

Contrôle de l'adhérence cellulaire

Le fonctionnement des cellules vivantes est, en règle générale, déterminé par de multiples étapes d'attachement et de détachement au contact d'autres cellules ou de surfaces biologiques. Ces phénomènes influencent en particulier la survie et la prolifération (*anchorage dependence*), la différenciation et les processus de migration cellulaires. Cette adhérence est déterminée par l'expression membranaire de récepteurs spécialisés dont l'activité fonctionnelle est contrôlée par une diversité remarquable de mécanismes. Ce texte décrit ces différents mécanismes, de nature très générale, et illustre leur importance par quelques exemples. Par souci de clarté, nous distinguerons quatre étapes dans le processus d'adhérence, et quatre mécanismes principaux de régulation des récepteurs cellulaires.

Les quatre étapes de l'adhérence cellulaire

Les processus d'attachement et de détachement comportent en règle générale quatre phases successives (figure 1):

Approche

L'approche d'une cellule et d'une surface est influencée par des forces produites par:

- le milieu extérieur (par exemple, l'écoulement sanguin au cours de l'interaction leucocyte/endothélium);
- les cellules (la force protrusive exercée par un lamellipode);
- les interactions des surfaces en présence, qui peuvent engendrer une force répulsive avant que ne survienne le contact des récepteurs.

Formation de la première liaison

Cette première liaison constitue sans doute l'élément déterminant de

l'adhérence, à la fois parce que sa survenue est nécessaire à l'attachement et parce que sa durée conditionne le renforcement de l'interaction. Cette étape est évidemment conditionnée par les propriétés fonctionnelles des récepteurs cellulaires.

Consolidation de l'attachement

Durant les minutes qui suivent la formation de la première liaison, l'attachement est considérablement renforcé: ainsi, alors qu'une interaction ligand-récepteur peut être rompue par une force de quelques dizaines de piconewtons [1], une force mille fois supérieure (quelques dizaines de nanonewtons) est souvent nécessaire pour séparer rapidement deux cellules liées entre elles [2, 3]. Ce renforcement comporte des événements complexes nécessitant une participation active de la cellule: étalement, réorganisation du cytosquelette, redistribution latérale des molécules membranaires.

Détachement

Il n'est pas possible de discuter ici les mécanismes de rupture de l'adhérence. Cependant, il convient de noter qu'il est parfois plus difficile pour une cellule de se libérer d'une surface que de s'y attacher, et de multiples mécanismes (forces de traction, affaiblissement du cytosquelette, protéolyse) sont parfois nécessaires pour réaliser ce détachement.

Contrôle de l'adhérence cellulaire

Nous évoquerons maintenant quatre mécanismes principaux de contrôle de l'adhérence. Ceux-ci peuvent être mis en jeu simultanément ou de manière séparée, et leur importance relative dépend de la nature des récepteurs responsables de l'adhérence.

