

## Peptides dérivés des chromogranines : de la phylogenèse aux tumeurs neuroendocrines

Youssef Anouar  
Valérie Turquier  
Maité Montéro  
Laurent Yon  
Hubert Vaudry

Les chromogranines ont été caractérisées chez les mammifères depuis plusieurs décennies et sont utilisées en routine comme marqueurs de tumeurs neuroendocrines. Les caractéristiques structurales de ces protéines ainsi que des données expérimentales suggèrent que les chromogranines peuvent servir de précurseurs de peptides biologiquement actifs. Récemment, le clonage des ADNc codant pour les chromogranines chez les amphibiens et les poissons a révélé l'existence de régions délimitées par des sites de clivage, dont la séquence a été très fortement conservée au cours de l'évolution. Ces régions donnent naissance *in vivo* à des peptides qui peuvent représenter les déterminants fonctionnels des chromogranines. Une caractéristique invariante des chromogranines chez toutes les espèces est leur expression spécifique dans les cellules neuroendocrines. Dans le cas de néoplasies neuroendocrines, la détection et la mesure des concentrations de peptides dérivés des chromogranines représentent de nouveaux outils pour le diagnostic et le pronostic.

### ADRESSE

Y. Anouar, V. Turquier, M. Montéro, L. Yon, H. Vaudry : Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides (IFRMP 23), Laboratoire de neuroendocrinologie cellulaire et moléculaire, Inserm U. 413, UA Cnrs, Université de Rouen, 76821, Mont-Saint-Aignan, France.

**L**es cellules neuroendocrines et les neurones possèdent un mécanisme de stockage et de concentration des hormones et des neurotransmetteurs, dans des vésicules appelées granules de sécrétion. La libération par exocytose du contenu de ces granules sous l'effet de différents stimulus permet aux cellules de répondre de façon appropriée aux nécessités de l'orga-

nisme. Les chromogranines ont été initialement caractérisées comme des protéines libérées avec l'adrénaline à partir de la médullosurrénale bovine. Il a été ensuite montré qu'elles sont sélectivement produites par plusieurs types de cellules endocrines, neuroendocrines et de neurones et qu'elles sont stockées dans les vésicules de sécrétion dites à cœur dense. La famille des granines est

constituée de plusieurs protéines, parmi lesquelles les plus connues sont la chromogranine A (CGA), la chromogranine B (CGB) et la sécrétogranine II (SgII). Bien que les chromogranines fassent l'objet d'intenses recherches depuis plus de trente-cinq ans, leur rôle physiologique n'est toujours pas encore clairement établi (*voir* l'article de D. Aunis et M.H. Metz-Boutigue, p. 418 de ce numéro).

La détermination de la structure primaire des chromogranines par clonage de leur ADNc, vers le milieu des années 1980, a révélé plusieurs caractéristiques communes à l'ensemble des protéines de cette famille. La séquence est très riche en résidus acides, qui peuvent représenter jusqu'à 30% de la composition globale en acides aminés. Cette observation a conduit à postuler que, dans les conditions du milieu intragranulaire qui présente un pH acide et une forte concentration en calcium, les chromogranines formeraient des agrégats englobant les hormones ou les neurotransmetteurs pour constituer le cœur des granules de sécrétion. L'élucidation de la structure primaire des chromogranines a également révélé l'existence de nombreuses paires d'acides aminés basiques, sites potentiels de clivage par les prohormones convertases (PC). Les chromogranines peuvent donc être scindées, tout comme les précurseurs d'hormones ou de neuropeptides, pour donner naissance à des peptides biologiquement actifs. Ces deux hypothèses constituent encore actuellement la base essentielle des recherches menées sur la fonction des chromogranines [1]. Il est maintenant clairement établi que les chromogranines font l'objet d'une maturation endoprotéolytique intracellulaire et qu'elles représentent effectivement des précurseurs de peptides.

Une autre question fondamentale concerne la sélectivité de l'expression des gènes des chromogranines dans les cellules neuroendocrines. En effet, plusieurs études ont été consacrées aux mécanismes moléculaires déterminant cette expression, qui concourent à démontrer le rôle essentiel d'un élément de type *cAMP response element* (CRE) dans la transcription des gènes des chromogra-

nines dans les cellules neuroendocrines. L'objet de cette revue est d'apporter un nouvel éclairage sur la fonction potentielle des chromogranines en tant que précurseurs de neuropeptides en s'appuyant sur les données relatives à l'évolution moléculaire de leurs gènes. La structure de ces gènes et leur expression spécifique dans les cellules neuroendocrines sera décrite dans la première partie, et la caractérisation des peptides dérivés des chromogranines dans les tissus neuroendocrines sains ou tumoraux sera abordée à la fin de cet article.

### **Structure des gènes des chromogranines et expression neuroendocrine**

La compréhension des mécanismes régissant l'expression cellule-spécifique des chromogranines a nécessité le clonage de leurs gènes chez plusieurs espèces. L'organisation et la séquence des gènes de la CGA et de la CGB présentent des similitudes dans les régions qui codent pour les domaines amino- et carboxy-terminaux (*figure 1*). En effet, même si le nombre d'exons dans ces deux gènes n'est pas identique, leurs deux premiers exons codent pour des régions amino-terminales présentant des similarités de séquence, notamment pour un pont disulfure. Le dernier exon des deux gènes code également pour des séquences similaires dans les deux protéines. Ces analogies de structure suggèrent que les gènes de la CGA et de la CGB pourraient avoir une origine ancestrale commune et résulteraient d'événements de duplication génique. L'organisation et la séquence du gène de la SgII est radicalement différente de celles des gènes de la CGA et de la CGB puisque la totalité de la protéine SgII est codée par un seul exon, l'exon 2, et qu'aucune homologie de séquence n'existe apparemment entre la SgII et les deux autres chromogranines.

Les gènes des chromogranines sont exprimés dans la majorité des cellules neuroendocrines [2]. Cependant, la concentration de chaque chromogranine diffère d'une cellule neuroendocrine à une autre. A titre d'exemple, au niveau hypophysaire, la SgII est particulièrement abon-

