

Topographie de la liaison intégrine-ligand

Bénédicte Masson-Gadais, Jacques Huot, Jean-Claude Lissitzky

Les récepteurs de type intégrine sont des molécules transmembranaires hétérodimériques impliquées dans l'adhérence. Ces récepteurs sont recrutés et activés dans les zones d'adhérence au point d'interaction entre deux cellules ou entre une cellule et une protéine de la matrice extracellulaire. L'adhérence se produit après que le récepteur lié à son ligand dans la matrice extracellulaire ou sur la cellule avoisinante se soit, par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique, connecté au cytosquelette. La réversibilité du processus, qui aboutit au détachement, permet le mouvement cellulaire. De nombreuses molécules intervenant dans la transmission du signal sont aussi recrutées et activées dans les zones d'adhérence. Les messages qu'elles produisent collaborent avec ceux induits en réponse à des facteurs de croissance pour contrôler la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose (*m/s* 2001, n°1, p. 111). La double fonction des récepteurs intégrines dans la localisation des cellules, et dans l'induction d'un signal explique leur participation à la plupart des phénomènes biologiques et aux pathologies qui leur sont associées, comme le cancer. Il en résulte un grand intérêt à comprendre leur fonctionnement.

Les récepteurs intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires de type I formées par l'association non covalente d'une chaîne α de 120 à 180 kDa avec une chaîne β dont le poids moléculaire varie de 90 à

110 kDa. Dix-huit chaînes α et huit chaînes β différentes permettent de former vingt-trois récepteurs intégrines différents qui présentent chacun une spécificité de liaison [1, 2]. Les cellules de l'organisme expriment un répertoire défini de ces récepteurs dont la composition est contrôlée au cours du développement ou par l'activation cellulaire.

Globalement, les sous-unités sont formées par un ectodomaine qui comprend la plus grande partie de la molécule puisque les régions cytoplasmiques sont courtes (en général, quelques dizaines d'acides aminés au maximum). La partie amino-terminale de l'ectodomaine globulaire, site d'interaction avec les ligands, est suivie par une région plus linéaire qui contient dans la chaîne β des séquences riches en cystéine [3]. Dans les courtes régions cytoplasmiques, on peut distinguer les régions juxtamembranaires, conservées dans les chaînes α (GFFKR) ou homologues dans les chaînes β , qui sont suivies par des extensions divergentes. Les régions juxtamembranaires des chaînes α et β interagissent par l'intermédiaire d'un pont salin qui semble important dans le contrôle de l'activité du récepteur [4]. Les régions cytoplasmiques interagissent avec des protéines cytosoliques qui permettent la connexion au cytosquelette (β), assurent la transmission du signal ou interviennent dans la régulation de la fonction du récepteur (α ou β). Il est à noter que la séquence de la région divergente de certaines sous-unités, dont $\alpha 3$, $\alpha 6$ ou $\beta 1$, peut différer à cause d'un épissage différentiel des ARN messagers [5, 6]. Dans cette situation, une

réponse cellulaire différente pourra être obtenue pour un même ligand.

Les récepteurs intégrines sont caractérisés par une grande malléabilité conformationnelle qui peut être repérée par une variation de leur sensibilité à la protéolyse, par l'atténuation ou l'émergence d'épitopes pour certains anticorps monoclonaux [7]. Ces changements de conformation sont impliqués dans la transmission du message à l'intérieur de la cellule lors de la liaison au ligand (*outside-in*) ou à l'inverse dans le contrôle, par les voies de signalisation intracellulaires, de l'affinité du récepteur (*inside-out*) [8]. Cette régulation allostérique de l'affinité, tout à fait caractéristique de la fonction des intégrines, est notamment impliquée de manière physiologique dans la stimulation de l'adhérence leucocytaire par les stimulus pro-inflammatoires. Dans ce cas, l'interaction des régions cytoplasmiques du récepteur avec le cytosquelette ou des protéines cytosoliques régulatrices conduit à un changement de conformation activateur qui se propage jusqu'aux extrémités amino-terminales, siège de l'interaction avec le ligand.

L'interaction entre l'intégrine et son ligand

La liaison intégrine/ligand est le résultat de la formation d'un complexe quaternaire entre le ligand et les extrémités amino-terminales des sous-unités α et β et des ions métalliques. A l'évidence, la sous-unité α est impliquée dans la spécificité de reconnaissance puisque les sous-unités α_{1-10} associées à $\beta 1$ montrent une

spécificité d'interaction différente. La participation de la sous-unité β à la liaison du ligand est aussi suspectée puisque les intégrines formées par la sous-unité α et différentes chaînes β ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$) ont des spécificités de liaison notablement différentes.

