

Les protéines tueuses

On appelle « tueuses » les protéines capables de provoquer la lyse de cellules cibles. Deux systèmes lytiques ont été particulièrement étudiés : l'un, connu depuis longtemps, à localisation humorale, est celui du complément ; l'autre, à localisation cellulaire, dont le type est la perforine. Tous deux provoquent la formation de pores fonctionnels dans les membranes cibles.

1. Activité humorale. Le système de lyse le mieux connu est celui du complément, qui est capable de détruire de nombreuses cellules en présence d'une combinaison antigène-anticorps. On appelle de ce nom un ensemble de constituants que l'on peut grossièrement diviser en deux groupes. Le premier, de C1 à C4, est un complexe d'activation. C'est le second qui nous intéresse ici. En effet la formation de pores met en jeu le « complexe d'attaque de membrane » de la cascade du complément. Il est formé de l'assemblée supramoléculaire des cinq derniers constituants (C5b, C6, C7, C8, C9), qui s'insère dans la membrane cible en formant des lésions tubulaires, compatibles avec le modèle transmembranaire de cytolysé dit en « *petite-nonnette* » (*doughnut*). On voit en effet au microscope électronique des anneaux d'environ 100 Å à travers lesquels peuvent passer de nombreuses substances. De ces constituants, c'est C9 qui est le plus important ; il est capable de provoquer à lui seul les mêmes lésions que le complexe. Toutefois l'action du C9, qui nécessite sa polymérisation, est extrêmement lente, et le rôle de C5-C8 serait précisément de catalyser cette polymérisation. Expérimentalement, l'addition de zinc l'accélère dans de fortes proportions. Si l'on considère cependant que la seule fonction des autres constituants est de permettre la polymérisation de C9, la découverte récente que C7, C8 et probablement C6 présentent un haut degré d'homologie avec C9 pourrait paraître surprenante ; elle a

fait l'objet d'une interprétation sur laquelle nous reviendrons.

2. Activité cellulaire. Comme l'a rapporté *m/s* (*lexique n°6, vol. 3, p. 360*), les cellules dotées d'activité cytotoxique se subdivisent en deux grands groupes selon qu'elles fonctionnent dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou en dehors de celui-ci.

Parmi ces dernières s'individualisent les cellules tueuses (*natural killers*, NK) qui fonctionnent directement, sans avoir besoin ni de s'armer d'immunoglobulines (comme par exemple les cellules K) ni de stimulation par l'interleukine 2 (cellules LAK, *lymphokine activated killers*). On ne sait pas si ces cellules cytotoxiques NK utilisent, dans l'attaque de leurs cibles, les mêmes mécanismes que les autres cellules cytotoxiques, notamment les CTL (*cytotoxic T lymphocytes*) CD8⁺ reconnaissant des cellules présentant l'antigène dans le contexte des molécules du CMH de classe I. L'hypothèse de l'intervention du complément a d'emblée été rejetée devant l'absence d'effet d'anticorps anticomplément sur la lyse

par les lymphocytes tueurs.

Les cellules utilisées dans cette recherche sont tantôt des lignées de cellules de rat ou de souris, tantôt des cultures de grands lymphocytes granulaires humains, qui ont servi également pour les purifications ultérieures. Les cellules cibles peuvent être des globules rouges de mouton ou des cellules humaines K 562. La première constatation fut que les cellules tueuses provoquent la formation de pores analogues à ceux qu'induit le complément, mais de taille différente, tantôt plus grands (160 Å), tantôt plus petits ; on a donné à l'agent actif le nom de perforine, et on en a distingué deux : perforine 1 (pores de grande taille), sur laquelle s'est focalisée la recherche ultérieure, et perforine 2 (pores de taille inférieure à 100 Å). Les propriétés lytiques des cellules tueuses intactes sont conservées par des préparations de granules obtenues par centrifugation différentielle. Les granules intacts sont actifs, mais on peut aussi en isoler une protéine de 70 000 Da (daltons) qui possède la totalité de l'activité. Granules et protéine purifiée n'agissent qu'en présence de Ca⁺⁺. Dans ces