dante dans les cellules gonadotropes [3]. Le gène de la CGA est quant à lui fortement exprimé dans les cellules de la parathyroïde [4] et dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale [5], suggérant que des déterminants cellule- et gène-spécifiques jouent un rôle essentiel dans la spécification de l'expression des chromogranines. Une caractéristique structurale commune aux gènes des chromogranines est la présence d'un CRE, le plus souvent constitué d'une séquence canonique (TGACGTCA), au sein du promoteur proximal de chaque gène (*figure 1*). La présence de cet élément génique s'avère capitale pour l'expression neuroendocrine des gènes de la CGA [6] ou de la SgII [7] puisque sa mutation ou sa délétion abolit l'expression basale de ces gènes dans des cellules neuroendocrines. Toutefois, le CRE n'est probablement pas suffisant pour conférer la spécificité d'expression des gènes des chromogranines, étant donné le caractère ubiquiste des facteurs de transcription susceptibles de se lier au CRE qui appartiennent classiquement à la famille des facteurs de transcription CREB/CREM/ATF. Il est tout à fait possible que les protéines qui se fixent au CRE puissent interagir avec des co-activateurs tissu-spécifiques appartenant à d'autres familles de facteurs de transcription, pour permettre l'expression des gènes des chromogranines. Ces facteurs peuvent coopérer avec les protéines activées se liant au CRE pour augmenter l'activité de la machinerie de transcription basale. Le facteur de transcription CREM interagit par exemple de manière tissu-spécifique avec un facteur appelé ACT (*activator of CREM in testis*) afin d'activer la machinerie transcriptionnelle [8]. Ce co-activateur appartient à une large famille de facteurs de transcription dont les membres sont exprimés de façon tissu-spécifique. Ce type de protéines pourrait contribuer à l'expression neuroendocrine des chromogranines. Par ailleurs, les promoteurs des gènes des chromogranines portent des séquences consensus de reconnaissance d'autres facteurs de transcription, qui peuvent également agir en synergie avec les facteurs se fixant au CRE (*figure 1*). Ainsi, le promoteur du gène de la SgII humaine

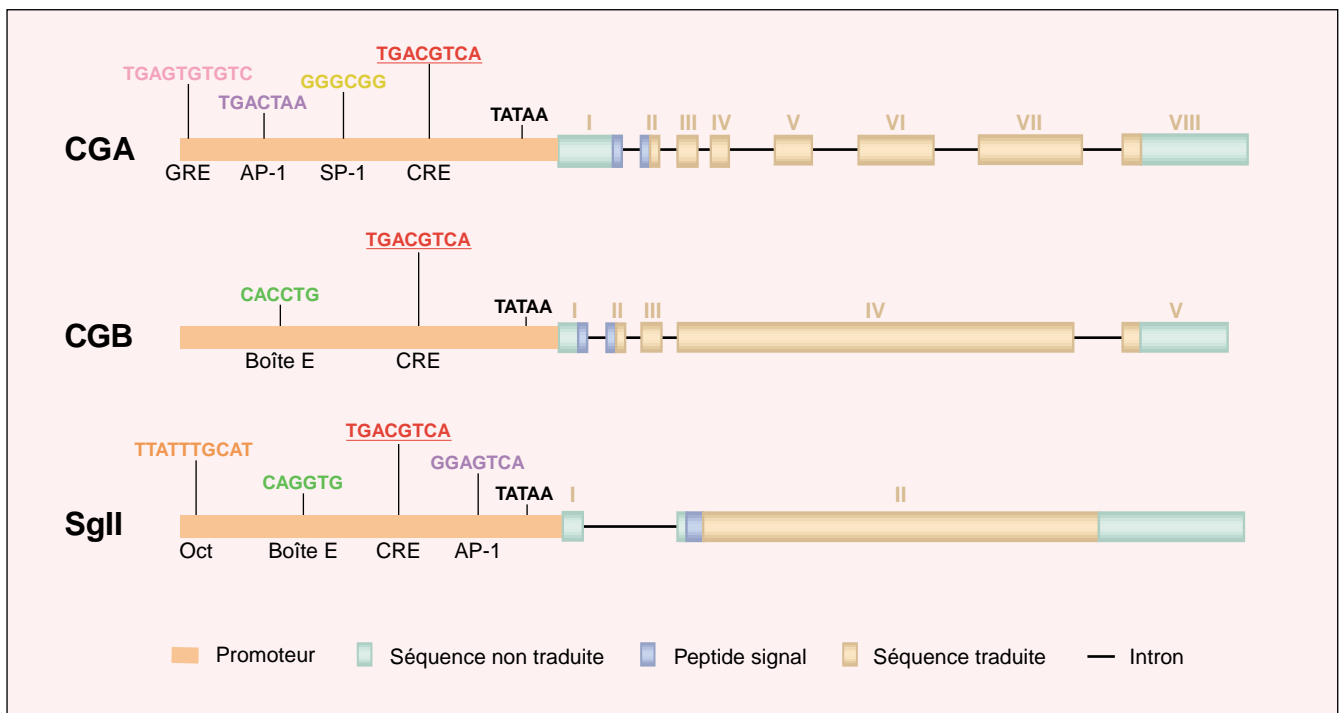


Figure 1. **Structure des gènes et des précurseurs des chromogranines chez les mammifères.** La CGA et la CGB sont codées par des gènes constitués de 8 et 5 exons (indiqués en chiffres romains) et présentent des similitudes dans les domaines codant pour les parties amino- et carboxy-terminales des précurseurs. Le gène de la SgII est différent des deux précédents et en particulier ne possède que deux exons. Les promoteurs des gènes des différentes granines renferment une séquence CRE essentielle pour l'expression dans les cellules neuroendocrines, en plus de nombreux sites de reconnaissance de facteurs de transcription variés : site de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), sites AP-1, site de liaison de protéines à homéodomaine POU (Oct), sites de reconnaissance de protéines hélice-boucle-hélice (boîte E), site SP-1 et boîte TATA. Ces différents éléments peuvent participer à l'expression cellule-spécifique des granines.

porte des éléments potentiels de reconnaissance des facteurs de transcription à homéodomaine POU ou des facteurs de transcription de la famille des protéines hélice-boucle-hélice. Ces facteurs de transcription contribuent à l'expression basale des gènes de certains neuropeptides comme le polypeptide vasoactif intestinal [9] et la gonadolibérine [10], ou des hormones telles que la prolactine, l'hormone de croissance ou la proopiomélanocortine [11]. Des éléments de type SP-1 ou AP-1 sont présents dans la séquence du promoteur de la CGA et semblent effectivement impliqués dans la transcription de ce gène dans certains types cellulaires (6). Les sites de liaison de différents facteurs de transcription de ces familles de protéines dans les promoteurs des chromogranines, en plus de sites reconnaissant des facteurs de transcription plus ubiquistes tels que le CRE, peuvent être à la base de l'expression diffuse et en même

temps cellule-spécifique des chromogranines.

### Évolution de la structure et de l'expression des gènes des chromogranines

Les recherches sur la fonction des chromogranines ont été menées principalement chez les mammifères. Ces études ont permis de déterminer la structure, les propriétés physico-chimiques et la distribution des chromogranines. Une forte conservation de toutes ces caractéristiques a été observée chez les espèces mammaliennes étudiées. Par ailleurs, les chromogranines ou des molécules apparentées semblent exister dans tout le règne animal puisque, chez les poissons [12], la drosophile, et même chez des organismes eucaryotes unicellulaires tels que la paramecie, une immunoréactivité de type CGA est observée [13]. La caracté-

sation moléculaire des chromogranines chez des espèces phylogénétiquement éloignées des mammifères pouvait donc apporter des informations pertinentes quant aux propriétés structurales et fonctionnelles de ces protéines. En effet, la pression évolutive a dû agir de telle sorte que les déterminants fonctionnels des chromogranines ont été préservés chez toutes les espèces comme cela a déjà été observé pour un grand nombre de protéines. Les amphibiens, qui sont les premiers vertébrés à s'être affranchis du milieu aquatique, constituent un groupe particulièrement intéressant pour étudier les aspects neurochimiques de l'évolution. La caractérisation des chromogranines chez des vertébrés non-mammaliens a été effectuée chez la grenouille verte européenne *Rana ridibunda*, une espèce modèle largement utilisée pour l'étude des neuropeptides et des régulations neuroendocrines. Plus récemment, la

structure de la SgII a été également élucidée chez le poisson rouge. Les comparaisons de séquence des chromogranines chez ces différentes espèces de vertébrés fournissent une mine d'informations sans précédent.

