

Rôles des antigènes carcino-embryonnaires dans la cancérisation et la progression tumorale

Stéphanie Létourneau
Nicole Beauchemin

Les membres de la famille de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ces protéines sont fortement glycosylées; certaines sont liées à la membrane cytoplasmique, d'autres sont sécrétées. Leur synthèse est modulée dans les cellules cancéreuses. Celle du CEA, prototype de la famille, y est augmentée, ce qui en fait un marqueur de tumeur utilisé depuis trente ans en oncologie et un outil pour de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. La glycoprotéine biliaire (BGP), un autre membre de la famille, diminue dans les tumeurs et pourrait agir en suppresseur de tumeur. Ces deux protéines sont impliquées dans l'adhérence cellulaire, fonction en partie responsable de la réorganisation tissulaire au cours de la période embryonnaire. Les protéines spécifiques de la grossesse (PSG) appartiennent aussi à cette famille; présentes dans les cellules trophoblastiques du placenta, elles servent de marqueurs d'anomalies pendant la période de la grossesse.

ADRESSE

S. Létourneau: boursière du Fonds de la recherche en santé du Québec et de la Faculté de médecine de l'Université McGill. N. Beauchemin: chercheuse senior du Fonds de la recherche en santé du Québec. Centre de cancérologie McGill et département de biochimie, Université McGill, 3655, rue Drummond, Montréal, H3G 1Y6, Canada.

En 1965, Phil Gold et Samuel Freedman, de l'université McGill, découvrirent une protéine de haut poids moléculaire, fortement glycosylée, qu'ils nommèrent antigène carcino-embryonnaire (CEA). Cette protéine est synthétisée abondamment dans les tumeurs du côlon et dans le côlon fœtal et on la retrouve en faible concentration dans le côlon adulte normal [1]. Comme le CEA est surexprimé jusqu'à 60 fois dans les tumeurs du côlon et se trouve libéré dans le sérum, sa concentration sérique est utilisée cliniquement

pour le suivi thérapeutique des patients cancéreux [2].

On sait maintenant qu'il existe chez l'homme plusieurs protéines très similaires au CEA. L'analyse des structures primaires et secondaires de ces protéines permet de mettre en lumière leurs points communs (*figure 1*). Elles sont constituées d'un domaine aminoterminal, de 108 à 110 acides aminés, similaire aux domaines variables des immunoglobulines, et d'un certain nombre de domaines (nommés A_n : 92 acides aminés et B_n : 86 acides aminés), analogues des domaines constants des immunoglobulines. Le nombre de