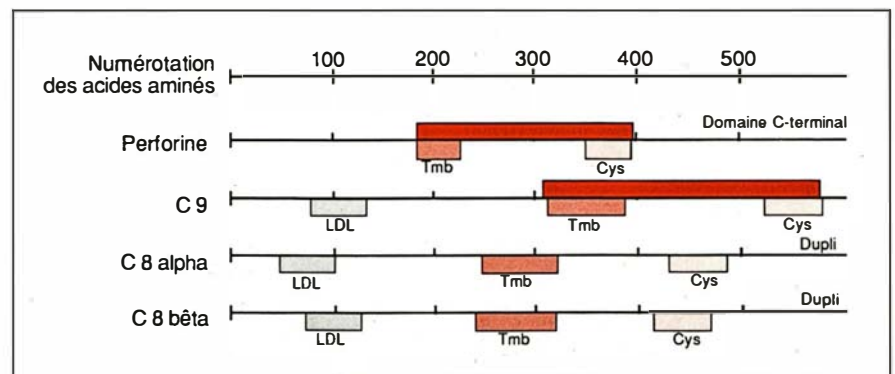


Figure 1. **Protéines tueuses.** Comparaison schématique des structures de la perforine et des derniers constituants du complément. En rouge : homologie générale entre perforine et C9. En rose : zones d'homologie étroite. Tmb = zone transmembranaire ; Cys = zone riche en cystéines ; LDL = deuxième zone riche en cystéines (en gris), homologue de celle du récepteur des LDL, qui manque dans la perforine ; Dupli = duplication d'un domaine aminoterminal, présente dans les deux sous-unités du C8 et absente du C9. La taille et la position des domaines varie légèrement selon l'espèce (souris ou homme) dont sont tirés les documents.

conditions, la perforine forme des polymères d'au moins 10^6 Da. Elle est capable d'agir également sur des vésicules lipidiques.

L'obtention de perforine purifiée a permis la préparation d'anticorps spécifiques et la recherche de réactions immunologiques croisées avec les constituants terminaux du complément, au premier chef C9 [1]. On a effectivement trouvé une réactivité croisée qui a pu être évaluée entre 3 et 5 %. Ces travaux ont suggéré des analogies de structure entre C9 et perforine, qui n'ont pu être précisées que lorsque fut réalisé, au cours des deux dernières années, le clonage suivi du séquençage nucléotidique des constituants du complément : C7 [2], les deux chaînes α et β de C8 [3-5] et C9 dans plusieurs espèces [6] et tout récemment [7] de la perforine de souris et humaine [8]. Il est devenu ainsi possible de cerner ressemblances et différences.

C'est la séquence de la perforine qui a suscité le plus d'intérêt, puisqu'elle est l'unique protéine connue qui soit capable à elle seule de s'insérer au sein d'une membrane cible. L'ADN complémentaire a été obtenu en criblant une banque d'un clone CTL de souris, par la méthode classique des oligonucléotides correspondant à une courte séquence d'acides aminés de la protéine. La protéine mature contient 534 acides aminés plus un peptide signal de 20 acides aminés. La taille de la protéine est donc d'environ 60 000 Da, et c'est l'addition de glucides en trois sites de N-glycosylation qui lui confère sa taille apparente de 70 000 Da. L'attention s'est concentrée sur les homologies et les différences avec C9. Les homologies se sont révélées plus limitées qu'on ne le pensait. Elles se cantonnent au deuxième tiers de la molécule de perforine (résidus 170-390) qui ressemble à la portion 328-560 du C9. Plus précisément, la ressemblance est frappante dans deux zones probablement importantes physiologiquement : une zone transmembranaire présomptive (176-210) et une zone riche en cystéine (356-386). Ces deux régions sont également présentes dans C8 α et β . En revanche, d'autres régions sont totalement dif-

férentes : la partie C-terminale de la perforine est particulière, et cette protéine est dépourvue d'une autre zone riche en cystéine, homologue de celle des LDL, et présente dans les derniers constituants du complément.

Est-il possible, dans l'état actuel des connaissances — on ignore encore les fonctions de la plupart des domaines de la perforine —, d'interpréter en termes moléculaires les relations des protéines lytiques ? Ce problème est à débattre en fonction des propriétés de ces protéines : la perforine agit seule mais réclame la présence de Ca^{++} ; des constituants du complément, c'est le C9 polymérisé qui est actif, les autres paraissant nécessaires mais non actifs par eux-mêmes, alors qu'ils possèdent les séquences critiques. Stanley et Luzio [9] ont tenté d'interpréter ce qu'ils appellent « un tableau fascinant de remodelage évolutif » (*evolutionary cut-and-pasting*), en invoquant l'addition et la soustraction de domaines protéiques, probablement par adoption ou élimination d'exons au cours de l'évolution. Ces protéines ont en effet un caractère de mosaïques, comportant des domaines susceptibles de plicatures indépendantes. Elles possèdent toutes un motif central lié à la fonction lytique. La comparaison de C9 avec C8 montre que les deux sous-unités de C8 ont un domaine proche du C terminal, absent de C9, qui est sans doute responsable de l'incapacité de C8 à se polymériser. Quant à la perforine, il s'agit de comprendre quels sont les motifs qui lui permettent de se polymériser et de s'insérer dans la membrane. Deux méthodes devraient aider à résoudre les questions encore obscures concernant chacun des domaines de ces protéines : la construction de protéines chimériques, en greffant ou en enlevant le domaine dont on veut étudier l'influence ; la mutagenèse dirigée sur un site supposé sensible, ce qui permettra d'en modifier les propriétés fonctionnelles.

