

Le réseau de tétraspanines s'organise

Les tétraspanines constituent une superfamille de molécules de surface comportant au moins une vingtaine de membres chez l'homme [1]. Des propriétés suppressives de métastase ont été rapportées pour trois de ses membres, CD9, CD63 et CD82 [2]. En effet, la transfection de gènes codant pour ces molécules dans des lignées cancéreuses (prostate et côlon pour le CD82; mélanome pour CD9 et CD63) diminue fortement leur potentiel métastatique. En clinique, on observe en outre dans un certain nombre de cancers une corrélation entre la baisse d'expression de ces molécules et le développement de métastases. Des expériences *in vitro* montrent que les anticorps contre ces molécules bloquent la migration cellulaire et inhibent dans certains cas la croissance des lignées tumorales. Les tétraspanines sont largement exprimées, et il est probable que toutes les cellules de l'organisme (sauf les érythrocytes) en expriment plusieurs membres, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle dans les processus cellulaires fondamentaux. Sur les cellules lymphoïdes, les anticorps antitétraspanines déclenchent un signal intracellulaire conduisant à l'agrégation homotypique des cellules (CD9, CD53, CD81, CD82). Le pontage de certaines tétraspanines entraîne des modifications de calcium ou des phosphorylations sur tyrosines (CD53, CD81), et peut avoir un effet de co-stimulation (CD9, CD53, CD81, CD82).

Quelques éléments de structure

Ni l'effet suppresseur de métastases, ni les effets des anticorps *in vitro* ne sont expliqués au niveau moléculaire. Les tétraspanines, possèdent quatre régions transmembranaires

délimitant deux régions extracellulaires de tailles inégales et trois courts domaines cytoplasmiques; elles ne possèdent pas de motifs connus dans d'autres molécules, les seuls motifs retrouvés permettant de différencier les tétraspanines des autres molécules à quatre régions transmembranaires (CD20, canaux ioniques, connexines). Il est probable que les régions transmembranaires, les plus conservées, jouent un rôle commun, alors que les boucles extracellulaires, très différentes, apportent une spécificité fonctionnelle à ces molécules. Mais quelle spécificité? Les effets fonctionnels produits par les anticorps monoclonaux sont, on l'aura noté plus haut, dans la plupart des cas semblables. Il en est de même des associations formées par ces molécules: chacune de ces molécules co-précipite, avec des différences essentiellement quantitatives, probablement liées à leur niveau d'expression, un nombre important de molécules de surface, dont les autres tétraspanines. Certaines des molécules associées à plusieurs tétraspanines ont été identifiées: l'association la mieux caractérisée implique certains types d'intégrines b1 (a3b1, a4b1, a6b1 et, dans des cas particuliers, a5b1), qui sont les récepteurs des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène et les laminines. Cette association qui a lieu dans la majorité des cellules représente un lien possible avec les effets inhibiteurs de la migration et l'effet antimétastase. Les molécules HLA-DR et HLA de classe I dans les lymphocytes B, CD4 ou CD8 dans les lymphocytes T, interagissent également avec plusieurs tétraspanines. Chacune des tétraspanines participe à une multitude de complexes

indépendants (mais avec les mêmes partenaires), ou sont-elles les composants de complexes multimoléculaires incluant plusieurs tétraspanines? Outre des effets fonctionnels souvent identiques des anticorps, plusieurs arguments biochimiques sont en faveur de cette dernière hypothèse [3-5]: 1) les complexes contenant les tétraspanines sont de haut poids moléculaire, 2) un même hétérodimère (intégrine b1 ou HLA-DR) peut être associé à au moins deux tétraspanines dans un même complexe, 3) deux hétérodimères différents (intégrines et HLA-DR), connus pour être associés aux tétraspanines sont associés entre eux, 4) une tétraspanine peut être présente à plusieurs copies dans un même complexe.

