la ségrégation cellulaire *in vitro*

Pour analyser le rôle des CAM dans la ségrégation des cellules, nous avons utilisé les lignées de cellules S180, exprimant la L-CAM, la N-cadhérine ou les deux molécules à la fois avec des niveaux d'expression différents. Afin d'étudier les inter-

ms n° 6, vol. 7, juin-juillet 91

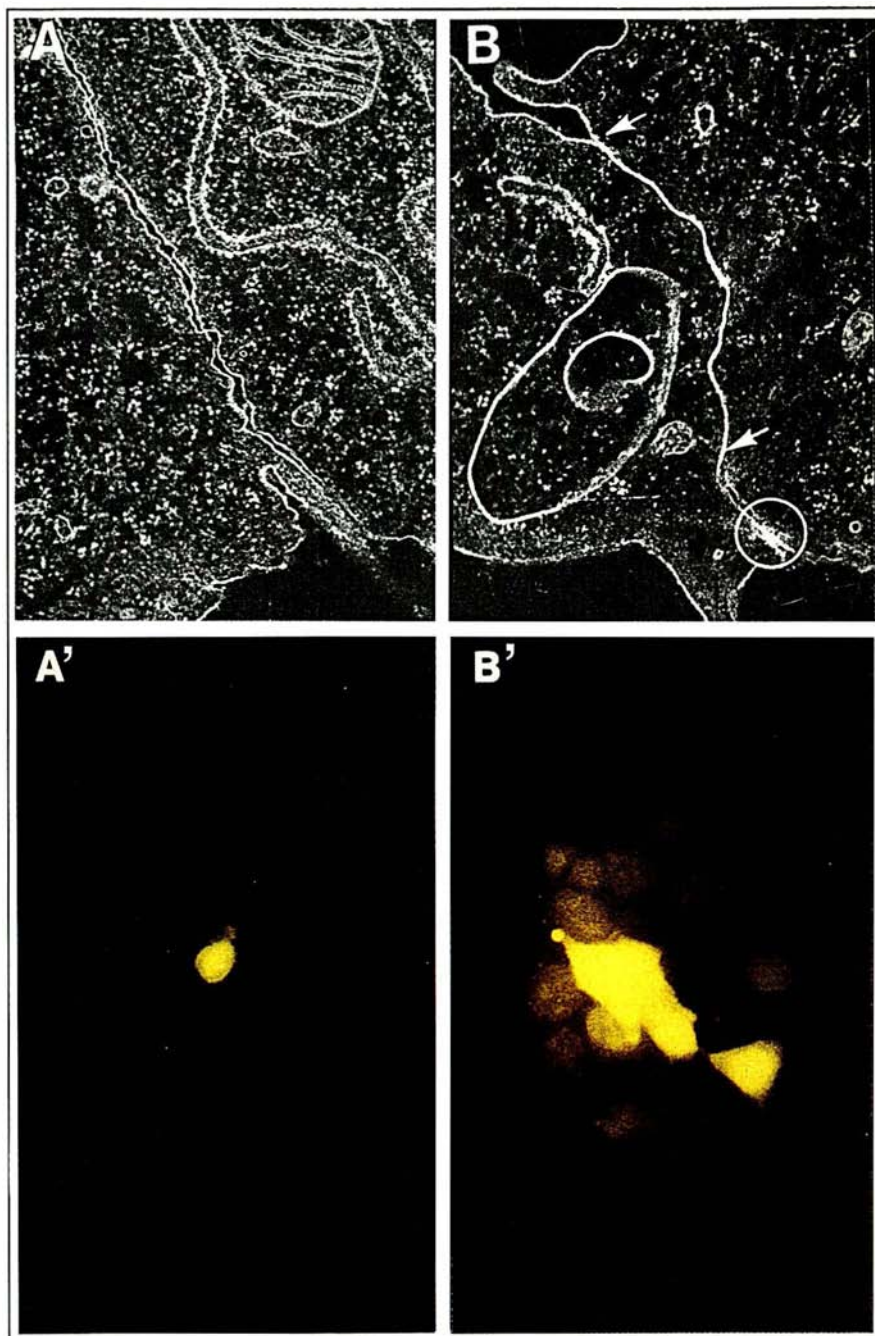


Figure 4. **L'expression de L-CAM induit la formation de jonctions intercellulaires de type intermédiaires et communicantes.** Les cellules S180, lorsqu'elles sont en contact, sont uniquement jointives (A). (B) : les cellules exprimant la L-CAM présentent dans les zones de contact intercellulaire des structures jonctionnelles de type communicantes (flèches) et intermédiaires (cercle). Les jonctions communicantes, de type « gap » permettent le couplage électrique des cellules et l'échange de matériel cytoplasmique de faible poids moléculaire. La fonctionnalité de ces jonctions peut être vérifiée par la diffusion d'une cellule à l'autre d'un marqueur fluorescent (jaune de Lucifer). Injecté à une cellule, ce marqueur ne peut gagner les cellules adjacentes qu'au travers des jonctions communicantes. Dans une monocouche de cellules S180, le jaune de Lucifer ne diffuse pas dans les cellules adjacentes à la cellule injectée (A'). Le marqueur injecté dans une cellule exprimant la L-CAM diffuse vers les cellules contiguës (B'), montrant ainsi que les structures jonctionnelles observées en microscopie électronique sont fonctionnelles. (A et B \times 20500).

RÉFÉRENCES

17. Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* 1988 ; 106 : 873-81.
18. Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, *et al.* The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca^{2+} -dependent cell adhesion. *EMBO J* 1987 ; 6 : 3647-53.