### Évolution de la structure des chromogranines et implications fonctionnelles

Le clonage des chromogranines chez la grenouille *R. ridibunda* a été effectué par amplification moléculaire de courtes séquences d'ADNc codant pour ces protéines, qui ont ensuite servi d'appâts pour isoler la totalité des ADNc et, ainsi, déterminer la structure primaire des protéines. La séquence de la SgII a été la première caractérisée de cette façon chez la grenouille [14]. Simultanément, un groupe hollandais qui étudiait l'expression différentielle de gènes exprimés dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire de l'hypophyse de xénope lors de l'adaptation des amphibiens à la couleur de l'environnement (réflexe d'homochromie) a identifié la SgII parmi les gènes surexprimés lors de l'adaptation à un fond sombre [15]. La SgII de grenouille, comme celle des mammifères, est riche en résidus acides et contient plusieurs sites potentiels de clivage par les PC. L'alignement des séquences de la SgII de grenouille et de la SgII humaine révèle une similarité globale en acides aminés de 46% seulement. Le plus fort degré d'identité entre la protéine humaine et ses homologues de grenouille et de xénope est observé dans une région localisée dans la partie N-terminale de la SgII, délimitée par des paires d'acides aminés basiques (figure 2A). Cette région contient un peptide de 33 acides aminés, qui a été initialement isolé à partir du cerveau de grenouille [16] puis identifié ultérieurement chez les mammifères, appelé sécrétoneurine (SN) en raison de sa localisation préférentielle dans le cerveau [17]. Il s'est avéré par la suite que ce peptide est capable de stimuler la libération de dopamine dans le striatum [18] et d'induire la migration des éosinophiles ou de monocytes dans des conditions d'inflammation dite neurogénique [19]. Le clonage de la SgII de poisson rouge a confirmé le très

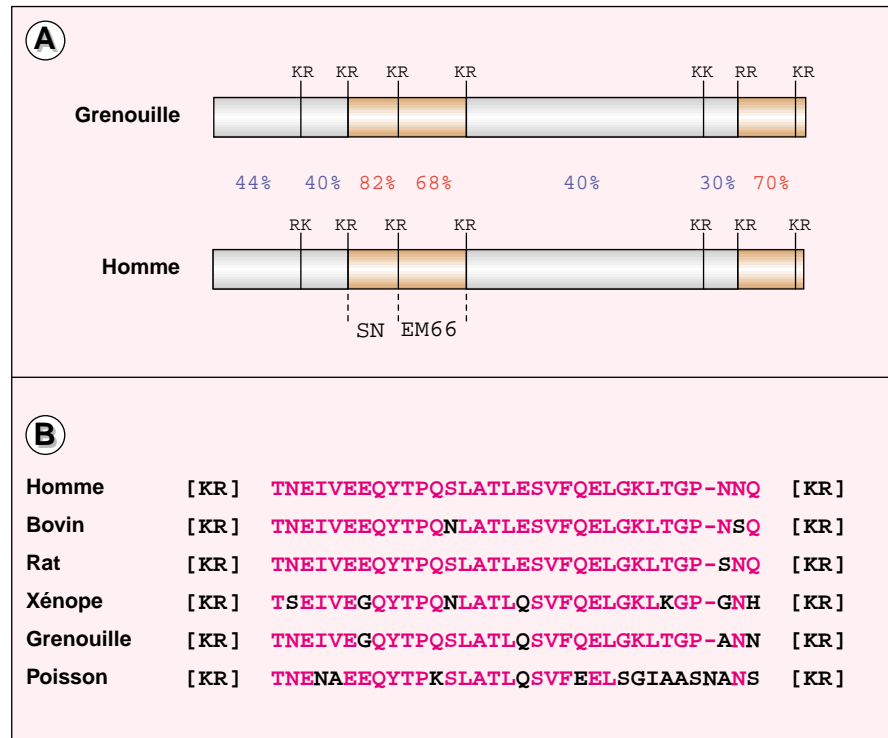


Figure 2. Comparaison des séquences de la SgII et de la SN chez différentes espèces. A. La SgII de grenouille possède un nombre limité de régions dont la séquence est fortement préservée chez l'homme. Ces régions sont flanquées par des sites de clivage potentiels (sites dibasiques) eux-mêmes conservés entre espèces. Les peptides SN et EM66 sont présents dans différents tissus et la SN exerce certaines activités biologiques. Les autres régions de la SgII présentent un moindre degré de conservation. B. La séquence de la SN est très fortement conservée chez les mammifères et présente environ 60 à 80% d'identité de séquence entre l'homme et les poissons ou les amphibiens. Les acides aminés qui divergent par rapport à la séquence humaine sont indiqués en noir. Les paires d'acides aminés basiques permettant la formation de la SN sont parfaitement conservées chez toutes les espèces.

fort degré de conservation de la SN [20]. En fait, les acides aminés constituant la SN présentent plus de 80% d'identité de séquence entre la grenouille et l'homme, et plus de 60% entre le poisson et l'homme (figure 2B). Cette conservation de séquence est remarquable dans la mesure où, d'une part, les poissons et les amphibiens ont divergé de la lignée menant aux mammifères il y a respectivement environ 400 et 350 millions d'années, et, d'autre part, la séquence d'autres régions de la protéine a été beaucoup moins bien préservée. De plus, les paires d'acides aminés basiques amino et carboxy-terminales, sites de clivage par les PC flanquant la séquence de la SN, ont été parfaitement conservées au cours de l'évolution (figure 2B). Par ailleurs,

il a été montré que la SN possède des récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines G, permettant l'activation de la protéine kinase C et la libération de calcium intracellulaire dans les monocytes [21]. L'ensemble de ces observations plaide en faveur d'un rôle de la SN en tant que neuropeptide agissant au niveau des systèmes nerveux et immunitaire. Un deuxième peptide flanquant la SN à son extrémité carboxy-terminale a été fortement préservé au cours de l'évolution. Ce peptide de 66 acides aminés, dénommé EM66, est également délimité par des sites dibasiques de clivage par les PC. Des anticorps dirigés contre le peptide EM66 humain recombinant ont permis de démontrer l'existence de ce peptide dans la surrénale

humaine tant chez le fœtus que chez l'adulte [22], indiquant que la maturation de la SgII s'effectue très tôt au cours de l'ontogenèse des glandes neuroendocrines pour engendrer des peptides tels que la SN ou l'EM66.