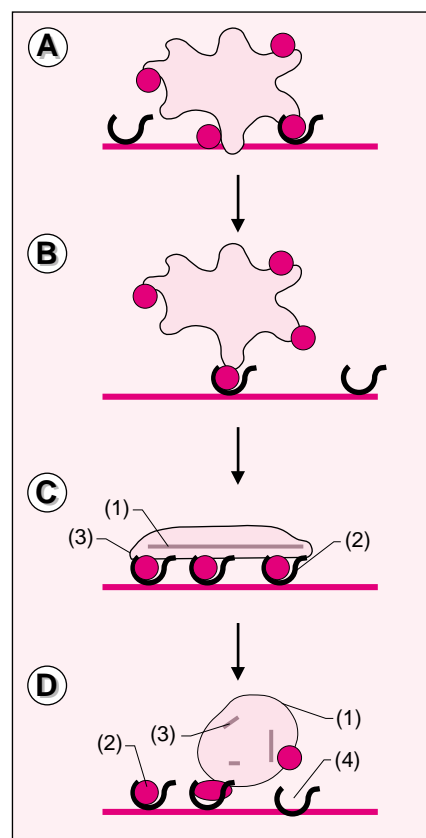


Figure 1. **Les quatre étapes de l'adhérence cellulaire.** **A.** Approche des surfaces (forces extérieures ou mouvements actifs) et répulsion engendrée par la matrice péricellulaire. **B.** Formation de la première liaison (les paramètres critiques sont la cinétique de formation et la durée de vie). **C.** Renforcement de l'adhérence: réorganisation du cytosquelette (1), concentration des récepteurs (cercles rouges) dans la région de contact (2), déformation de la membrane (3). **D.** Détachement: arrondissement de la cellule (1), arrachement ou clivage de certains récepteurs (2), dissociation du cytosquelette (3), rupture des liaisons (4).

Contrôle des répulsions intercellulaires

On sait depuis plus de trente ans que les membranes plasmiques cellulaires sont généralement recouvertes d'une couche externe riche en polysaccharides et portant une charge électrique négative, qui apparaît comme une région vide en microscopie électronique, en l'absence de coloration spécifique. Cette région a reçu la dénomination de glycocalyx, matrice péricellulaire, *cell coat* ou *fuzzy coat*. Les molécules glucidiques, qui représentent 5 % à 10 % de la masse membranaire, peuvent être présentes sous forme de chaînes oligosaccharidiques relativement courtes, liées aux glycoprotéines membranaires, ou constituer les chaînes très étendues des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes qui sont liés à la membrane de manière plus ou moins étroite. La leucosialine (ou CD43) constitue un exemple assez représentatif: qualifiée de « mucinique » du fait de la présence de plusieurs dizaines de chaînes oligosaccharidiques liées à des résidus sérine ou thréonine, cette molécule a de ce fait une structure étendue, lui conférant une longueur de l'ordre de 45 nm. Il a été suggéré qu'elle occupait une fraction notable (quelques %) de la surface des leucocytes.

L'action anti-adhésive de la matrice péricellulaire semble bien établie par des approches expérimentales complémentaires:

– On sait depuis longtemps que l'adhérence cellulaire peut être facilitée lorsque la charge négative des membranes est réduite par un traitement enzymatique (neuraminidase).

– A l'inverse, une surexpression de molécules volumineuses du glycocalyx (CD43, épisialine, épiglycane), telle qu'elle est induite par transfection de l'ADNc codant pour ces molécules, réduit l'adhérence cellulaire [4]. Réciproquement, des lymphocytes déficitaires en leucosialine (CD43) ont une capacité augmentée d'adhérer à des cellules endothéliales *in vivo* ou à des surfaces couvertes de fibronectine ou de molécules ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) [5].

L'importance physiologique de ce phénomène est précisée par quelques données supplémentaires récentes:

– Il a été rapporté dans deux modèles différents que l'effet anti-adhésif de la couche polysaccharidique extracellulaire pouvait n'apparaître que lorsque le contact intercellulaire était transitoire, en présence d'un écoulement liquide [6, 7]. Cette condition est en particulier rencontrée au cours du roulement (*rolling*) des leucocytes sur les parois endothéliales, préliminaire à la transmigration vers les tissus périphériques. Ce caractère transitoire de l'anti-adhérence pourrait être lié à la mobilité latérale des molécules membranaires. En effet, des structures anti-adhésives telles que les molécules CD43 peuvent migrer à distance des régions adhésives dans les minutes qui suivent le contact intercellulaire [8]. Cette migration pourrait mettre en jeu des mécanismes actifs voisins de ceux qui sont responsables du *capping* de certaines molécules membranaires.