19. Volk T, Geiger B. A-CAM : A 135-kD receptor of intercellular *adherens* junctions. I. Immunoelectron microscopic localization and biochemical studies. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 1441-50.
20. Hay ED. Cell biology of the extracellular matrix. New York : Plenum Publishing Corp 1981 ; 379-409.
21. Edelman GM, Murray BA, Mège RM, Cunningham BA, Gallin WJ. Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecule after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 8502-6.
22. Mège RM, Matzusaki F, Gallin WJ, Goldberg JI, Cunningham BA, Edelman GM. Construction of epitheloid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 7274-8.
23. Nagafuchi A, Shirayoochi Y, Okagaki K, Yasuda K, Takeichi M. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 1987 ; 329 : 341-3.
24. Matzusaki F, Mège RM, Jaffe SH, *et al.* cDNAs of cell adhesion molecules of different specificity induce changes in cell shape and border formation in transfected S180 cells. *J Cell Biol* 1990 ; 110 : 1239-52.
25. Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 1988 ; 54 : 993-1001.
26. Friedlander DR, Mège RM, Cunningham BC, Edelman GM. Sorting-out is modulated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (CAMs) expressed on cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7043-7.
27. Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 1988 ; 107 : 1575-87.
28. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963 ; 17 : 375-412.
29. Gilula NB. Junctions between cells. In : Cox RP, ed. *Cell Communication*. New York : Wiley, 1974 : 1-29.
30. Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 1988 ; 7 : 3679-84.