Site de liaison dans la sous-unité α (figure 1)

L'hélice

Les sous-unités α IIb, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ et αV possèdent, dans la région amino-terminale, sept séquences répétées de 60 à 70 acides aminés de type FG-GAP [9]. Cet agencement retrouvé dans d'autres protéines (phosphatidylinositol phospholipase D, sous-unité β des protéines G hétérotrimériques, striatine), semble conduire à la formation d'une structure en forme d'hélice (*propeller* β). En ce qui concerne les sous-unités α , le modèle, maintenant vérifié expérimentalement, place la région d'interaction avec le ligand à la surface supérieure de l'hélice [10]. La face inférieure présente, par ailleurs, des motifs de liaison du calcium qui peuvent intervenir dans la régulation de la conformation de la structure [11].

Le domaine I

Les sous-unités α M, α D, α E, α L, α X, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ possèdent entre la seconde et la troisième séquence FG-GAP, un domaine I qui devient une structure mobile insérée par une charnière sur la face supérieure de l'hélice [2, 12]. La plupart des anticorps qui bloquent la fonction de ces chaînes α sont dirigés contre le domaine I. En simplifiant, cette structure contient un sillon qui accommode le ligand et le lie par l'intermédiaire d'un ion métallique. Ces sites d'adhérence dépendants des ions métalliques (motif MIDAS) sont formés par des acides aminés oxygénés (sérine, thréonine, acides glutamique ou aspartique) provenant du récepteur. Ils sont placés spatialement de sorte qu'ils peuvent stabiliser 5 liaisons de coordination d'un ion Mg^{2+} . La sixième position disponible est liée par un résidu acide du ligand [9]. La spécificité de la liaison

dépend de la forme de la poche modulable allostériquement qui entoure le site [13].

Site de liaison dans la sous-unité β (figure 2)

L'extrémité amino-terminale de la sous-unité présente une région très conservée contenant des acides aminés oxygénés dont la mutation est inactivante (portés dans $\beta 1$ par les segments 130-132 et 224-295) [14, 15]. Dans la molécule native, ces segments sont adjacents et constituent un site MIDAS. La deuxième partie de la région très conservée est une boucle reconnue par les anticorps activateurs et inhibiteurs de fonction (aa 207-218 dans $\beta 1$) localisée sur la face inférieure de la structure MIDAS. Cette région régulatrice est contigüe à une boucle dont la composition en acides aminés diverge considérablement d'une sous-unité β à l'autre et qui participerait à la spécificité de reconnaissance du ligand, en fonctionnant comme un pousoir qui pourrait conditionner l'interaction du ligand avec la structure de type MIDAS [16].

Contribution des chaînes α et β à la formation et à la dissociation de la liaison intégrine/ligand

La liaison intégrine-ligand est multivalente puisqu'interviennent des interactions avec la chaîne α et la chaîne β suggérant que le ligand doit aussi contenir plusieurs sites de reconnaissance par le récepteur. Ainsi, la fibronectine où ces sites ont été identifiés interagit avec la sous-unité $\beta 1$ par la séquence RGD contenue dans la dixième séquence répétée de type III et avec la sous-unité $\alpha 5$ par la séquence de synergie contenue dans la neuvième séquence répétée de type III [17]. La distance entre les deux sites est d'une dizaine d'angströms, ce qui permet de réaliser que la poche de liaison des intégrines est en fait compacte même si elle implique les deux sous-unités. Dans ces conditions, on peut imaginer que des changements de conformation de faible amplitude puissent significativement modifier la configuration de la poche de liaison et résulter dans une modulation de l'affinité de la liaison au ligand.