Organisation de complexes multimoléculaires

De nouvelles données viennent alimenter l'hypothèse des complexes multimoléculaires et apportent une première idée de l'organisation de ces complexes. Il est bien connu actuellement que la tétraspanine CD81 forme avec le CD19 et le CD21 (le récepteur de la fraction C3d du complément) un complexe à la surface des cellules lymphoïdes B dont le rôle est de régler les seuils d'activation du récepteur de l'antigène [6]. Les anticorps monoclonaux ciblant les molécules du complexe exercent des effets semblables: inhibition de la prolifération de lignées lymphoïdes B, agrégation homotypique et potentialisation des flux calciques observés avec de faibles concentrations d'anticorps dirigés contre les IgM de surface. A l'intérieur de ce complexe, le CD19 est la seule molécule à posséder un grand domaine intracytoplasmique pouvant lier des molécules

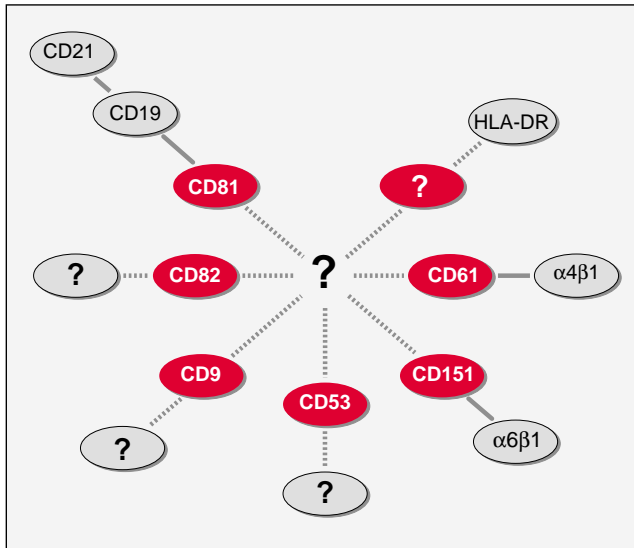


Figure 1. **Organisation hypothétique du réseau de tétraspanines sur les cellules lymphoïdes B.** Les tétraspanines (en rouge) pourraient intervenir étroitement avec une ou plusieurs molécules partenaires (en gris) qu'elles connecteraient aux autres tétraspanines et à leurs partenaires. Les liens en pointillé correspondent aux interactions dissociées par la digitonine.

impliquées dans la transmission du signal, et est logiquement responsable de l'effet de co-stimulation. En revanche, l'agrégation homotypique nécessite la présence du CD81. Par ailleurs, le signal Ca^{2+} résultant du pontage du CD19 est diminué dans une lignée murine déficiente en CD81 [7]. Ces résultats suggèrent que le CD81 pourrait relayer une partie du signal déclenché après pontage du CD19. Il vient d'être montré que deux autres tétraspanines, le CD9 et le CD82 étaient associées au CD19 [8]. En ce qui concerne le CD9, cette association a été retrouvée sur les cellules de Burkitt après transfection de CD9, sur les cellules d'une lignée préB et sur les précurseurs B isolés de la moelle osseuse normale. Elle s'avère fonctionnelle puisque le pontage du CD9 entraîne, comme celui du CD81, la phosphorylation sur résidus tyrosine de plusieurs protéines, dont le CD19 lui-même. L'utilisation de différents détergents a permis de mieux caractériser les associations entre tétraspanines et CD19. La digitonine, qui dissocie la plupart des complexes dans lesquels sont impliquées les tétraspanines, respecte les complexes CD81/CD19 et révèle que ceux-ci se forment sans autre molécule de surface. L'interaction entre ces deux molécules est donc probablement directe. Au contraire, l'association CD19/CD9 est dissociée par la digitonine, et n'est conservée qu'en

Brij 97, un détergent respectant le plus grand nombre de complexes impliquant les tétraspanines, dont l'association CD9/CD81. L'association CD9/CD19 est donc probablement indirecte. Ainsi, dans la chaîne probable d'interactions moléculaires liant le CD19 au CD9, un maillon sensible à la digitonine aurait été identifié, il s'agit de l'interaction CD9/CD81, suggérant que le CD81 est un intermédiaire entre le CD9 et le CD19.