RÉFÉRENCES

1. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-81.
 2. Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991; 5: 344-66.
 3. Hauck W, Stanners CP. Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 3602-10.
 4. Hauck W, Nédellec P, Turbide C, Stanners CP, Barnett TR, Beauchemin N. Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, a CEA gene family member down-regulated in colorectal carcinomas. *Eur J Biochem* 1994; 223: 529-41.
 5. Nap M, Mollgard K, Burtin P, van Fleuren G. Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumor Biol* 1988; 9: 145-53.
 6. Jothy S, Yuan SY, Shirota K. Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 250-7.
 7. Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, Fuks A, Stanners CP. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 3221-30.
 8. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989; 57: 327-34.
 9. Oikawa S, Inusuka C, Kuroki M, Arakawa F, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains. *J Biol Chem* 1991; 266: 7995-8001.
 10. Zhou H, Fuks A, Alcaraz G, Bolling TJ, Stanners CP. Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J Cell Biol* 1993; 122: 951-60.
 11. Leusch HG, Hefta SA, Drzeniek Z, Hummel K, Markos-Pusztai Z, Wagener C. *Escherichia coli* of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). *FEBS Lett* 1990; 261: 405-9.
 12. Eidelman F, Fuks A, DeMarte L, Taheri M, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of myoblasts. *J Cell Biol* 1993; 123: 467-75.
 13. Wagner HE, Toth CA, Steele GD, Thomas P. Metastatic potential of human colon cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and carcinoembryonic antigen production. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10: 25-31.
- domaines constants des immunoglobulines varie de 0 (CGM7) à 6 (CEA). Le domaine extracellulaire de ces protéines est fortement glycosylé (CEA: 28 sites de glycosylation liés à l'asparagine, BGP: 16 sites de glycosylation) [2]. La famille des gènes CEA fait donc partie de la superfamille des gènes des immunoglobulines. Cette superfamille code, entre autres, pour les immunoglobulines, les récepteurs de l'antigène des lymphocytes T et des molécules d'adhérence intercellulaire telles que N-CAM (*neural-cell adhesion molecules*) [2].
- Ces protéines proviennent de la transcription de 29 gènes formant la famille des gènes CEA (trois sont des pseudogènes). Ces gènes peuvent être divisés en deux sous-groupes (*figure 1*). Le premier groupe, de neuf membres, produit des protéines liées à la surface cellulaire par un lien phosphatidyl inositol (CEA) ainsi que des protéines membranaires possédant un domaine cytoplasmique (glycoprotéine biliaire, BGP). Le second groupe, qui comprend 17 membres collectivement appelés PSG (*pregnancy-specific glycoproteins*), produit des protéines sécrétées. Les gènes de chaque sous-groupe présentent de 80 % à 95 % d'identité entre eux, alors que les sous-groupes n'ont que 65 % à 75 % d'identité entre eux [2].
- Chez l'homme, les gènes de la famille CEA sont regroupés sur le bras long du chromosome 19, dans la région 19q13.1-19q13.3 (*figure 2*). La sous-famille des gènes PSG est regroupée dans la partie distale de cette région. Les gènes BGP et PSG ont été retrouvés chez l'homme, les primates, le rat et la souris alors que le gène CEA se retrouve chez l'homme et les primates seulement. Des études de comparaison par ordinateur simulant l'évolution ont montré que la famille CEA provient de l'amplification d'un gène primordial (probablement très similaire à BGP), qui a donné naissance, assez tôt dans l'évolution des mammifères, à la branche PSG de la famille, et, plus tard, au gène CEA et aux membres de la famille liés à la membrane par un lien phosphatidyl inositol [2].
- L'organisation génomique est bien conservée au sein de la famille CEA (*figure 3*). La structure prototypique est constituée d'un premier exon qui comprend une région 5' non traduite (5'NT) et environ les deux tiers de la région leader (L; traduite, celle-ci permet l'introduction de la protéine dans le réticulum endoplasmique et sera clivée au cours de la maturation de la protéine). Le deuxième exon est composé du reste de la région leader et de la région amino-terminale (N). Suivent un nombre variable d'exons, chacun codant pour un domaine A ou B. On trouve ensuite, soit un domaine permettant le lien lipidique à la membrane (M), soit un domaine transmembranaire (TM) suivi d'exons comprenant les domaines cytoplasmiques (Cyt), soit, pour les protéines sécrétées, un domaine carboxy-terminal (C), le tout suivi d'exons comprenant la région 3' non traduite (3'NT). L'épissage alternatif du gène BGP permet la synthèse de plusieurs isoformes (12 chez l'homme), variant tant par le nombre de domaines immunoglobulines dans leur portion extracellulaire que par la séquence de leur domaine cytoplasmique [2].
- L'analogie entre les gènes de la famille CEA se reflète aussi dans leurs promoteurs: les 500 pb en amont du site de début de la transcription ont environ 70 % d'identité. La similitude (79 %) entre les promoteurs de BGP et CEA s'étend jusqu'à 1 100 pb en amont du site de début de la transcription. Les promoteurs des gènes de la famille CEA sont dépourvus de boîtes TATA ou CAAT classiques. En revanche, les différents membres de la famille ont des profils d'expression différents, et ces différences sont réglées en partie au niveau transcriptionnel. En effet, de longues portions des promoteurs, en amont des régions analogues, sont différentes entre elles. Plusieurs facteurs de transcription interagissent avec le promoteur de chacun de ces gènes (CEA: USF et Sp1; BGP: USF et HNF-4) [3, 4]. Il est donc probable qu'au cours de l'évolution, ces protéines, relativement semblables au niveau de leur structure, aient développé des fonctions différentes, nécessitant des localisations tissulaires différentes. En revanche, les promoteurs, assez conservés dans certaines régions, sont très dissemblables dans d'autres, permettant ainsi des modes d'expression différents.