Le fonctionnement des protéines lytiques en physiopathologie continue à poser des problèmes difficiles. On peut en particulier en individua-

liser deux : qu'est-ce qui déclenche leur activation, ou au contraire les empêche d'être activées en permanence ? d'autre part, les protéines tueuses que nous connaissons sont-elles les seules à jouer ce rôle, ou occupent-elles indûment le devant de la scène ? (1) L'équipe de Müller-Eberhard a isolé une protéine de 65 kDa, associée aux membranes cellulaires, et capable d'inhiber la formation du complexe d'attaque membranaire du complément, empêchant donc la formation du complexe d'attaque membranaire du complément, la formation de canaux par C8 et C9. Ce même groupe a récemment [10] démontré que ce HRF (*homologous restriction factor*) protège aussi contre la lyse cellulaire par la perforine. C'est peut-être la présence de HRF en plus grande quantité qui explique la raison pour laquelle le pouvoir lytique des grands lymphocytes humains est moindre que celui des cellules homologues murines [8]. On peut, de plus, faire l'hypothèse que l'existence de HRF à leur surface rend les cellules tueuses résistantes à leur propre cytotoxicité. Argument supplémentaire, la résistance d'une cellule à la lyse est abolie *in vitro* par des anticorps anti-HRF. Mais on ignore quel est le mécanisme qui permet le déclenchement de la lyse *in vivo*. (2) Le rôle joué par le système du complément n'est pas mis en doute. On sait toutefois qu'en l'absence de C9, la lyse par le complément peut encore avoir lieu, bien qu'à vitesse moindre ; on connaît par ailleurs un déficit en C9, reconnu au Japon chez un donneur de sang sur 10 000, qui n'a pas de conséquences cliniques. Quant à la perforine, son rôle a été mis en doute par des expériences rapportées récemment dans *m/s* (n° 2, vol. 4, p. 130). Alors que la perforine exige la présence de Ca^{++} , il est possible de provoquer la lyse de certaines cellules cibles en l'absence de cet ion et de toute exocytose détectable. Il est probable que peuvent intervenir deux mécanismes différents, l'un dépendant et l'autre, encore à identifier, indépendant de la perforine. Un argument important en faveur de la perforine a été apporté par Shinkai *et al.* [7] : grâce

à leur sonde ils ont pu apprécier la présence et la quantité du messenger de la perforine dans les cellules ; un transcrit de 3 kb (kilobases) a été trouvé dans toutes les CTL et dans les cellules tueuses, en bonne corrélation avec l'activité hémolytique de ces lignées ; en revanche, aucune des lignées dépourvues de cette propriété, cellules tumorales ou cellules T auxiliaires n'en possédait. Si donc les cellules tueuses possèdent dans leur arsenal plusieurs armes, l'une d'elles est presque certainement la perforine.

Jean-Claude Dreyfus

RÉFÉRENCES

1. Young JDE, Cohn ZA, Podack R. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological and functional similarities. *Science* 1986; 233 :184-9.
2. Di Scipio RG, Chakravarti DN, Muller-Eberhard HJ, Fey GH. The structure of human complement component C7 and the C5-6-7 complex. *J Biol Chem* 1988; 253 : 549-60.
3. Haefliger JA, Tschopp J, Nardelli D, et al. Complementary DNA cloning of complement C8 β and its sequence homology to C9. *Biochemistry* 1987; 26 : 3551-6.
4. Rao AG, Howard MZ, Ng SC, et al. Complementary DNA and derived amino-acid sequence of the α subunit of human complement protein C8: evidence for the existence of a separate α subunit messenger RNA. *Biochemistry* 1987; 26 : 3156-64.
5. Howard MZ, Rao AG, Sodetz JM. Complementary DNA and derived amino-acid sequence of the β subunit of human complement protein C8: identification of a close structural and ancestral relationship to the α subunit and C9. *Biochemistry* 1987; 26 : 3665-70.
6. Stanley KH, Herz J, Dickson J. Topological mapping of complement component C9 by recombinant DNA techniques suggests a novel mechanism for its insertion into target membranes. *EMBO J* 1987; 6 : 1951-7.
7. Shinkai Y, Takio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* 1988; 334 : 525-7.
8. Lichtenfeld MG, Olsen KJ, Lu P, et al. Structure and function of human perforin. *Nature* 1988; 335 : 448-51.
9. Stanley K, Luzio P. A family of killer proteins. *Nature* 1988; 334 : 475-6.
10. Martin DE, Zalman LS, Müller-Eberhard HJ. Induction of expression of cell-surface homologous restriction factor upon anti-CD3 stimulation of human peripheral lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 213-7.