La même étude a montré que les anticorps CD19 co-précipitent de façon spécifique des molécules comigrant avec les intégrines b1 et les antigènes HLA-DR, tous deux associés aux tétraspanines. Cette co-précipitation est faible et n'est observée qu'en Brij 97, ce qui suggère qu'elle est indirecte, probablement par l'intermédiaire des tétraspanines. Ces résultats sont en faveur d'un modèle dans lequel le CD81, lié au CD19 par ses régions extracellulaires, connecterait celui-ci aux autres tétraspanines, et par conséquent aux autres molécules associées aux tétraspanines. D'autres résultats récents, également fondés sur la stabilité des complexes dans des détergents dissociant les interactions entre tétraspanines suggèrent que le CD81 pourrait également connecter l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ aux autres tétraspanines, tandis que la tétraspanine CD151 connecterait les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ [9, 10].

Par extension, il est possible d'envisager un modèle dans lequel chaque tétraspanine lierait une molécule partenaire aux autres tétraspanines. Ainsi les tétraspanines formeraient un réseau d'interactions moléculaires à la surface des cellules, réalisant une passerelle entre les différentes molécules partenaires, celles-ci pouvant être par exemple des récepteurs (les intégrines) ou des molécules de transmission du signal (le CD19). Ce réseau d'interactions (réseau de tétraspanines ou *tetraspan web*) dépendant de l'expression des tétraspanines, permettrait l'intégration de plusieurs voies de signalisation. Dans ce contexte, les tétraspanines joueraient le rôle d'organisateur de surface [4], d'adaptateurs [2] ou de facilitateurs [1].

On peut formuler l'hypothèse selon laquelle le réseau de tétraspanines joue un rôle dans les processus de différenciation cellulaire, par exemple dans celle de la lignée lymphoïde B, au cours de laquelle l'expression de CD9, importante au cours des stades précoces, diminue considérablement au moment de l'acquisition des immunoglobulines de surface et d'une autre tétraspanine, le CD37. Il est enfin possible que ce soit par ce réseau que les tétraspanines empêchent les cellules de métastaser: la perte d'une tétraspanine pourrait conduire à la déconnection du réseau de la molécule partenaire; la dérégulation de l'activité de cette partenaire, modifierait ainsi ses caractéristiques fonctionnelles.

E.R.
C.B.

1. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; 11: 428-42.
2. Hemler ME, Mannion BA, Berditchevski F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287: 67-71.
3. Angelisova P, Hilgert I, Horejsi V. Association of four antigens of the tetraspanin family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* 1994; 39: 249-56.
4. Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudrière C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. CD9, CD63, CD81 and CD82 are components of a surface tetraspanin network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2657-65.

5. Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell* 1996; 7: 193-207.
6. Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 1997; 6: 107-18.
7. Tsitsikov EN, Gutierrez-Ramos JC, Geha RS.

- Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10844-9.
8. Horvath G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem* 1998; 273: 30537-43.
9. Serru V, Le Naour F, Billard M, et al. Selective

- tetraspan/integrin complexes (CD81/a4b1, CD151/a3b1, CD151/a6b1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* 1998 (sous presse).
10. Yauch RL, Berditchevski F, Harler MB, Reicher J, Hemler ME. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2751-65.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Empreinte génétique et cancer du côlon.** La perte de l'empreinte génétique est un facteur de cancérogénèse qui s'affirme régulièrement. L'empreinte génétique est un phénomène épigénétique qui restreint l'expression d'un gène à un seul allèle, d'origine paternelle ou maternelle. Ce phénomène n'est présent que dans quelques régions spécifiques des chromosomes [1]. Les pertes préférentielles d'hétérozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) sur le chromosome maternel 11p15 responsable de tumeurs de Wilms (*m/s* 1998, n° 2, p. 238), et, sur le chromosome maternel 1p36, de neuroblastome, ont conduit à reconnaître la présence de gènes inhibiteurs de croissance réduits au silence sur l'allèle paternel: *H19* et *p57^{KIP2}* en 11p15 et *p73* en 1p36 (*m/s* 1997, n° 12, p. 1472). A l'inverse, on a montré que certains gènes de croissance, *IGF2* en particulier, dont l'allèle maternel est réprimé dans les tissus normaux, voient disparaître cette empreinte dans des