Chez les mammifères, la maturation, les propriétés physico-chimiques et la fonction de la CGA ont fait l'objet de nombreux travaux en raison de l'intérêt suscité par l'utilisation généralisée de cette protéine comme marqueur diagnostique de tumeurs neuroendocrines. Ces recherches ont abouti à la caractérisation de plusieurs peptides dérivés de la CGA capables d'exercer des activités biologiques (figure 3A). L'un des premiers peptides issus de la CGA à avoir été identifié est la pancréastatine (PST), un peptide  $\alpha$ -amidé de 49 acides aminés, qui a été initialement isolé à partir du pancréas de porc. La PST inhibe la libération d'insuline induite par le glucose dans les cellules  $\beta$  du pancréas [23], et elle contrôle le métabolisme hépatique du glycogène en stimulant la glycogénolyse et en inhibant la glycogénogenèse [24]. Deux autres polypeptides dérivés du clivage de la CGA, les vaso-statines, ont été identifiés *ex vivo*. Ces deux peptides, dénommés VS-1 et VS-2, qui correspondent respectivement à des fragments amino-terminaux de 76 et 113 acides aminés, inhibent l'effet vasoconstricteur de l'endothéline-1 sur des segments de veine ou d'aorte humaines [25]. La VS-1 recombinante stimule par ailleurs la libération de facteurs neurotoxiques par des cellules microgliales et provoque la dégénérescence de neurones en co-culture [26]. Enfin, il a été récemment montré que la VS-1 possède des activités antimicrobienne et antifongique [27], indiquant que des fragments de chromogranines, protéines largement distribuées dans l'organisme, peuvent faire partie de l'arsenal de défense en cas d'infection par des agents pathogènes.

Des peptides engendrés par protéolyse ménagée de la CGA peuvent inhiber la libération de catécholamines par les cellules chromaffines de la médullosurrénale stimulées par la nicotine [28]. Cette activité est attribuée à un peptide de 21 acides aminés, appelé catestatine (CST), qui

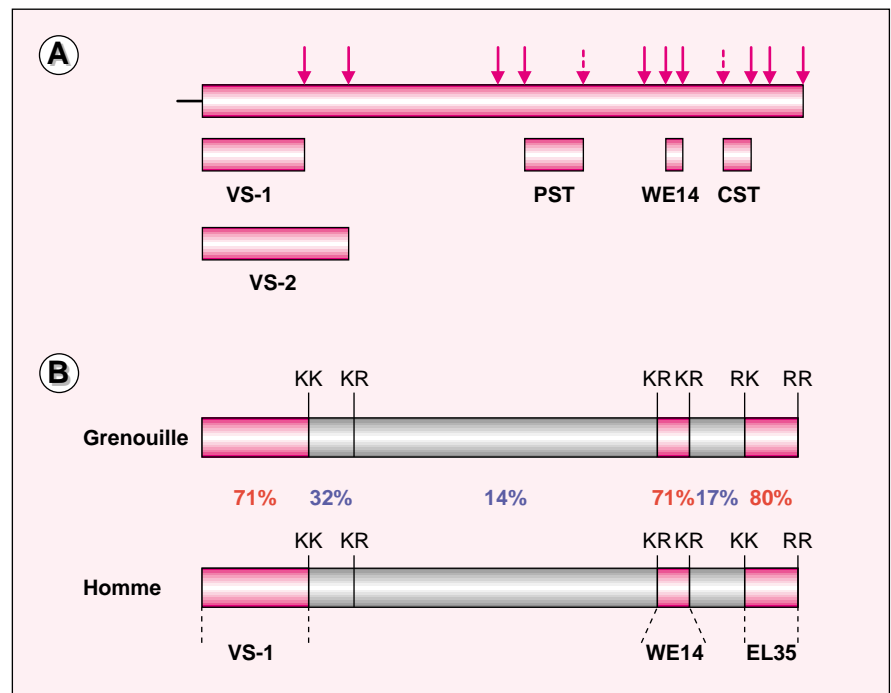


Figure 3. **Peptides dérivés de la CGA et degré de conservation.** A. Localisation de différents peptides issus de la maturation de la CGA chez des mammifères et qui exercent des activités biologiques. Les flèches indiquent les sites de clivage présents sur le précurseur. Les flèches en pointillés correspondent à des sites de clivage monobasiques. B. Comparaison des séquences de la CGA de grenouille et d'homme montrant la forte conservation de la séquence de trois peptides. Les pourcentages d'identité entre les différentes régions de la CGA sont indiqués.

agit comme un inhibiteur non compétitif du récepteur nicotinique de l'acétylcholine [29]. Par ailleurs, un peptide dérivé de la CGA, appelé WE-14, a été isolé à partir d'un phéochromocytome et d'une tumeur carcinoïde de l'iléon, mais aucune activité biologique n'a pu à ce jour lui être assignée. Toutes ces données plaident en faveur d'un rôle de la CGA en tant que précurseur de peptides biologiquement actifs. Toutefois, ces peptides n'ont été identifiés que chez certains mammifères. Leur caractérisation chez plusieurs espèces constituerait un argument supplémentaire en faveur d'un rôle physiologique de la CGA en tant que précurseur de peptides actifs. La caractérisation de la séquence de la CGA pour la première fois chez une espèce infra-mammalienne, la grenouille, a révélé que le pourcentage de similitude globale des CGA de grenouille et d'homme est d'environ 40% [30]. En réalité, seules trois régions de la CGA présentent une forte homologie (70%-80% de simi-

litude) et chacun de ces domaines est délimité par des paires d'acides aminés basiques elles-mêmes conservées. Les peptides potentiels issus de ces régions sont localisés dans le domaine amino-terminal renfermant la VS-1, dans la région du peptide WE-14 et à l'extrémité carboxy-terminale où aucun peptide mature n'avait été auparavant identifié (figure 3B). A l'inverse, les séquences séparant ces trois régions sont très peu conservées. En particulier, les domaines correspondant à la PST ou à la CST ont fortement divergé au cours de l'évolution. En fait, la région contenant la séquence de la PST chez les mammifères est déléetée dans le précurseur de la CGA de grenouille. Compte tenu du fait que la séquence de la PST diverge de manière importante au sein même des mammifères, ces résultats ne plaident pas en faveur d'un rôle de la PST comme authentique neuropeptide. On ne peut toutefois pas exclure l'hypothèse selon laquelle, chez les vertébrés infra-mammaliens, la PST et la



CST seraient produites à partir de précurseurs distincts de la CGA. La caractérisation de la CGA chez d'autres espèces devra permettre de mieux comprendre l'évolution de ces peptides.