■■■ La glande mammaire sécrète, au cours de la lactation, une hormone hypercalcémiant de type « parathormone » identique à celle caractérisée dans des tumeurs pulmonaires. Il y a un peu plus d'un an, l'ADN complémentaire du messenger d'une hormone hypercalcémiant responsable de syndromes paranéoplasiques était cloné à partir de tumeurs de malades atteints d'hypercalcémie [1]. La parathormone et cette nouvelle molécule aux activités biologiques similaires ont en commun une région de leur séquence aminoterminal. Il était évident que le rôle normal de cette molécule, appelée PTH-LP (*parathormone like peptide*) n'était pas de provoquer des hypercalcémies paranéoplasiques. De fait, un groupe des laboratoires Merck Sharp et Dohme aux USA (West Point, PA) vient de démontrer que la glande mammaire de rate en période de lactation contenait du PTH-LP, absent (ou plus exactement indétectable) dans les tissus adultes et embryonnaires [2]. Une telle production de PTH-LP pourrait expliquer la résorption osseuse et le transfert de calcium dans le lait survenant au cours de l'allaitement ; elle explique également l'observation publiée en 1984 d'une femme ayant une hypoparathyroïdie et dont la calcémie s'était normalisée durant l'allaitement, en l'absence d'hormonothérapie substitutive [3].

- [1. Susa LJ, et al. *Science* 1987; 237 : 893-6.]
- [2. Thiede MA, Rodan GA. *Science* 1988; 242 : 278-80.]
- [3. Rude RK, et al. *Endocrinol Jpn* 1984; 31 : 227-35.]

■■■ La plus petite baleine possible... La limite inférieure du poids du corps pour un homéotherme est la taille pour laquelle la production de chaleur est en équilibre avec les pertes par convection et conduction. Ces pertes de chaleur ont été évaluées, à 20° C, comme 90 fois plus élevées dans l'eau que dans l'air. Comme la perte de chaleur varie avec le poids, il est possible de calculer le poids minimum que peut avoir un homéo-

therme, à sa naissance, qui soit compatible avec son équilibre thermique. Downhower et Blumer [1] l'ont évalué à 6,8 kg. Au-dessous, le nouveau-né ne pourrait compenser les pertes par la production métabolique de chaleur et sa température s'abaisserait inéluctablement. Les seuls animaux homéothermes qui naissent dans l'eau sont les cétacés et les sirénidés. La valeur prédite est en effet voisine de celle des plus petits endothermes aquatiques à la naissance, les dauphins de rivière.

[1. Downhower JF, Blumer LS. *Nature* 1988, 335 : 675]

■■■ Acétaldéhyde et foetopathies alcooliques. La consommation d'alcool par des femmes enceintes est à l'origine d'anomalies congénitales et de retards mentaux de l'enfant. Des études expérimentales suggèrent que, en plus de la toxicité propre de l'alcool, son produit d'oxydation, l'acétaldéhyde, pourrait contribuer à l'atteinte foetale. Il n'existait jusqu'à présent que des arguments indirects en faveur d'un accès possible de l'acétaldéhyde au fœtus humain. Une équipe américaine [1] a pratiqué des perfusions d'alcool et d'acétaldéhyde à travers des fragments (cotylédons) de placentas humains à terme. Deux constatations ont pu être faites : d'une part, le placenta est capable d'oxyder l'alcool en acétaldéhyde, bien qu'à un rythme très inférieur à celui du foie, et de le libérer au pôle foetal ; d'autre part, l'acétaldéhyde placé dans le perfusé « maternel » traverse le placenta pour parvenir au côté foetal ; or on peut trouver de l'acétaldéhyde dans le sang des alcooliques. Il existe donc deux sources potentielles d'arrivée d'acétaldéhyde au fœtus chez la mère alcoolique. Compte tenu de la très faible capacité du foie foetal à éliminer alcool et acétaldéhyde, la production et le transport d'acétaldéhyde au fœtus pourraient jouer un rôle important dans l'atteinte foetale lorsque les mères sont consommatrices d'alcool. [1. Karl PI, et al. *Science* 1988; 242 : 273-5.]