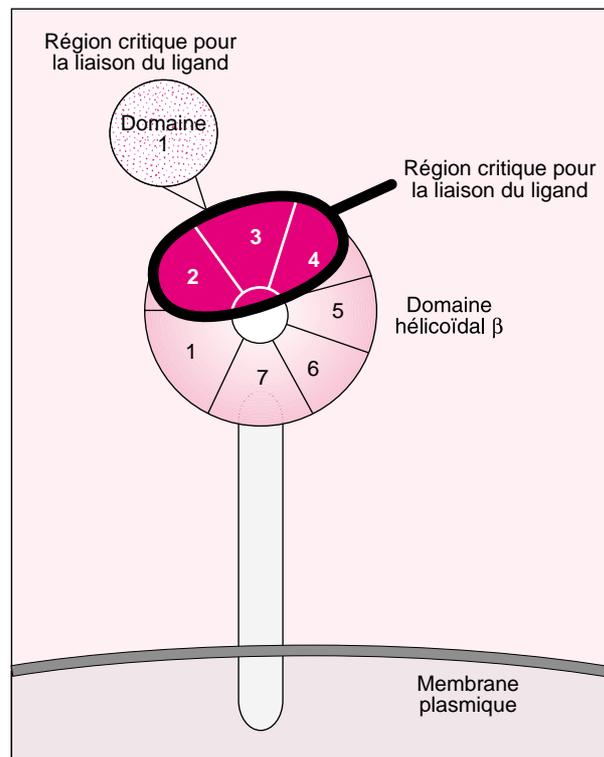


Figure 1. **Structure de la sous-unité α .** La sous-unité α des intégrines possède une courte portion cytoplasmique, une portion transmembranaire et une portion extracytoplasmique à plusieurs domaines. Parmi ces domaines, on trouve un domaine en feuillet β , le propeller β , qui porte une région critique pour la liaison du ligand. Certaines sous-unités α possèdent un domaine supplémentaire, le domaine I, inséré par une charnière au propeller β . Lorsqu'il est présent dans le récepteur, le domaine I joue un rôle important dans l'interaction avec le ligand, et est la cible des anticorps anti-intégrine bloquant la fonction.

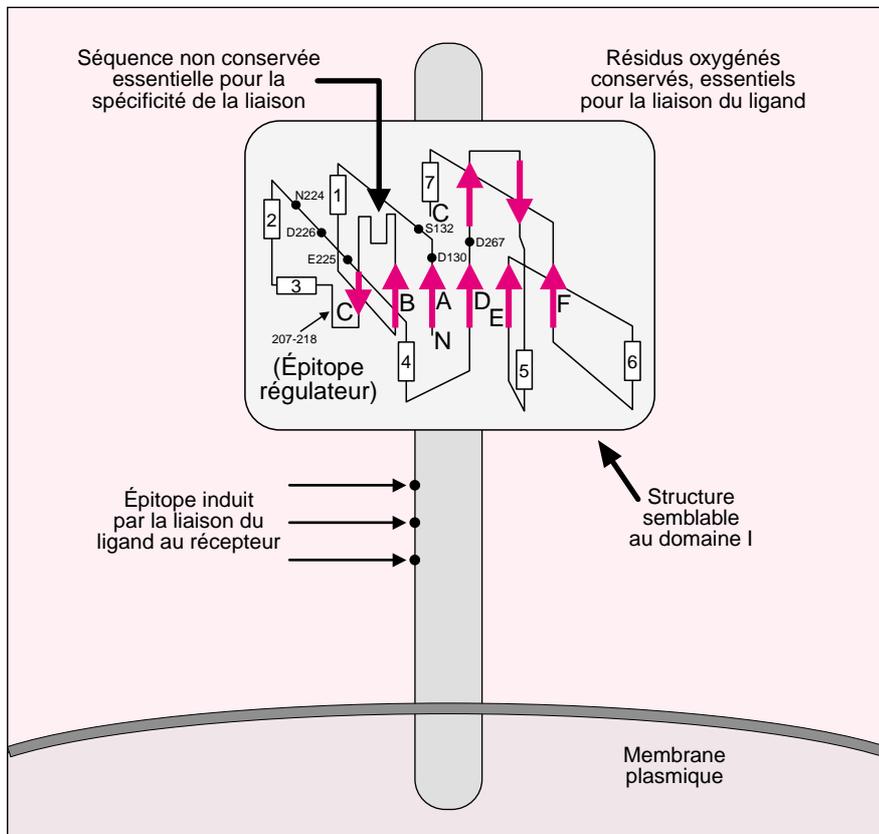


Figure 2. **Structure de la sous-unité β et structure hypothétique du domaine semblable au domaine I.** La portion extracytoplasmique présente une structure semblable au domaine I de la sous-unité α . Ce domaine contient les sites d'interaction avec le ligand.