Le clonage des chromogranines chez des espèces infra-mammaliennes a ainsi révélé que tous les doublets d'acides aminés basiques, qui constituent les sites de clivage par les PC, n'ont pas été conservés au cours de l'évolution. Un certain nombre d'entre eux est néanmoins préservé chez toutes les espèces, et ces sites de clivage conservés sont en général localisés de part et d'autre des régions présentant de forts degrés d'homologie (figure 2A et 3A). Il est donc raisonnable de penser que ces régions et les points de clivage qui les délimitent doivent être importants pour le rôle physiologique des chromogranines, et que la caractérisation des peptides qui en dérivent contribuera sur le plan fondamental à l'élucidation de la fonction de ces protéines. Dans certains cas, des peptides hautement conservés tels que la SN semblent jouer un rôle dans la neurotransmission et/ou la neuro-modulation, dans d'autres cas les peptides conservés tels que la VS-1 peuvent exercer une fonction de type hormonale ou participer au contrôle de l'homéostasie calcique intracellulaire. D'autres séquences conservées, tels que le peptide EM66 flanquant la SN dans la protéine SgII ou le peptide carboxy-terminal de la CGA (appelé EL35), sont produits *in vivo* chez plusieurs espèces mais leur fonction demeure inconnue.

Le rôle de la CGB en tant que précurseur de peptides biologiquement actifs n'a pas été très étudié jusque-là, même si des peptides issus de la maturation de cette protéine ont également été identifiés [2]. Le clonage de la CGB chez des espèces non-mammaliennes sera sans aucun doute également d'une grande aide pour déterminer le degré de conservation de la séquence et ses implications quant à la fonction de cette protéine.

### Évolution de l'expression des gènes des chromogranines

La distribution tissulaire des chromogranines a été étudiée en détail chez

plusieurs espèces de mammifères. Plusieurs types de cellules endocrines ou neuroendocrines présentent une immunoréactivité aux chromogranines. Les cellules hypophysaires, les cellules à calcitonine de la thyroïde, les cellules de la parathyroïde, les cellules chromaffines de la médullosurrénale, les cellules neuroendocrines des tractus gastro-intestinal et respiratoire expriment toutes les gènes des chromogranines. Dans le système nerveux central, les chromogranines sont présentes dans plusieurs régions avec une prédominance dans certaines structures telles que dans l'hypothalamus, l'hippocampe, l'amygdale ou le cervelet [31]. La concentration relative de chacune des chromogranines varie considérablement dans les différentes cellules

neuroendocrines ou neuronales comme mentionné précédemment, et la présence ou l'absence d'une granine ne permet pas de prédire l'existence ou non d'une autre granine. Ces observations sont très importantes lorsqu'il s'agit de démontrer la présence et la nature de cellules endocrines ou neuroendocrines, soit saines dans le cas où les chromogranines sont utilisées comme outils d'identification de ces cellules, soit tumorales dans le cas de caractérisation de néoplasmes.

Grâce au clonage de leurs ADNc chez des amphibiens ou des poissons, il a pu être montré que l'expression des gènes des granines chez ces espèces est également confinée aux cellules des tissus endocrines, neuroendocrines et neuronaux. Le taux

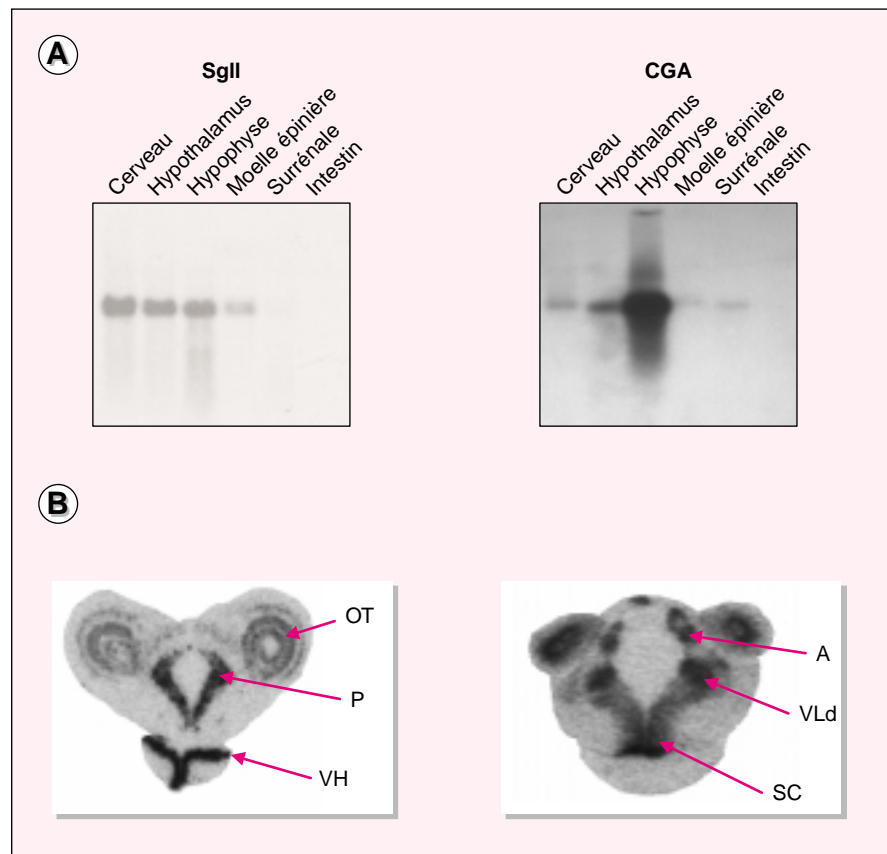


Figure 4. **Expression de la SgII et de la CGA chez la grenouille *Rana ridibunda*.** A. L'ARNm de la SgII est fortement exprimé dans le cerveau, l'hypophyse ou la moelle épinière tandis que le message de la CGA est exprimé à un taux beaucoup plus élevé dans l'hypophyse que dans les autres tissus, nerveux ou neuroendocrines. B. Dans le cerveau, les gènes de la SgII et de la CGA sont exprimés de façon différentielle dans certains noyaux. A: noyau thalamique antérieur; OT: toit optique; P: noyau thalamique postérieur; SC: noyau suprachiasmatique; VH: hypothalamus ventral; VLd: partie dorsale du noyau thalamique ventrolatéral.

d'expression du gène de la SgII est équivalent dans le cerveau, l'hypophyse ou la moelle épinière chez la grenouille. En revanche, le gène de la CGA est beaucoup plus fortement exprimé dans l'hypophyse que dans le cerveau, la moelle épinière et la surrénale (figure 4A). L'expression de la SgII et de la CGA est très diffuse dans le cerveau de la grenouille, même si certaines régions présentent des taux d'expression plus élevés (figure 4B). Il apparaît donc que la spécificité tissulaire d'expression des gènes des chromogranines est préservée au cours de l'évolution. Il existe cependant des variations inter-spécifiques (par exemple le messager de la CGA est plus fortement exprimé dans l'hypophyse chez la grenouille que chez les mammifères), qui reflètent probablement des différences fonctionnelles.

### Les chromogranines dans les tumeurs neuroendocrines

Le terme de tumeurs neuroendocrines regroupe des néoplasmes développés aux dépens de cellules endocrines et neuroendocrines se caractérisant par la présence de granules de sécrétion à cœur dense qui renferment des hormones, des neuropeptides et des protéines appartenant à la famille des chromogranines. Ces dernières et en particulier la CGA sont des marqueurs très fiables utilisés en clinique pour l'identification de tumeurs neuroendocrines, même lorsque celles-ci sont silencieuses, c'est-à-dire ne présentent pas d'hypersécrétion de l'hormone caractéristique des cellules non néoplasiques.

