

La N-CAM, protéine d'adhésion cellulaire du système neuro-musculaire

Les molécules appelées CAM (*cell adhesion molecules*) servent de ligands dans l'adhésion des cellules entre elles. Leur connaissance est complémentaire de celle des molécules qui interviennent dans l'adhésion cellules-substrats, telles qu'adhésines ou intégrines, auxquelles *médecine/sciences* a consacré plusieurs articles (*m/s* n° 6, vol. 3). Il en existe un certain nombre de types génétiquement différents; deux d'entre eux paraissent fondamentaux en ce qu'ils apparaissent dès les premiers stades de l'embryon: la N-CAM, dérivée du neuroectoderme est surtout concentrée dans le tissu nerveux; la L-CAM, dérivée de l'ensemble des feuilletts primordiaux, est présente dans de nombreux tissus, bien que plus abondante dans le foie (d'où son nom). Après différenciation des tissus, de multiples CAM secondaires se développent, dont l'inventaire est en cours, et dont la seule bien étudiée à ce jour est la Ng-CAM neurogliale. Bien que le clonage de la L-CAM ait été réalisé récemment [1], nous envisagerons dans ce qui va suivre uniquement la N-CAM, de loin la mieux connue.

La N-CAM diffère des molécules du type adhésine par au moins deux caractères: sur le plan chimique, chaque molécule est constituée par un seul type de chaîne, et non par deux sous-unités différentes α et β ; sur le plan biologique, elle est homophile, c'est-à-dire que les liaisons intercellulaires se font entre des molécules de N-CAM identiques; en langage actuel, on pourrait dire que la N-CAM constitue son propre récepteur.

Structure et biologie de la N-CAM sont aujourd'hui assez bien connues; et les données récentes de la génétique moléculaire permettent désormais de jeter un pont entre elles.

Structure de la N-CAM [2-4]. La N-CAM est une glycoprotéine de taille supérieure à 100 000 Da (daltons); elle montre une remarquable hétérogénéité. Le modèle le mieux connu est celui de l'embryon de poulet, mais il paraît valable pour les mammifères et a été récemment étudié en détail chez la souris [5]. La N-CAM des tissus nerveux se présente à l'électrophorèse en milieu dissociant sous forme de trois bandes de

taille apparente 180, 140 et 120 kDa (kilodaltons). Leur structure est représentée sur la *figure 1*. La portion amino-terminale, extracellulaire, est la même. Elle contient cinq segments homologues, d'une centaine d'acides aminés, dont chacun comporte une liaison disulfure interne [6]; cette région, qui présente également une homologie avec certaines immunoglobulines, porte les zones de liaison homophiles; au-delà se trouve la zone riche en glucides. L'hétérogénéité porte sur deux caractères: (a) la longueur du polypeptide est variable: les formes longue et moyenne sont transmembranaires et possèdent donc un domaine