On peut, en simplifiant, considérer que l'affinité est proportionnelle au taux de formation des liaisons et inversement proportionnelle à leur dissociation. Dans le cas des récepteurs intégrines, la contribution respective des sous-unités α et β à ces paramètres n'est pas connue. La question a pu être abordée récemment en étudiant la caractéristique des arrêts transitoires que l'on peut observer lorsque des kératinocytes sont mus en conditions hydrodynamiques sur une surface recouverte de collagène. En effet, l'arrêt signifie qu'une liaison s'est formée et la durée de l'arrêt est inversement proportionnelle à la vitesse de dissociation de la liaison. En multipliant les observations, il est possible d'obtenir une information quantitative sur le taux de formation des liaisons (K_{on}) et sur celui de leur dissociation (K_{off}) après analyse, respectivement, de la fréquence des arrêts et de leurs

durées [18] (*m/s 2000, n° 8-9, p. 974-8*). Cette étude a montré que la stabilité des liaisons formées, mais pas leur formation, est fortement dépendante de la conformation de la chaîne β puisque le K_{off} en présence d'anticorps anti- β 1 bloquant la fonction de l'intégrine est 25 fois plus grand qu'en présence d'anticorps activateurs (*Tableau I*). Le blocage de la fonction de la chaîne α 2 se traduit par une altération de la formation des liaisons (diminution majeure du K_{on}) mais aussi par une augmentation importante de la dissociation des liaisons quand elles ont réussi à se former (*Tableau I*). Ces résultats indiquent que les sous-unités α interviennent dans la reconnaissance du ligand. L'importance des altérations du K_{off} dans ces conditions suggère cependant que les interactions entre le ligand et la sous-unité α sont vraisemblablement prérequis pour que le ligand puisse

s'associer à la chaîne β 1. En effet, les propriétés intrinsèques de l'interaction ligand/sous-unité β 1 auraient dû être mesurées si l'association à la sous-unité β avait été directe et indépendante de l'interaction avec α . L'étude des paramètres cinétiques de l'adhérence des kératinocytes sur la laminine-5, qui dépend des intégrines α 3 β 1 dont la chaîne α est dépourvue de domaine I, découvre une situation analogue à celle des intégrines α 2 β 1 puisque, dans ce cas aussi, l'interaction du ligand avec la chaîne β dépend d'une reconnaissance préalable par la chaîne α [19]. Cette interprétation est somme toute cohérente avec l'observation que l'adhérence au collagène impliquant les intégrines α 2 β 1 est inhibée lorsque les sites potentiels de liaison aux chaînes α 2 contenus dans le collagène sont masqués avec du domaine I recombinant, mais aussi dans un autre modèle, par le fait que l'affinité de la liaison fibronectine/intégrines α 5 β 1 est considérablement diminuée par des mutations inactivantes de la région de synergie. Les études à venir doivent permettre de savoir si cette conception peut être généralisée à tous les récepteurs intégrine et si elle peut être validée par analyse des paramètres de liaison pratiquée avec des intégrines ou leurs ligands portant des mutations inactivantes dans leur région d'interaction.

Conclusions et perspectives

L'ensemble des données qui viennent d'être discutées permettent de dresser un modèle encore hypothétique de l'interaction intégrine-ligand (*figure 3*). Les sous-unités α et β semblent se lier à des régions différentes du ligand et la liaison apparaît hiérarchisée en un mécanisme à deux étapes impliquant d'abord une reconnaissance du ligand par la sous-unité α . Cette reconnaissance est qualitativement importante pour qu'ensuite la liaison avec la sous-unité β puisse se former et stabiliser le complexe en diminuant sa dissociation. Il est notoire que la fonction des intégrines peut être activée ou inactivée par régulation allostérique de la configuration de l'interface

Tableau I. Paramètres cinétiques de la liaison cellulaire au collagène (K_{on} et K_{off}) mesurés en condition hydrodynamique. Modulation par des anticorps contre les sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 1$.