– La barrière répulsive anti-adhésive ne constitue pas une structure permanente. Ainsi, l'activation des cellules phagocytaires peut entraîner une libération protéolytique de la molécule CD43 [9] et une modification des glycosylations membranaires [10]. Ce remaniement constitue bien un mécanisme physiologique de contrôle de l'adhérence: on sait depuis longtemps que la fonction des macrophages est sous le contrôle de facteurs tels que l'interféron gamma. En utilisant le modèle de la lignée phagocytaire THP-1, nous avons récemment montré que l'activité du récepteur FcγRII (CD32) impliqué dans la phagocytose était fortement augmentée lorsque les cellules étaient traitées par l'interféron gamma, et que cette augmentation était liée à une diminution de la sialylation de la molécule CD43 [11]. Le glycocalyx constitue donc une barrière dynamique anti-adhésive, et la réduction de cette barrière peut constituer un mécanisme physiologique d'augmentation de l'adhésivité cellulaire.

Régulation de l'expression membranaire des molécules d'adhérence

Il s'agit sans doute du mécanisme de contrôle conceptuellement le plus simple. Ainsi, les cellules endothé-

liales au repos n'expriment pas de molécules de type sélectine membranaire*. L'activation de ces cellules peut entraîner une augmentation de l'expression de ces sélectines par plusieurs mécanismes [12] comprenant l'exocytose rapide (en quelques minutes) de la P-sélectine conservée dans les grains de Weibel-Palade ou le déclenchement de la synthèse de molécules de E-sélectine dont l'expression membranaire sera maximale en quelques heures. Réciproquement, certains récepteurs (L-sélectine leucocytaire) peuvent être libérés en quelques minutes par protéolyse consécutive à une activation cellulaire. Ils peuvent également être retirés de la membrane par un mécanisme d'endocytose conduisant à une dégradation (E-sélectine) ou à la constitution d'une réserve intracellulaire susceptible d'être réutilisée (P-sélectine).

Le contrôle de l'expression des récepteurs cellulaires peut-être qualitative (comme c'est le cas des sélectines endothéliales qui sont en principe absentes de la surface des cellules au repos) ou quantitative (comme c'est le cas de molécules de la famille des intégrines ou de la superfamille des immunoglobulines, dont font partie des molécules comme VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) ou ICAM-1.

Contrôle fonctionnel intrinsèque

Il est depuis longtemps connu que l'activité fonctionnelle de nombreuses protéines peut être contrôlée par des modifications conformationnelles (contrôle allostérique des enzymes). Il est rapidement apparu que ce mode de régulation s'appliquait à des récepteurs tels que les intégrines [13]. Ainsi, les molécules LFA-1 (*leukocyte function-associated 1*) sont inactives sur les lymphocytes au repos, et un signal est nécessaire pour leur conférer une capacité fonc-

* Les sélectines sont des glycoprotéines dont la structure protéique associe un domaine lectine, des domaines de type EGF (epidermal growth factor) et des domaines homologues aux domaines de contrôle du complément. Il en existe trois types: L-(leucocyte)-sélectine, E-(endothelial)-sélectine et P(platelet)-sélectine.

tionnelle [8]. La modulation peut être intrinsèque (modification de l'affinité) ou extrinsèque (mécanismes post- ou péri-récepteur) et la distinction entre ces deux possibilités n'était pas, jusqu'à une période récente, facile à effectuer. C'est cette difficulté qui a pu conduire à introduire le concept d'avidité, qui représente l'« efficacité » avec laquelle un récepteur membranaire se lie à son ligand.

Depuis quelques années, des progrès méthodologiques et conceptuels ont permis de quantifier de manière très précise les fonctions de molécules d'adhérence liées à des surfaces et de montrer comment ces fonctions pouvaient être réglées [14, 15]. Ainsi, l'interaction de deux molécules solubles peut être décrite de manière pratiquement exhaustive par deux paramètres, les constantes d'association, k_{on} , et de dissociation, k_{off} , dont le rapport est égal à la constante d'affinité. Cependant, pour décrire l'efficacité adhésive de deux récepteurs liés à des surfaces, il faut déterminer deux fonctions: $k_{on}(d)$ est la fréquence d'association de deux molécules dont les points d'ancrage membranaire sont situés à une distance d ; $k_{off}(F)$ est la fréquence de dissociation d'un couple ligand-récepteur soumis à une force F .