Chez l'homme, des chromogranines ont été détectées dans des cellules hypophysaires telles que les cellules gonadotropes ou thyrotropes, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale, les cellules parathyroïdiennes, les cellules C (à calcitonine) de la thyroïde, les différentes cellules pancréatiques, les cellules neuroendocrines des tractus gastro-intestinal et bronchique, les cellules neuroendocrines du sein et les cellules de Merkel de la peau [32]. La détection relativement aisée des chromogranines dans la majorité des cellules neuroendocrines et le fait qu'elles soient sécrétées à partir de ces cel-

lules ont tout naturellement incité plusieurs groupes à rechercher ces protéines dans les néoplasmes dérivant de ces cellules et dans le sérum de patients porteurs de tumeurs neuroendocrines, dans le but d'établir une relation entre l'expression ou les taux d'expression des chromogranines et la présence de tumeur de nature neuroendocrine. De nombreuses études ont été menées dans ce sens pour caractériser différents types de tumeurs incluant des carcinomes gastro-intestinaux, des phéochromocytomes, des carcinomes médullaires thyroïdiens, des carcinomes bronchiques ou mammaires, entre autres [4].

Plusieurs observations démontrent la valeur clinique des chromogranines pour le diagnostic et le pronostic des tumeurs neuroendocrines. Des niveaux plasmatiques élevés des chromogranines reflètent en général la présence et la nature endocrine ou neuroendocrine des tumeurs. De plus, des chromogranines peuvent être détectées et servir de marqueurs dans des tumeurs neuroendocrines non fonctionnelles. Ainsi, des taux plasmatiques élevés de CGA ont été détectés dans des carcinomes médullaires thyroïdiens, des carcinomes pancréatiques ou des adénomes hypophysaires dont les hormones habituelles n'ont pu être mesurées [33]. La détection tissulaire ou la

mesure des niveaux plasmatiques de chromogranines peuvent être dans certains cas corrélées au stade de différenciation ou de développement d'une tumeur. Une concentration élevée de CGA a été plus souvent observée chez des patients atteints de carcinomes à petites cellules du poumon à un stade avancé de la maladie que chez des patients à des stades plus précoces [34]. La masse tumorale des phéochromocytomes est aussi positivement corrélée à la concentration plasmatique de la CGA [35]. Dans les cas de neuroblastomes, la CGA sérique est un marqueur sensible et spécifique dont la concentration est corrélée à l'évolution de la tumeur et à la survie des enfants atteints [36]. Il a été montré qu'une forte expression de la CGA dans les neuroblastomes est associée à une évolution défavorable, alors qu'une forte expression de la SgII est associée à une évolution favorable de la tumeur (différenciation neuronale) [37]. La plupart des résultats sur les caractéristiques de certaines tumeurs neuroendocrines ont été obtenus par la mesure de la CGA. Or, plusieurs auteurs ont souligné la nécessité d'utiliser différentes chromogranines comme marqueurs puisque certaines tumeurs neuroendocrines peuvent produire des quantités élevées de chromogranines autres que la CGA [4, 33] (voir

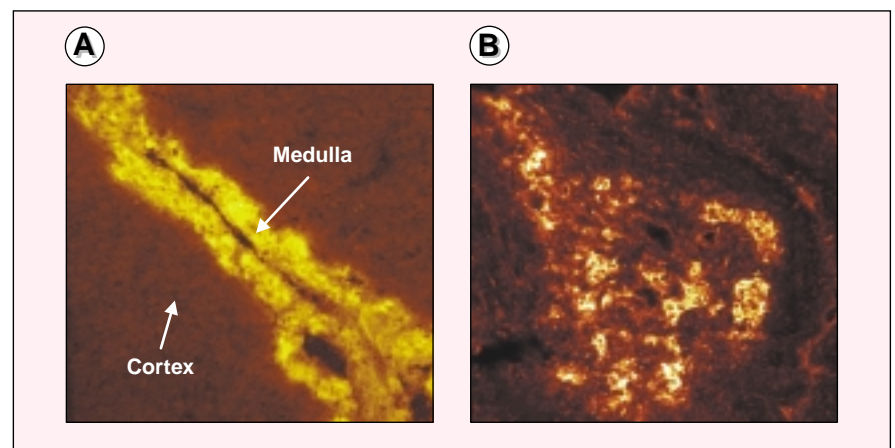


Figure 5. Localisation immunohistochimique du peptide EM66 dans une surrénale humaine normale et dans un phéochromocytome ectopique vésical. A. L'immunoréactivité associée au peptide EM66 dérivant de la SgII est détectée dans la région médullaire de la surrénale humaine grâce à l'anticorps spécifique dirigé contre le peptide EM66 humain recombinant [22]. B. Une immunoréactivité de type EM66 intense est observée dans un phéochromocytome vésical.

l'article de E. Baudin et F. Degorce, p. 438 de ce numéro).

L'utilisation de marqueurs de l'état de différenciation des néoplasmes neuroendocrines est cruciale pour un diagnostic et un traitement précoce de ces tumeurs. De plus, l'identification de la différenciation neuroendocrine d'une tumeur dès les premiers stades de la maladie est d'autant plus importante que certaines tumeurs neuroendocrines ont un pronostic favorable. Dans ce cadre, la caractérisation des peptides issus de la maturation des chromogranines dans les tumeurs neuroendocrines et leur mesure plasmatique pourraient offrir de nouveaux outils pour la détection et le suivi de certains de ces néoplasmes. Une étude récente a rapporté les mesures des taux de SN, peptide dérivé de la SgII, dans le sérum et les urines de sujets contrôles ou porteurs de différents types de tumeurs neuroendocrines [38]. La concentration sérique en SN augmente jusqu'à des valeurs atteignant 45 fois les valeurs normales dans certains types de tumeurs neuroendocrines telles que les phéochromocytomes, les tumeurs du tractus gastro-intestinal ou des tumeurs neuroendocrines bronchopulmonaires. En revanche, des patients atteints de neuroblastomes, d'insulinomes, d'adénomes hypophysaires ou de tumeurs non neuroendocrines présentent des concentrations normales de SN. Cette étude a révélé que, même si la CGA reste un marqueur plus sensible des tumeurs neuroendocrines, la quantification de peptides dérivés des chromogranines pourrait être pertinente dans certains cas de néoplasmes neuroendocrines [38]. Le dosage plasmatique de la SN a été également effectué chez des patients présentant des maladies de la prostate allant de la prostatite au cancer dont une proportion échappait au traitement par suppression des androgènes. Ce dernier type de tumeurs prostatiques malignes est souvent associé à une différenciation neuroendocrine [39]. Dans ce cas, il a été montré que le taux de SN sérique est élevé, confirmant l'hypothèse encore débattue d'une association de la différenciation neuroendocrine avec la progression du cancer de la prostate [40]. Il a été également montré que