	K_{on} (mm ⁻¹)	K_{off} (sec ⁻¹)	% adhérence
0	1,30	0,06	42
TS 2/16 anti- $\beta 1$ activateur	1,37	0,01	63,3
Lia 1/2 anti- $\beta 1$ bloquant	1,15	0,22	21,3
K20 anti- $\beta 1$ neutre	1,06	0,05	39,8
Gi9 anti- $\alpha 2$ bloquant	0,25	0,8	0,92

Les cellules sont traitées par différents anticorps anti-intégrines avant d'être injectées dans une chambre de flux préalablement recouverte de collagène-1. Des anticorps dirigés contre la chaîne β , bloquant (Lia 1/2) ou activateur (TS 2/16) ou neutre (K20) ont été utilisés. L'anticorps Gi9 bloque la fonction de la sous-unité $\alpha 2$ après la liaison au domaine I. Les constantes cinétiques mesurées sont le taux de formation des liaisons (K_{on}) et le taux de dissociation des liaisons formées (K_{off}). Le K_{on} correspond au nombre moyen d'arrêts observés/mm et l'inverse du K_{off} correspond à la durée moyenne (en secondes) de la liaison.

récepteur-ligand et que, physiologiquement, cette régulation affecte la structure de la sous-unité β . On peut imaginer qu'elle aboutisse à rendre moins cryptique le site MIDAS qui y est contenu, et donc à renforcer la stabilisation de la liaison. C'est vraisemblablement aussi à ce niveau que

fonctionnent les dérivés des peptides RGD utilisés dans le but de bloquer l'adhérence en pathologie inflammatoire et thromboembolique. Néanmoins, l'importance spécifique et structurelle des interactions ligand-chaîne α dans la formation de la liaison qui semble émerger, conduit à se

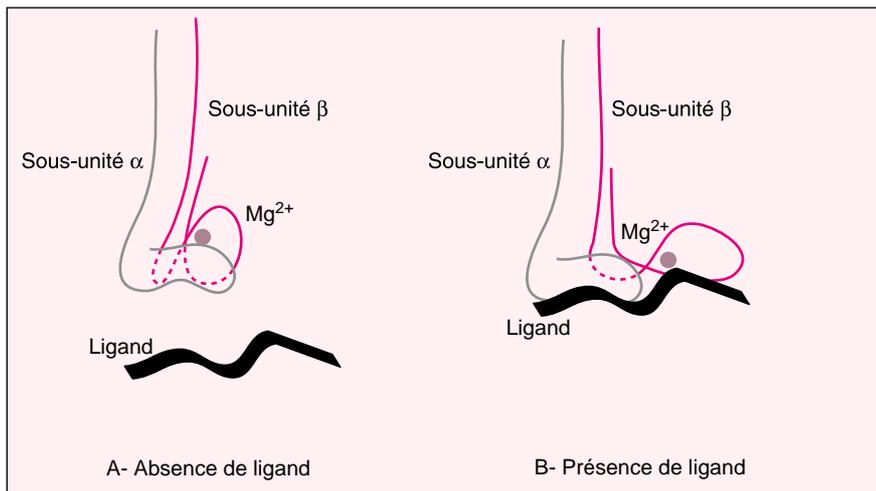


Figure 3. Modèle hypothétique de l'interaction intégrine/ligand. Les sous-unités α et β des intégrines sont impliquées dans l'interaction intégrine/ligand. Chacune d'entre elles porte un site de reconnaissance pour des régions distinctes du ligand. **A.** En l'absence de ligand : seul le site de la sous-unité α semble accessible. Celui de la sous-unité β est cryptique. **B.** En présence de ligand : l'interaction du ligand avec la sous-unité α induit un changement de conformation qui permet à l'interaction avec la sous-unité β de se réaliser. La liaison de la sous-unité β avec le ligand stabilise le complexe ainsi formé en diminuant sa dissociation.

m/s n°2, vol. 17, février 2001

demander si un changement de conformation des sous-unités α intervient aussi dans la régulation physiologique de la fonction des intégrines. En outre, l'importance de cette interaction dans la formation de la liaison devrait pouvoir justifier, si elle se vérifie, la conceptualisation d'antagonistes qui permettraient d'interférer plus spécifiquement avec la fonction des intégrines ■

Bénédicte Masson-Gadais
Jacques Huot

Centre de recherche en cancérologie de l'université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, 9, rue McMahon, Québec G1R 2J6, Canada.

Jean-Claude Lissitzky

Cnrs UPRESA 6032 Laboratoire de biochimie cellulaire, Faculté de pharmacie, 27, boulevard Jean-Moulin, 13005 Marseille, France.