tumeurs où les deux allèles sont exprimés. On parle alors de perte d'empreinte ou LOI (*loss of imprinting*). On avait décrit ce phénomène dans les tumeurs de Wilms (*m/s* 1994, n° 2, p. 216), on l'observe aussi dans divers cancers de l'adulte dont les cancers du sein, du poumon ou du côlon [2]. Une étude portant sur 27 cancers colo-rectaux a comporté la recherche de LOI du gène *IGF2* dans la tumeur, la muqueuse colique saine et les leucocytes [3]. Elle a été retrouvée dans 12 tumeurs et, chez les mêmes malades, dans la muqueuse colique saine. Chez 4 d'entre eux elle était retrouvée aussi dans les cellules sanguines. Ce qui contraste avec les résultats de la série témoin où la LOI n'est présente dans la muqueuse colique et dans les cellules sanguines respectivement que chez 12% et 13% des sujets. Les auteurs ont alors comparé la fréquence de la LOI d'*IGF2* chez les malades à celle d'une instabilité des microsatellites (sans anomalie génétique du système de

réparation de l'ADN) : ils ont trouvé la fréquence de LOI beaucoup plus élevée chez les malades ayant une instabilité des microsatellites. Mais il faut noter qu'une autre équipe a trouvé un résultat inverse [4]. En revanche, cette deuxième équipe a trouvé les mêmes résultats concernant la fréquence de la LOI d'*IGF2* chez les malades et sa présence sur la muqueuse saine, ce qui amène les deux équipes à conclure que la perte de l'empreinte précède et prédispose à la tumorigénèse. Le mécanisme de la LOI réside sans doute dans des anomalies de la méthylation des îlots CpG en 5' du gène mais il reste surtout obscur.

- [1. Babinet C. *Med Sci* 1992; 8: 65-70.]
 [2. Miyaki M. *Nat Med* 1998; 4: 1236-7.]
 [3. Cui H, et al. *Nat Med* 1998; 4: 1272-80.]
 [4. Kinouchi, et al. *Cancer Lett* 1996; 107: 105-8.]

Sixième NAT (Nant s/Actualités/Transplantation) 10-11 juin 1999 - NANTES (France) Targeting Recipient Immune Response through Bioreagents

- | | |
|---------------|--|
| B. Malissen | - Molecular interaction in first signal. |
| T. Strom | - Manipulation of allo-recognition through T-cell growth factor. |
| J. Thomas | - Tolerance induction using anti-CD3 immunotoxine antibodies. |
| L. Chatenoud | - Immuno-intervention through lymphocyte receptor targeting. |
| R. Zhong | - Prevention rejection and induction of tolerance by monoclonal antibodies against CD45RB. |
| J. Bluestone | - Second signals in allo and xeno-recognition. |
| D. Latine | - Immuno-intervention through CD2/LFA3 inhibition. |
| T.C. Pearson | - Manipulation of B7/CD28-CTL44 in primates. |
| S. Knechtle | - Inhibition of CD40 L pathway. |
| A. Wörn | - Engineering of scFv fragments for extracellular and intracellular applications. |
| B. Vanhove | - ScFv and intra-cellular bioreagents. |
| R. Dunbar | - HLA tetramers. |
| G. Grassy | - Computer-assisted rational design of immunosuppressive peptides. |
| N. Suciù-Foca | - Altered Peptides <i>in vivo</i> . |
| F. Sanfilippo | - Inhibition of complement <i>in vivo</i> . |
| J.S. Pober | - Targeting second signals provided by vascular endothelial cells. |

Renseignements et formulaires d'Abstracts: NAT Secrétariat ITERT, CHU Hôtel-Dieu, 30, boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes (France). Fax: (33) 2 40 08 74 11. **Inscriptions:** 1 900 FF (dèjeuners et dîners compris). Date limite de remise des abstracts: 1^{er} avril 1999.