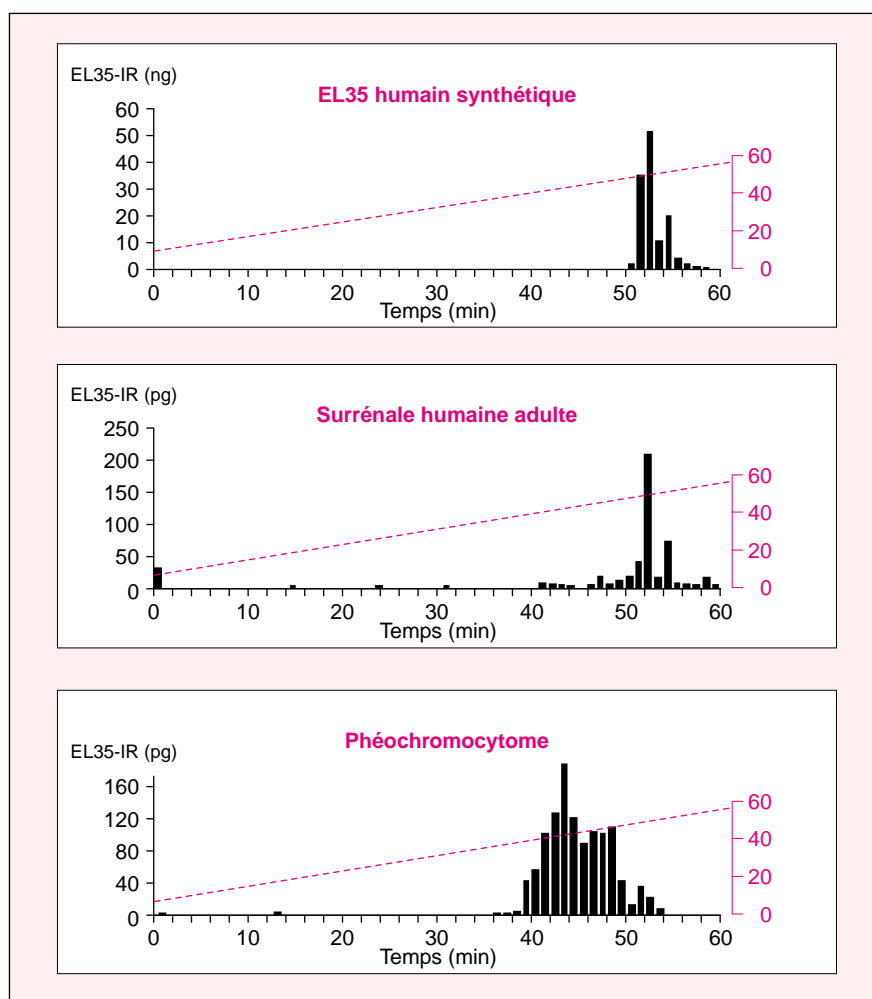


Figure 6. **Caractérisation du peptide EL35 dans la surrenale humaine saine ou tumorale.** Le peptide EL35 issu de la maturation de la CGA humaine a été recherché dans des extraits de surrenale humaine ou de phéochromocytomes, et les profils chromatographiques ont été comparés à celui du peptide synthétique. La détection a été réalisée par dosage radioimmunologique. Les profils observés dans les deux types d'extraits sont distincts, révélant une maturation différentielle de la CGA entre le tissu sain et le tissu tumoral.

l'immunoréactivité de type VS-1 permet de distinguer les tumeurs carcinomateuses de l'iléon de celles du poumon. Cette observation est importante pour l'identification de foyers métastatiques d'origine primaire inconnue [41]. De nouvelles études devraient être entreprises avec divers autres peptides issus du clivage des chromogranines afin de déterminer si la détection de ces peptides pourrait permettre de prédire l'existence et l'évolution de certaines tumeurs neuroendocrines et de développer des stratégies thérapeutiques adaptées. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le peptide EM66 de la SgII a permis de

révéler une immunoréactivité dans un phéochromocytome ectopique vésical (figure 5B) mais pas dans d'autres phéochromocytomes. De même, la caractérisation par chromatographie liquide à haute performance suivie du dosage radioimmunologique du peptide EL35 (issu de la maturation de la CGA) a révélé que le peptide mature est présent en grande quantité dans la médullosurrénale humaine normale mais qu'il est quasiment indétectable dans un phéochromocytome, qui toutefois contient d'autres formes moléculaires apparentées à l'EL35 (figure 6). Ces observations, qui doivent encore être étendues à une plus grande



population, pourraient avoir un impact clinique dans la prise en charge des patients porteurs de tumeurs neuroendocrines

## Conclusions

La détermination de la structure des chromogranines chez des vertébrés non mammaliens a montré que la séquence de quelques peptides issus de la maturation de ces protéines a été hautement conservée au cours de l'évolution, suggérant que ces peptides sont importants pour la fonction physiologique des chromogranines. Le fait que certains de ces peptides exercent des activités biologiques indique que les chromogranines pourraient représenter des précurseurs de neuropeptides. Cependant, l'implication de certaines régions conservées dans des processus intracellulaires tels que l'homéostasie calcique ou le tri des hormones et neurotransmetteurs vers la voie de sécrétion réglée n'est pas à exclure (voir l'article de D. Aunis et M.H. Metz-Boutigue, p. 418 de ce numéro). L'expression tissu- et cellule-spécifique des chromogranines semble être une constante chez tous les vertébrés étudiés à ce jour et repose sur la présence systématique d'un CRE dans les promoteurs proximaux des gènes des chromogranines. Les facteurs interagissant avec ce CRE coopèrent probablement avec d'autres facteurs de transcription, pour conférer la spécificité d'expression dans les cellules neuroendocrines et dans les neurones. Dans les néoplasies neuroendocrines, l'étude de l'expression des peptides issus des chromogranines ouvre de nouvelles voies à explorer pour améliorer le traitement et le suivi de patients porteurs de ce type de tumeurs ■

## Remerciements

Nous souhaitons remercier S. Jégou, J. Leprince, D. Alexandre, L. Grumolato, D. Ait-Ali, C. Desmoucelles et tous les autres membres de l'unité Inserm U. 413 pour leur aide précieuse. Nous remercions également H. Lefebvre et P.F. Plouin pour les discussions fructueuses dans le cadre des réunions du Réseau COMETE (PHRC: AOM95201). Nos travaux ont été réalisés avec le soutien financier de l'Inserm (U. 413) et du Conseil régional de Haute-Normandie.