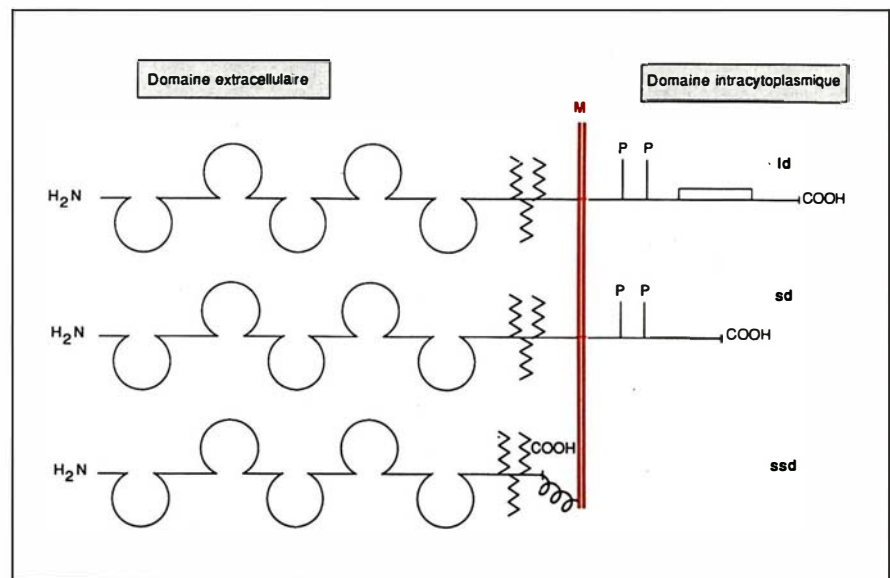


Figure 1. **Schéma des isoformes de la N-CAM du tissu nerveux.** ld: forme longue 180 kDa (*large cytoplasmic domain polypeptide*); sd: forme moyenne 140 kDa (*small cytoplasmic domain polypeptide*); ssd: forme courte 120 kDa (*small surface domain polypeptide*). Lignes en zigzag = zones d'attachement de l'acide polysialique; M = membrane; — P = sites phosphorylables. La ligne en spirale reliant la forme ssd à la membrane représente un pont phosphatidyl-inositol.

cytoplasmique qui peut être phosphorylé; la forme courte ne traverse pas la membrane et lui est rattachée par l'intermédiaire d'un phospholipide comme le phosphatidylinositol; (b) la partie glucidique comporte une teneur exceptionnellement élevée en acide sialique; on peut distinguer une forme riche où l'acide sialique atteint 30 % du poids total de la molécule et une forme pauvre — moins riche — qui en possède 10%. Dans l'ensemble la teneur élevée est caractéristique de l'embryon, la teneur basse de l'adulte, d'où les termes E et A proposés pour ces deux formes; comme cette règle souffre des exceptions certains auteurs préfèrent les termes H (*high*) et L (*low*). Dans l'ensemble, moins il y a d'acide sialique, plus l'adhésivité est grande.

Biologie de la N-CAM. La fonction de la N-CAM est de moduler l'adhésion des cellules entre elles, ce que permet sa forte concentration (certains neurones comptent 100 000 molécules). Des variations spatiales et temporelles peuvent régler le choix et le moment des interactions cellulaires. Un exemple en est fourni par l'étude du développement du tissu musculaire. Le muscle embryonnaire est riche en N-CAM [7]; l'association nerf-muscle se noue lorsque des quantités suffisantes sont accumulées. Quand la synaptogenèse est complète, de sorte qu'aucune modification de l'innervation ne se produise plus, l'expression de la N-CAM régresse et le muscle adulte en est dépourvu, en dehors des jonctions neuromusculaires. Lorsque le muscle dégénère, que ce soit par dénervation expérimentale [7] ou chez l'homme au cours de certaines atrophies spinales [8] comme la maladie de Werdnig-Hoffman, la concentration en N-CAM augmente fortement, pour régresser à nouveau en cas de régénération. In vitro, le tableau est un peu différent puisque, lors de la différenciation de lignées en

culture, l'augmentation de la N-CAM est un marqueur précoce de la fusion des myoblastes en myotubes [8]. On sait toutefois que, dans les conditions techniques actuelles, les cultures musculaires ressemblent davantage au muscle fœtal qu'au muscle adulte.

Des variations spatiales peuvent également être mises en évidence, intervenant dans le guidage des axones et leur ciblage. Au cours de l'ontogenèse du ganglion de la rétine [9], l'injection d'anticorps anti-N-CAM n'empêche pas la croissance des axones cellulaires mais leur fait manquer leur cible; on en déduit que la concentration en N-CAM régit, ou tout au moins influence, la destination finale de l'axone. Ces expériences peuvent être reproduites en culture, l'empilement des couches de la rétine étant empêché par les anticorps.

Enfin, des interactions existent entre les N-CAM et les adhésines. C'est ainsi que, dans le système des cellules de la crête neurale chez le poulet, qui sont destinées à devenir les ganglions spinaux [10], on peut distinguer trois étapes: avant la migration, les cellules, soudées par la N-CAM, adhèrent entre elles en dehors du tube neural; puis la N-CAM disparaît, les cellules deviennent mobiles et entrent en relation avec une matrice extracellulaire riche en fibronectine. Une fois arrivées, les cellules expriment à nouveau la N-CAM et forment un noyau compact qui se différencie en un ganglion.