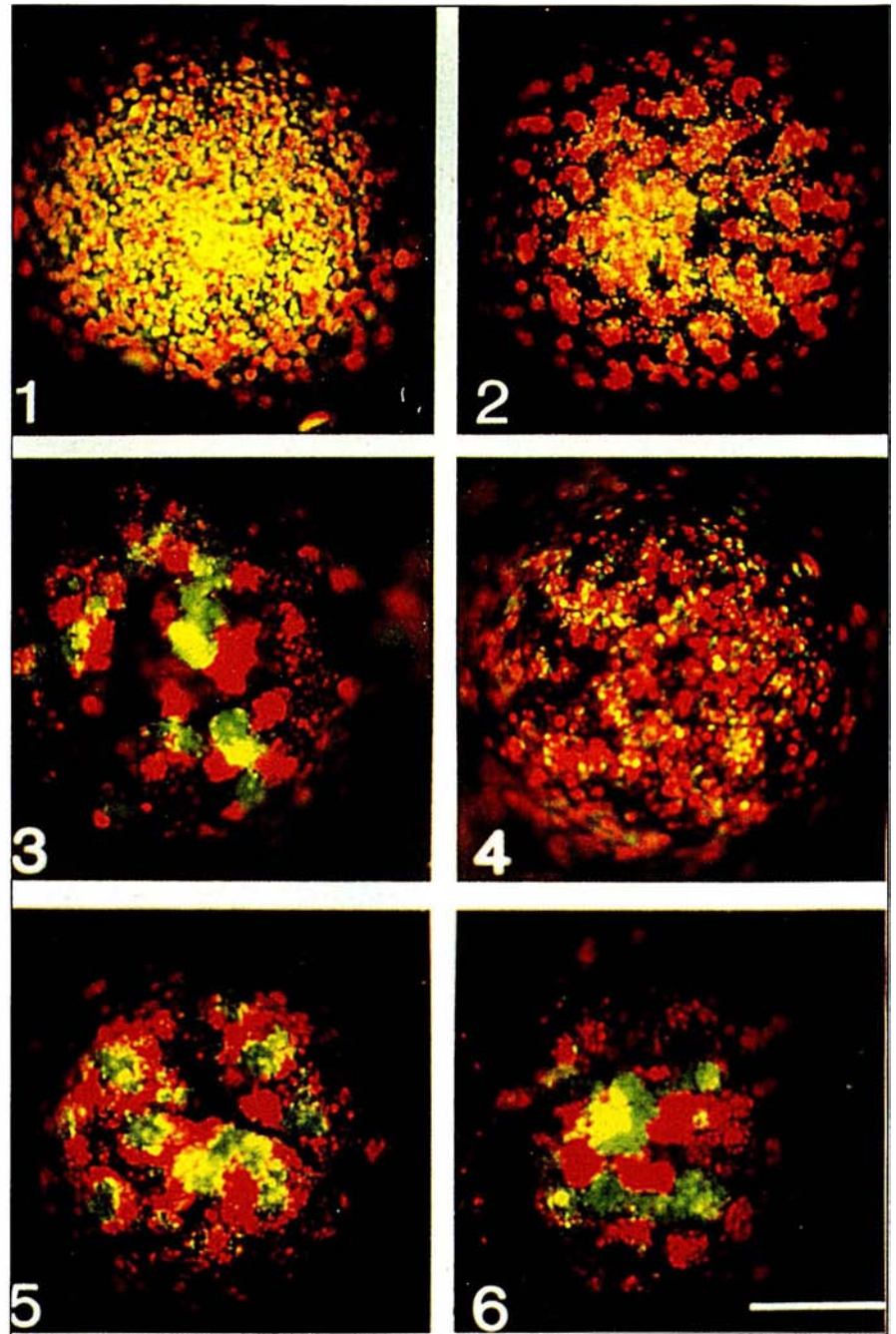


Figure 5. **Ségrégation des cellules transfectées.** Les cellules marquées par des fluorochromes, rouges ou verts, incorporés dans la membrane plasmique, sont mélangées de façon aléatoire, agglomérées en un amas hétérogène par centrifugation et observées régulièrement. 1 à 4 : les cellules S180 (rouges) et S180L (vertes) sont intimement mélangées au début de l'expérience (1). Dès 6 heures de culture (2), les cellules de chaque couleur commencent à se regrouper et à se séparer (2). La ségrégation cellulaire est complète après 16 heures (3). L'addition d'anticorps anti-L-CAM au début de l'expérience inhibe cette ségrégation (4). De même, les cellules S180 (vertes) et S180 N-cad (rouges) d'une part (5) et les cellules S180L (vertes) et S180 N-cad (rouges) d'autre part (6) se séparent. Ces ségrégations sont inhibées par les anticorps spécifiques. Barre : 400 μ m.