Récemment, des outils nouveaux tels que la microscopie de force atomique, les écoulements hydrodynamiques ou la manipulation de vésicules flexibles ont permis d'observer de manière relativement directe l'association et la séparation de récepteurs cellulaires. La chambre à flux laminaire est sans doute l'outil conceptuellement le plus simple (figure 2). Le principe consiste à observer le mouvement de cellules ou de sphères couplées à des récepteurs le long d'une surface couverte de ligand en présence d'un écoulement laminaire qui peut être très lent. Lorsque les cellules ou les particules sont entraînées par une force de quelques piconewtons, une seule liaison ligand-récepteur peut suffire à entraîner un arrêt dont la durée sera d'autant plus courte (en général) que la force sera plus faible. Le comptage des arrêts donnera des informations relativement directes

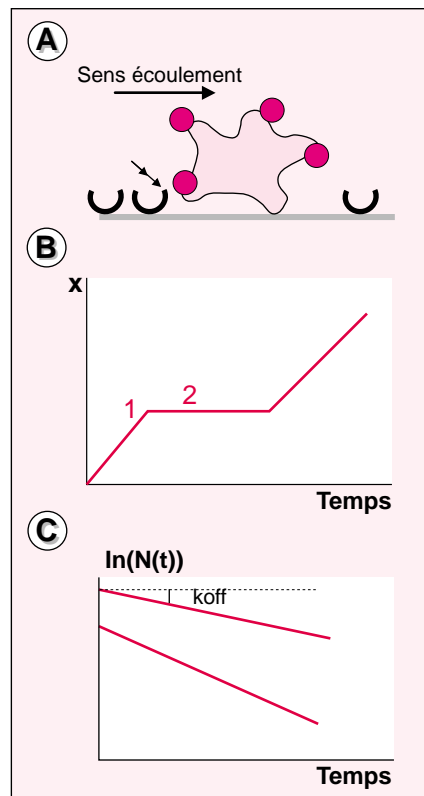


Figure 2. **Étude de la rupture de liaisons moléculaires individuelles.** **A.** Des cellules (ou des particules modèles) recouvertes de récepteurs (points rouges) sont soumises à un écoulement hydrodynamique faible (flèche) au voisinage d'une surface couverte de ligand (cupules noires). Une liaison est soumise à une force de l'ordre de quelques piconewtons (double flèche). **B.** Les trajectoires des particules comportent des étapes de déplacement à vitesse relativement constante (1) séparées par des arrêts (2). **C.** La distribution des durées des arrêts est représentée sous la forme d'une courbe de détachement dont la pente représente la cinétique de dissociation des liaisons. La résistance mécanique des liaisons est étudiée en faisant varier la force hydrodynamique et en déterminant la relation entre cette force et la constante de dissociation (k_{off}).

sur la cinétique d'association. La mesure des durées des arrêts permettra de mesurer la cinétique de dissociation.

De nombreux auteurs ont utilisé des écoulements hydrodynamiques pour mesurer les propriétés de plusieurs couples ligand/récepteur. La constante de dissociation satisfait fréquemment à une équation du type [16]:

$$k_{off}(F) = k_{off}^{\circ} \exp(F/F^{\circ})$$

La valeur expérimentale du paramètre k_{off}° présente d'importantes variations: nous avons mesuré des valeurs de l'ordre de 0,01 seconde⁻¹ (système intégrine/collagène activé [17]) et 8 s⁻¹ environ [1]. Le coefficient F° varie de quelques dizaines de piconewtons à plus de 200 piconewtons [18]. Il est intéressant de noter que l'exposition de récepteurs des intégrines à des anticorps connus pour activer ou inactiver leur fonction a permis de faire varier la cinétique de dissociation dans un rapport de 1 à 80.

Modulation fonctionnelle d'un récepteur liée à sa situation dans la membrane cellulaire

On sait depuis longtemps que l'activité de récepteurs tels que les intégrines peut être modulée de manière indépendante du site de fixation (événements post-récepteur [19]). De multiples mécanismes sont susceptibles d'être mis en jeu. Nous en donnons quelques exemples.