Un dernier point concerne la phylogénie [4]. La présence de la molécule a été évaluée par immunologie et par la capacité des membranes des animaux à se lier à celles des embryons de poulet du fait de la conservation de la molécule. La N-CAM se retrouve chez tous les vertébrés, ce qui fait remonter sa présence à au moins 600 millions d'années. Chez les invertébrés la moisson est beaucoup moins riche. On constate essentiellement une expression

transitoire à certains stades de l'embryogenèse chez des insectes et des nématodes. L'utilisation de cette molécule a donc pris une extension considérable en passant des invertébrés aux vertébrés.

Génétique moléculaire. Malgré leur diversité, les protéines N-CAM sont toutes codées par un seul gène, localisé par hybridation in situ sur le chromosome 9 chez la souris, et chez l'homme sur le bras long du chromosome 11 [11]. L'analyse de clones d'ADN de poulet et de souris a permis d'interpréter les trois types principaux [5, 10]. Les différences proviennent d'un mécanisme désormais classique, l'épissage alternatif de l'ARN messenger (*figure 2*). Le gène contient au moins 19 exons: les 14 premiers sont communs aux trois formes. L'exon 15 est employé pour la forme courte; il porte le site de polyadénylation légèrement atypique AATACA; les deux autres formes « sautent » l'exon 15; la forme longue utilise tous les exons 16 à 19, tandis que la forme moyenne élimine l'exon 18. Un signal de polyadénylation AATAAA est présent dans l'exon 19. Le mécanisme d'épissage des messagers que l'on retrouve habituellement, respectivement de 7,2; 6,7 et 4,0 kb (kilobases) [12] est donc élucidé. Est-il possible de relier le choix de l'ARN synthétisé à une situation physiologique donnée?

Dans le système nerveux, les données que l'on possède sont surtout tirées de l'analyse des chaînes présentes. C'est le polypeptide 140 kDa qui apparaît seul dans les premiers stades. La forme 180 accompagne la neurogenèse et n'est pas trouvée en dehors du système nerveux. La forme courte 120 kDa est absente au début et ne se développe chez le poulet qu'après l'éclosion. L'examen des messagers confirme ces données: l'ARN messenger 6,7 kb, qui code pour la forme moyenne, précède dans le cerveau celui de 7,2 kb qui code pour la forme longue.