## RÉFÉRENCES

1. Iacangelo AL, Eiden LE. Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. *Regul Pept* 1995; 58: 65-88.
2. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; 49: 497-528.
3. Anouar Y, Benie T, De Monti M, Counis R, Duval J. Estradiol negatively regulates secretogranin II and chromogranin A messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal. *Endocrinology* 1991; 129: 2393-9.
4. Hendy GN, Bevan S, Mattei MG, Moulard AJ. Chromogranin A. *Clin Invest Med* 1995; 18: 47-65.
5. Iacangelo A, Affolter HU, Eiden LE, Herbert E, Grimes M. Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature* 1986; 323: 82-6.
6. Wu H, Mahata SK, Mahata M, Webster NJ, Parmer RJ, O'Connor DT. A functional cyclic AMP response element plays a crucial role in neuroendocrine cell type-specific expression of the secretory granule protein chromogranin A. *J Clin Invest* 1995; 96: 568-78.
7. Desmoucelles C, Vaudry H, Eiden LE, Anouar Y. Synergistic action of upstream elements and a promoter-proximal CRE is required for neuroendocrine cell-specific expression and second-messenger regulation of the gene encoding the human secretory protein secretogranin II. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 157: 55-66.
8. Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 1999; 398: 165-9.
9. Hahm SH, Eiden LE. Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene. *J Biol Chem* 1998; 273: 17086-94.
10. Clark ME, Mellon PL. The POU homeodomain transcription factor Oct-1 is essential for activity of the gonadotropin-releasing hormone neuron-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6169-77.
11. Therrien M, Drouin J. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2342-53.
12. Deftos LJ, Bjornsson BT, Burton DW, O'Connor DT, Copp DH. Chromogranin A is present in and released by fish endocrine tissue. *Life Sci* 1987; 40: 2133-6.
13. Peterson JB, Nelson DL, Ling E, Angeletti RH. Chromogranin A-like proteins in the secretory granules of a protozoan, *Paramecium tetraurelia*. *J Biol Chem* 1987; 262: 17264-7.
14. Anouar Y, Jégou S, Alexandre D, Lihmann I, Conlon JM, Vaudry H. Molecular cloning of frog secretogranin II reveals the occurrence of several highly conserved potential regulatory peptides. *FEBS Lett* 1996; 394: 295-9.
15. Holthuis JC, Martens GJ. The neuroendocrine proteins secretogranin II and III are regionally conserved and coordinately expressed with proopiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *J Neurochem* 1996; 66: 2248-56.
16. Vaudry H, Conlon JM. Identification of a peptide arising from the specific post-translation processing of secretogranin II. *FEBS Lett* 1991; 284: 31-3.
17. Kirchmair R, Hogue-Angeletti R, Gutierrez J, Fischer-Colbrie R, Winkler H. Secretoneurin-a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other endocrine tissues by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience* 1993; 53: 359-65.
18. Agneter E, Sitte HH, Stockl-Hiesleitner S, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Singer EA. Sustained dopamine release induced by secretoneurin in the striatum of the rat: a microdialysis study. *J Neurochem* 1995; 65: 622-5.
19. Duzendorfer S, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Secretoneurin, a novel neuropeptide, is a potent chemoattractant for human eosinophils. *Blood* 1998; 91: 1527-32.
20. Blazquez M, Bosma PT, Chang JP, Docherty K, Trudeau VL. Gamma-aminobutyric acid up-regulates the expression of a novel secretogranin-II messenger ribonucleic acid in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 1998; 139: 4870-80.
21. Kong C, Gill BM, Rahimpour R, et al. Secretoneurin and chemoattractant receptor interactions. *J Neuroimmunol* 1998; 88: 91-8.
22. Anouar Y, Desmoucelles C, Yon L, et al. Identification of a novel secretogranin II-derived peptide (SgII(187-252)) in adult and fetal human adrenal glands using antibodies raised against the human recombinant peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2944-51.
23. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 1986; 324: 476-8.
24. Sanchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin inhibits insulin-stimulated glycolysis but not glycolysis in rat hepatocytes. *Regul Pept* 1994; 51: 215-20.
25. Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G. Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol* 1993; 5: 405-12.
26. Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Taupenot L, et al. Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 14339-46.
27. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, et al. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 2000; 275: 10745-53.

## RÉFÉRENCES

28. Simon JP, Bader MF, Aunis D. Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1712-6.
29. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, *et al.* Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest* 1997; 100: 1623-33.
30. Turquier V, Vaudry H, Jegou S, Anouar Y. Frog chromogranin A messenger ribonucleic acid encodes three highly conserved peptides. Coordinate regulation of proopiomelanocortin and chromogranin A gene expression in the pars intermedia of the pituitary during background color adaptation. *Endocrinology* 1999; 140: 4104-12.
31. Weiler R, Marksteiner J, Bellmann R, *et al.* Chromogranins in rat brain: characterization, topographical distribution and regulation of synthesis. *Brain Res* 1990; 532: 87-94.
32. Rosa P, Gerdes HH. The granin protein family: markers for neuroendocrine cells and tools for the diagnosis of neuroendocrine tumors. *J Endocrinol Invest* 1994; 17: 207-25.
33. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev* 1991; 12: 181-7.
34. Sobol RE, O'Connor DT, Addison J, Suchocki K, Royston I, Deftos LJ. Elevated serum chromogranin A concentrations in small-cell lung carcinoma. *J Inter Med* 1986; 105: 698-700.
35. O'Connor DT, Bernstein KN. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 764-70.
36. Hsiao RJ, Seeger RC, Yu AL, O'Connor DT. Chromogranin A in children with neuroblastoma. Serum concentration parallels disease stage and predicts survival. *J Clin Invest* 1990; 85: 1555-9.
37. Pagani A, Forni M, Tonini GP, Papotti M, Bussolati G. Expression of members of the chromogranin family in primary neuroblastomas. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 16-24.
38. Ischia R, Gasser RW, Fischer-Colbrie R, *et al.* Levels and molecular properties of secretoneurin-immunoreactivity in the serum and urine of control and neuroendocrine tumor patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 355-60.
39. Cussenot O, Villette JM, Cochand-Priollet B, Berthon P. Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl* 1998; 8: 43-51.
40. Ischia R, Hobisch A, Bauer R, *et al.* Elevated levels of serum secretoneurin in patients with therapy resistant carcinoma of the prostate. *J Urol* 2000; 163: 1161-4.
41. Cunningham RT, Pogue KM, Curry WJ, Johnston CF, Sloan JM, Buchanan KD. Immunostaining for vasostatin I distinguishes between ileal and lung carcinoids. *J Pathol* 1999; 187: 321-5.

TIRÉS À PART

H. Vaudry.

## Summary

### Chromogranin-derived peptides: from phylogenesis to neuroendocrine tumours

Chromogranins have been characterized in mammals a few decades ago and are routinely used as markers for neuroendocrine tumours. Structural characteristics of these proteins as well as experimental data suggest that chromogranins may serve as precursors to biologically active peptides. Recently, the cloning of the cDNAs encoding chromogranins in amphibians and fish revealed the occurrence of highly conserved regions that are delimited by cleavage sites. These regions give rise to peptides *in vivo* which may represent the functional determinants of chromogranins. A constant characteristic of chromogranins in all species is their specific expression in neuroendocrine cells. In the case of neuroendocrine neoplasia, the detection and the measurement of concentrations of chromogranin-derived peptides may improve the diagnosis and the prognosis of some of these tumours.