Concentration sur les microvilli

Les surfaces cellulaires sont habituellement irrégulières, hérissées de multiples protrusions (pseudopodes, lamellipodes, filopodes, microvilli...). Il était logique de penser que leur concentration sur les microvilli plutôt que dans les régions « concaves » accroîtrait l'efficacité fonctionnelle des molécules. Cette conception simple a été confirmée par von Andrian *et al.* [20] qui ont utilisé des molécules chimériques comportant les domaines extracellulaires de la L-sélectine et les parties transmembranaires et intracytoplasmiques d'une autre molécule pour démontrer que, d'une part, ces dernières régions sont responsables de la concentration de la L-sélectine sur les sommets des microvilli, et d'autre part cette localisation est nécessaire à la fonc-

tion adhésive. Cette localisation pourrait constituer un mode de contrôle, puisque l'activation de cellules phagocytaires peut entraîner une concentration de certains intégrines vers les protrusions [21].

Microagrégation

Des expériences de marquage à l'or colloïdal avaient démontré que l'activation d'un récepteur du complément (l'intégrine CD11bCD18, CD18 étant la chaîne $\beta 2$ des intégrines) sur les macrophages était corrélée à une microagrégation de ces molécules en amas de quelques récepteurs [22]. Réciproquement, l'importance fonctionnelle d'une dimérisation de récepteurs tels que ICAM-1 [23] ou la C-cadhérine [24] a été démontrée de manière particulièrement directe : ainsi, des cellules exprimant des molécules de cadhérine chimériques (présence dans la région intracytoplasmique de modules capables de fixer la petite molécule FK506) ont vu leur adhésivité augmenter en présence d'un dimère de FK506, capable de traverser la membrane plasmique et de provoquer une dimérisation des molécules de cadhérine [24].

Modulation de la mobilité latérale

La formation d'une adhérence stable s'accompagne en règle générale d'une concentration des récepteurs dans les régions de contact intercellulaire. Cette redistribution peut résulter d'une diffusion passive ou de déplacements actifs impliquant des éléments du cytosquelette. Elle constitue souvent un élément nécessaire à la formation d'une adhérence stable [25]. Cependant, le cytosquelette peut contrôler l'adhérence à de multiples niveaux : il peut également limiter la mobilité latérale des récepteurs, mais aussi augmenter la solidité de leur ancrage dans la membrane ainsi que la résistance mécanique de la surface cellulaire. Il est donc concevable qu'une modulation de l'interaction des récepteurs cellulaires avec le cytosquelette puisse modifier leur capacité adhésive. Ce concept a été vérifié expérimentalement. L'activation fonctionnelle de l'intégrine lymphocytaire LFA-1 induite par un ester de phorbol ou un inhibiteur de la polymé-

sation de l'actine (cytochalasine B) a pu être attribuée à une augmentation de la mobilité latérale des intégrines plutôt qu'à une augmentation d'affinité du récepteur [26]. Cependant, le rôle du cytosquelette n'est pas univoque puisque la cytochalasine B a pu augmenter ou diminuer l'activité de LFA-1 suivant que les cellules traitées se trouvaient au repos ou déjà activées [27].

L'efficacité fonctionnelle ou « avidité » des récepteurs cellulaires est dépendante de multiples mécanismes dont la réalité est maintenant bien démontrée et qui ont pu être soumis à une étude quantitative. Il apparaît donc clairement que l'expression normale des récepteurs membranaires sur une population cellulaire pathologique ne permet pas d'écarter la possibilité qu'un déficit fonctionnel de ces molécules soit responsable des anomalies constatées. Étant donné que les interactions adhésives influencent de multiples aspects du comportement cellulaires, il apparaît donc justifié de développer la pratique des tests fonctionnels de l'adhérence dans le cadre des explorations hospitalières spécialisées ■

Anne Pierres
Anne-Marie Benoliel
Pierre Bongrand

Laboratoire d'Immunologie, Inserm U. 387, Hôpital de Sainte-Marguerite, BP 29, 13274 Marseille Cedex 09, France.