RÉFÉRENCES

- Hynes R. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987 ; 48 : 549-54.
- Gille J, Swerlick R. Integrins: role in cell adhesion and communication. *Ann NY Acad Sci* 1996 ; 797 : 93-106.
- Loftus J, Halloran C, Ginsberg M, Feigen L, Zablocki J, Smith J. The amino-terminal one-third of $\alpha 1b$ defines the ligand recognition specificity of integrin $\alpha 1b\beta 3$. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 2033-9.
- Hughes P, Diaz-Gonzalez F, Leong L, et al. Breaking the integrin hinge. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 6571-4.
- Tamura R, Cooper H, Collo G, Quaranta V. Cell type-specific integrin variants with alternative α chain cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10183-7.
- Hogervorst F, Kuikman I, van Kessel A, Sonnenberg A. Molecular cloning of the human $\alpha 6$ integrin subunit. Alternative splicing of $\alpha 6$ mRNA and chromosomal localization of the $\alpha 6$ and $\beta 4$ genes. *Eur J Biochem* 1991 ; 199 : 425-33.
- Wang R, Shattil S, Ambruso DR, Newm P. Truncation of the cytoplasmic domain of $\beta 3$ in a variant form of Glanzmann thrombasthenia abrogates signaling through the integrin $\alpha (IIb)\beta 3$ complex. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 2393-403.

RÉFÉRENCES

8. Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M, Payrastré B. L'intégrine α IIb/ β 3 dans les plaquettes sanguines: illustration du rôle des intégrines dans la transduction des signaux. *Med Sci* 2001; 17: 153-9.

9. Springer T. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α -subunits into a β -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 65-72.

10. Irie A, Kamata T, Takada Y. Multiple loop structures critical for ligand binding of the integrin α 4 subunit in the upper face of the β -propeller mode 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7198-203.

11. Oxvig C, Springer T. Experimental support for a β -propeller domain in integrin α -subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4870-5.

12. Camper L, Hellman U, Lundgren-Akerlund E. Isolation, cloning and sequence analysis of the integrin subunit α 10, a β 1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 20383-9.

13. Zhang L, Plow E. A discrete site modulates activation of I domains. Application to integrin α M β 2. *J Biol Chem* 1996; 271: 29953-7.

14. Puzon-McLaughlin W, Takada Y. Critical residus for ligand binding in an I domain-like structure of the integrin β 1 subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 20438-43.

15. Takada Y, Ylanne J, Mandelman D, Puzon W, Ginsberg M. A point mutation of integrin β 1 subunit blocks binding of α 5 β 1 to fibronectin and invasin but not recruitment to adhesion plaques. *J Cell Biol* 1992; 119: 913-21.

Summary

Topography of integrin/ligand interaction

Integrins are a family of heterodimeric transmembrane receptors constituted of 24 different pairs of α and β subunits. They are recruited and activated in focal adhesions during cell-cell interaction or following cell adhesion to extracellular matrix. Integrins are actively involved in a bidirectional outside-in and inside-out signalling that underly cellular functions such as cell migration. Both α and β subunits are implicated in the binding of integrins to their extracellular matrix ligands or counter-receptor on adjacent cells. The association (*K_{on}*) and dissociation (*K_{off}*) rates of integrins with/from their ligands, which defined affinity, is tightly

regulated. However, the specific contribution of α and β subunits of integrins in the association-dissociation with/from the ligand is unknown. We used a flux chamber to investigate the association/dissociation constants that characterize the interactions of α 2 β 1 integrins of keratinocytes adhering on type-1 collagen. We propose an hypothetical two-step model in which the α and β subunits interact sequentially with two different regions of the ligand. The ligand first interacts with the α subunit which allosterically facilitates the binding of the ligand with the β subunit. This stabilizes the ligand/integrin complex and reduces its dissociation rate.

16. Takada Y, Kamata T, Irie A, Puzon-McLaughlin W, Zhang X. Structural basis of integrin-mediated signal transduction. *Matrix Biol* 1997; 16: 143-51.

17. Mould A, Askari J, Aota S, *et al*. Defining the topology of integrin α 5 β 1-fibronectin interactions using inhibitory anti- α 5 and anti- β 1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the α 5 subunit. *J Biol Chem* 1997; 272: 17283-92.

18. Kaplanski G, Farnarier C, Tissot O, *et al*. Granulocyte-endothelium initial adhesion:

analysis of transient binding events mediated by E-selectin. *Biophys J* 1993; 64: 1922-33.

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

TIRÉS À PART

B. Masson-Gadais.