Tableau I

**CAPACITÉS DE SÉGRÉGATION DES CELLULES
EXPRIMANT DIFFÉRENTS NIVEAUX DE L-CAM ET DE N-CADHÉRINE**

	L	L ⁺	N-cad	N-cad ⁺	L N-cad ⁺	L ⁺ N cad	L ⁺ Ncad ⁺
S180	+	+	+	+	+	+	+
L	-	+	+	+	+	+	+
L ⁺		-	+	+	ND	ND	-
N-cad			-	+	+	+	+
N-cad ⁺				-	ND	ND	-

Ce tableau présente l'ensemble des expériences de ségrégation cellulaire réalisées avec les cellules S180 transfectées, selon le protocole décrit dans la figure 5.

L et L⁺ indiquent respectivement les cellules S180 exprimant un niveau faible et élevé de L-CAM. N-cad et N-cad⁺ indiquent les cellules exprimant différents niveaux de N-cadhérine. LN-cad⁺, les cellules exprimant peu de L-CAM et beaucoup de N-cadhérine, etc. + : les cellules ont ségrégué après 16 h, - : pas de ségrégation, ND : non déterminé.

Les cellules exprimant une CAM se séparent des cellules non transfectées. Les cellules exprimant la L-CAM et les cellules exprimant la N-cadhérine ségrègent. Les cellules exprimant différents niveaux d'une même CAM ségrègent. Enfin les cellules exprimant les deux CAM se séparent des cellules en exprimant une seule uniquement lorsque l'adhérence commune aux deux types cellulaires est faible.

actions *cis* entre N-cadhérine et L-CAM lorsqu'elles sont exprimées au sein de la même cellule, les cellules S180L exprimant la L-CAM ont été transfectées par l'ADNc codant pour la N-cadhérine afin d'obtenir des cellules S180L/N-cad exprimant à leur surface les deux molécules. Les anticorps divalents anti-L-CAM appliqués aux cellules S180L/N-cad induisent le regroupement des molécules de L-CAM dans le plan de la membrane cellulaire. Un tel « regroupement » ne perturbe pas la distribution de la N-cadhérine à la surface des cellules ; de même, le « regroupement » de la N-cadhérine n'a aucun effet sur la distribution de la L-CAM. Les anticorps anti-L-CAM et anti-N-cadhérine, séparément, n'empêchent pas l'agrégation des cellules doublement transfectées. Ces molécules n'ont donc pas d'interactions *cis* ; de plus, une seule de ces molécules est suffisante pour maintenir les contacts cellulaires. Les interactions *trans* entre les deux CAM sont faibles ou inexistantes car les cellules S180L et S180N-cad n'adhèrent pas entre elles.

L'absence d'interactions *cis* et *trans* entre L-CAM et N-cadhérine permet de proposer un rôle pour ces CAM de différencier spécificité dans la réor-

ganisation des épithéliums *in vivo*. L'ectoderme avant la neurulation exprime à la fois la L-CAM et la N-cadhérine. Lors de la formation de la plaque neurale, les deux épithéliums qui se séparent, le neuroectoderme et l'épiblaste, expriment différenciellement ces deux CAM. La présence, à la surface des cellules, d'au moins une CAM assurerait le maintien des structures épithéliales. La séparation et la formation de frontières entre ces deux épithéliums seraient la conséquence de différences dans la spécificité et la concentration des CAM exprimées. Une telle hypothèse peut être testée par des expériences classiques de ségrégation cellulaire, c'est-à-dire le regroupement des cellules de même type au sein d'un amas hétérogène de cellules (figure 5). Les cellules exprimant la L-CAM ou la N-cadhérine se séparent des cellules S180 non transfectées et les cellules S180L se séparent des cellules S180N-cad. Cette ségrégation est inhibée par les anticorps spécifiques. De même, les cellules exprimant des hauts niveaux de L-CAM sont capables de se séparer des cellules exprimant moins de L-CAM. Les mêmes observations ont été faites pour les cellules exprimant différents niveaux de N-cadhérine. Dans le cas des cel-