RÉFÉRENCES

1. Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P, van der Merwe PA. Determination of the lifetime and force dependence of interactions of single bonds between surface-attached CD2 and CD48 adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15114-8.
2. Bongrand P, Capo C, Benoliel AM, Depieds R. Evaluation of intercellular adhesion with a very simple technique. *J Imm Meth* 1979; 28: 133-41.
3. Mège JL, Capo C, Benoliel AM, Bongrand P. Determination of binding strength

and kinetics of binding initiation. *Cell Biophys* 1986; 8: 141-60.

4. Ardman B, Sikorski MA, Staunton DE. CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5001-5.

5. Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B, VonAndrian UH. Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* 1998; 8: 373-81.

6. Patel KD, Nollert MU, McEver RP. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J Cell Biol* 1995; 131: 1893-902.

7. Sabri S, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Influence of surface charges on cell adhesion : difference between static and dynamic conditions. *Biochem Cell Biol* 1995; 73: 411-20.

8. Soler M, Merant C, Servant C, et al. Leukosialin (CD43) behavior during adhesion of human monocytic THP-1 cells to red blood cells. *J Leuk Biol* 1997; 61: 609-18.

9. Rieu P, Porteu F, Bessou G, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43) during cell activation. *Eur J Immunol* 1992; 22: 3021-6.

10. Afroun S, Tenu JP, Lemaire G. Modifications of glycosylation patterns in macrophage upon activation. *Biochim Biophys Acta* 1988; 971: 137-47.

11. Sabri S, Soler M, Foa C, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Glycocalyx modulation is a means of regulating cell adhesion under dynamic conditions. *J Cell Sci* 2000; 113: 1589-600.

12. Harlan JM, Liu DY. Adhesion - Its role in inflammatory diseases. W. H. Freeman & Co, New York 1992.

13. Loftus JC, Liddington RC. New Insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest* 1997; 99: 2302-6.

14. Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Studying receptor-mediated cell adhesion at the single molecule level. *Cell Adhes Comm* 1998; 5: 375-95.

15. Bongrand P. Ligand-receptor interactions. *Rep Prog Phys* 1999; 62: 921-68.

16. Bell GI. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 1978; 200: 618-27.

17. Masson-Gadais B, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P, Lissitzky JC. Integrin α and β subunit contribution to the kinetic properties of $\alpha 2 \beta 1$ collagen receptors on human keratinocytes analyzed under hydrodynamic conditions. *J Cell Sci* 1999; 112: 2335-45.

18. Alon R, Chen S, Puri KD, Finger EB, Springer TA. The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. *J Cell Biol* 1997; 138: 1169-80.

19. Danilov YN, Juliano RL. Phorbol ester modulation of integrin-mediated cell adhesion : a post receptor event. *J Cell Biol* 1989; 108: 1925-33.

RÉFÉRENCES

20. Von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillus receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995; 82: 989-99.
21. Erlandsen SL, Hasslen SR, Nelson RD (1993) Detection and spatial distribution of the MB integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 327-33.
22. Detmers PA, Wright SD, Olsen E, Kimball B, Cohn ZA. Aggregation of complement receptors of human neutrophils in the absence of ligand. *J Cell Biol* 1987; 105: 1137-45.
23. Miller J, Knorr R, Ferrone M, Houdei R, Carron CP, Dustin ML. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med* 1995; 182: 1231-41.
24. Yap AS, Briehner WM, Pruschy M, Gumbiner BM. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* 1997; 7: 308-15.
25. Chan PY, Lawrence MB, Dustin ML, Ferguson LM, Golan DE, Springer TA. Influence of receptor lateral mobility on adhesion strengthening between membranes containing LFA-3 and CD2. *J Cell Biol* 1991; 115: 245-53.
26. Kucik DF, Dustin ML, Miller J, Brown E. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest* 1996; 97: 2139-44.
27. Lub M, van Kooyk Y, van Vliet SJ, Figdor CG. Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function associated molecule 1. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 341-51.

TIRÉS À PART

P. Bongrand.