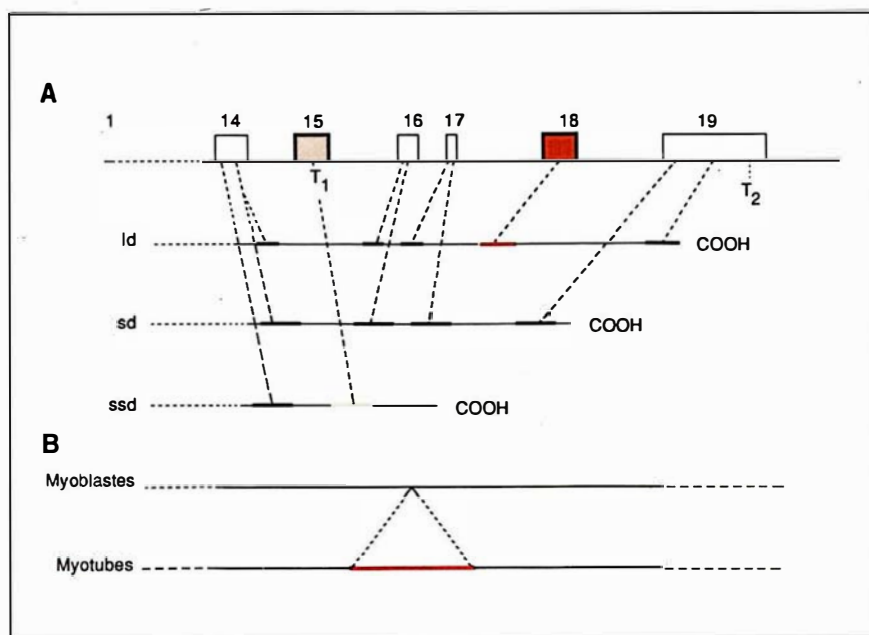


Figure 2. **A. Épissage alternatif des N-CAM du tissu nerveux.** La forme *ld* utilise les exons 14 et 16 à 19; la forme *sd* utilise les exons 14, 16, 17 et 19; la forme *ssd* utilise les exons 14 et 15. T1 = signal de polyadénylation AATACA de l'exon 15; T2 = signal de polyadénylation AATAAA de l'exon 19. En rouge: l'exon 18 utilisé seulement par la forme longue; en rose: l'exon 15 utilisé seulement par la forme courte. **B. Les ARN messagers des cellules musculaires.** En noir: zones d'homologie entre ARNm des myoblastes et des myotubes; en rouge: insertion de 108 bases dans l'ARNm des myotubes.

Une analyse fine a été réalisée sur le muscle, *in vivo* et *in vitro*. Dans le muscle fœtal de la souris [6], ou dans les cultures de cellules humaines au stade myoblastes [8], on trouve la protéine transmembranaire de 140 kDa, codée par un messageur de 6,7 kb. Lors du développement *in vivo*, et de la fusion des myotubes en culture, ce messageur est réprimé et fait place à des messageurs plus courts codant pour une protéine de 120 kDa. On ne trouve jamais dans le muscle la forme de 180 kDa. Les auteurs londoniens [8] ont en outre fait une découverte remarquable: dans le muscle, et là seulement, on constate un changement de la structure primaire portant sur la portion extracellulaire de la molécule, considérée jusqu'à présent comme identique

dans toutes les N-CAM: une insertion de 108 bases, supprimant un codon arginine et le remplaçant par une séquence nouvelle de 37 acides aminés, riche en proline, sérine et thréonine. Cette séquence, spécifique du muscle, résulte d'un nouvel épissage alternatif inconnu auparavant. Bien qu'il n'en existe pas encore de preuve, l'accumulation de ce messageur dans les myotubes seuls évoque un rôle particulier dans les interactions nerf-muscle.

Jean-Claude Dreyfus

Remerciements

Nous remercions le docteur Christo Goridis, du centre d'immunologie de Marseille-Luminy pour sa lecture critique du manuscrit et ses conseils.

RÉFÉRENCES

- 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.
- Edelman GL. Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Ann Rev Biochem* 1985; 54: 135-69.
- Cunningham BA. Cell adhesion molecules: a new perspective on molecular embryology. *Trends Biochem Sci* 1986; 11: 423-6.
- Rutishauser U, Goridis C. N-CAM: the molecule and its genetics. *Trends In Genet* 1986; 22: 72-6.
- Goridis C, Wille W. The three size classes of mouse N-CAM proteins arise from a single gene by a combination of alternative splicing and use of different polyadenylation sites. *Neurochemistry International* (sous presse).
- Barthels D, Santoni MJ, Wille W, et al. Isolation and nucleotide sequence of mouse N-CAM cDNA that codes for a Mr 79000 polypeptide without a membrane-spanning region. *EMBO J* 1987; 6: 907-14.
- Covault J, Merlie JP, Goridis C, Sanes JR. Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol* 1986; 102: 731-9.
- Dickson G, Gower HL, Barton CH, et al. Human muscle cell adhesion molecule (N-CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell* 1987; 50: 1119-30.
- Rutishauser U. Differential cell adhesion through spatial and temporal variations of N-CAM. *Trends Neurol Sci* 1986; 9: 374-8.
- Thierry JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM. Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 6737-41.
- Nguyen C, Mattei MG, Mattei MF, et al. Localization of the human N-CAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J Cell Biol* 1986; 102: 711-5.
- Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 294-8.