lules S180L/N-cad et des cellules S180L ou S180N-cad, ces cellules ne se séparent que lorsque le niveau de la CAM commune aux deux types cellulaires est faible et le niveau de l'autre CAM élevé. Lorsque l'une des CAM est bloquée par un anticorps, les cellules se comportent comme les cellules portant une seule CAM. Non seulement les différences de spécificité des CAM portées par les cellules, mais aussi les différences de niveaux d'expression peuvent induire la ségrégation cellulaire [26]. Ainsi, avec uniquement deux CAM, huit types cellulaires peuvent être distingués selon leur comportement de ségrégation (Tableau I), suggérant que les différences quantitatives et qualitatives de l'expression d'un nombre limité de CAM peuvent conduire à une grande variété de groupes cellulaires et de frontières lors de la morphogénèse. Ce modèle, bien évidemment, peut être étendu à plus de deux CAM.

L'expression différentielle de diverses CAM, *in vivo*, peut conduire à la formation de compartiments. En effet, l'expression de L-CAM ou de N-cadhérine induit la formation des jonctions communicantes entre les cellules qui, ainsi couplées, peuvent échanger du matériel cytoplasmique et de nombreux signaux tels que des seconds messagers : Ca²⁺ intracellulaire, pHi, AMP cyclique, etc. Elles peuvent de ce fait répondre simultanément à un signal d'induction ou à un facteur de croissance. En coculture, une frontière s'établit entre les cellules S180L et S180N-cad, frontière au travers de laquelle il n'existe pas de jonctions communicantes [24]. Les cellules de chaque type forment donc deux ensembles indépendants de cellules métaboliquement couplées mais non couplées à l'autre ensemble. Ainsi, *in vivo*, la modulation de l'expression des molécules d'adhérence contribuerait non seulement à la ségrégation des cellules en différents ensembles mais induirait aussi la formation de frontières entre ces ensembles, définissant des compartiments.

Le transfert génique démontre sans équivoque la fonction d'adhérence des CAM et leur capacité à former des ensembles cellulaires et à promouvoir leur ségrégation. Cette stra-

tégie reconstructive visant à reproduire *ex vivo* des étapes de la morphogénèse comme la transformation épithélium-mésenchyme et la ségrégation d'épithéliums permet de répondre à une des questions clés de la biologie du développement : quelles sont les séquences d'événements nécessaires et suffisants conduisant à ces processus de développement ? Dans le futur, l'étude de la régulation de l'expression des gènes codant pour ces molécules permettra sans aucun doute de déterminer la place exacte que tient l'adhérence cellulaire *in vivo* dans la morphogénèse, les processus de régénération et de métastase ■

Remerciements

Je voudrais remercier ici chaleureusement le Dr Gerald M. Edelman avec qui, et dans le laboratoire duquel, ce travail a été réalisé, ainsi que mes anciens collègues à l'université Rockefeller. Je suis particulièrement reconnaissant à M. Nicolet pour ses critiques du manuscrit.

Summary

Cell adhesion molecules : morphogenetic molecules

Cell adhesion is a peculiar way of communication between cells playing a fundamental role in pattern formation of pluricellular beings. It controls the shape, the movement and the growth of cells and cell collectives. Cell adhesion is mediated by extracellular matrix and cell surface glycoproteins such as the cell adhesion molecules (CAM). CAM expression is modulated during development according to very precise spatial and temporal sequences affecting almost all the cells of the organism. A definite group of cells at a definite time expresses a panel of CAM which distinguishes it from the other groups of cells. If a morphogenetic role has been proposed for these molecules, until

recently their function and precise role during embryogenesis and histogenesis were only putative. The isolation of DNAs coding for these CAM led to a breakthrough in the studies of these molecules. The gene transfer that became possible from there allowed to demonstrate the homophilic adhesion of the CAM. It showed also that the expression of Ca^{2+} dependent CAM (cadherin) is a major step of the reversible epithelial-mesenchymal transformation, which is a fundamental process appearing recurrently during development. Furthermore it appeared that CAM are among the molecules responsible for cell-sorting out *in vitro*. They govern cell collective formation and define borders between these collectives. Cell adhesion molecules govern the compartmentalization that occurs in the embryo during development.