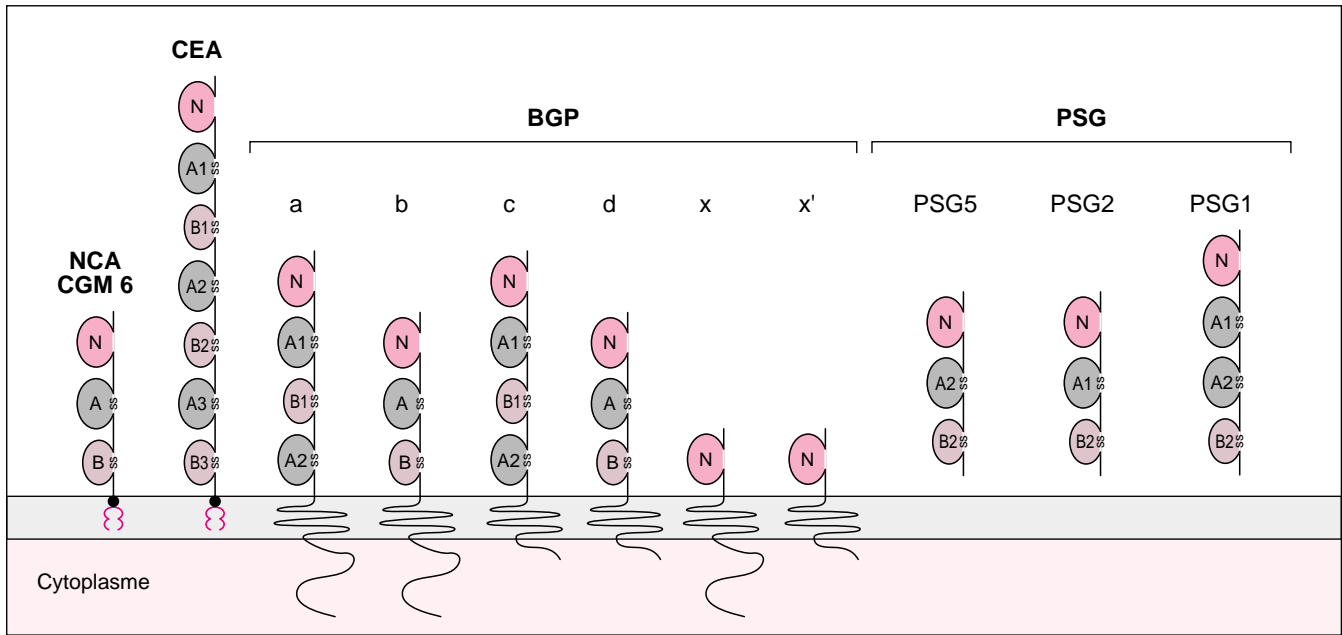


Figure 1. **Représentation schématique des protéines de la famille CEA.** Sont représentés NCA et CGM6, CEA, six isoformes de BGP et trois des protéines PSG. Ces protéines sont constituées de domaines immunoglobulines de type variable (N) et constants (A et B). Les CEA, NCA et CGM6 sont ancrés à la membrane par un lien lipidique alors que les BGP ont des domaines cytoplasmiques. Les PSG sont sécrétées.

Nous nous pencherons plus particulièrement, après ce bref survol de la famille des gènes *CEA*, sur trois de ses membres codant pour le CEA, la BGP et enfin les PSG.

L'antigène carcino-embryonnaire (CEA)

Le CEA, prototype de la famille, est une protéine d'environ 180 à 200 kDa. Près de 60 % de son poids moléculaire est constitué d'hydrates de carbone. La fonction physiologique de cette protéine reste encore imprécise. Nous présenterons ici l'antigène carcino-embryonnaire en décrivant son mode de synthèse, ses fonctions connues et ses utilisations cliniques possibles.

Chez l'adulte, cette protéine est synthétisée principalement dans certaines portions du tube digestif. On la retrouve à la surface apicale des cellules de l'épithélium de la langue, de la portion distale de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du côlon et du rectum [5]. Le CEA est présent à la surface des microvillosités des cellules cylindriques d'absorption et des cellules à gobelet de l'intestin grêle et du côlon ainsi que

dans le mucus produit par ces cellules [6]. L'épithélium du côlon forme des cryptes au fond desquelles se trouvent des cellules progénitrices qui prolifèrent activement pour renouveler l'épithélium et cela, même pendant la vie adulte. La synthèse du CEA dans ces cellules est faible. Plus haut dans la crypte et à la surface de l'épithélium, la synthèse du CEA augmente. Dans des conditions normales, chez l'adulte, cette glycoprotéine est toujours présente à la surface apicale des cellules épithé-

liales; on ne la retrouve pas au niveau de la membrane basolatérale [6].

L'antigène carcino-embryonnaire apparaît chez le fœtus vers la 9^e semaine, dans le duodénum et le côlon [5]. Son mode de synthèse durant le développement est semblable à celui retrouvé chez l'adulte. Il est intéressant toutefois de remarquer qu'au moment où cet antigène commence à être synthétisé dans l'épithélium du côlon, celui-ci n'est pas encore stratifié. Cette protéine est alors présente sur toute la surface

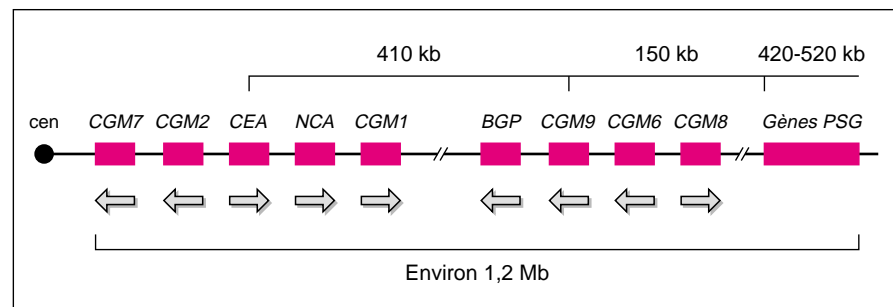


Figure 2. **Représentation du locus de la famille de gènes CEA sur le bras long du chromosome 19.** CEA : antigène carcino-embryonnaire; CGM_n : CEA gene family member; NCA : normal crossreacting antigen; BGP : gène des glycoprotéines biliaires; PSG : gènes des glycoprotéines spécifiques à la grossesse. Les flèches indiquent l'orientation transcriptionnelle.

RÉFÉRENCES

14. Hashino J, Fukuda Y, Oikawa S, Nakazato H, Nakanishi T. Metastatic potential of human colorectal carcinoma SW1222 cells transfected with cDNA encoding carcinoembryonic antigen. *Clin Exp Metastasis* 1994; 12: 324-8.
15. Toth, CA. Carcinoembryonic antigen binding proteins on elicited peritoneal macrophages. *J Leukocyte Biol* 1992; 51: 466-71.
16. Juweid M, Sharkey RM, Behr TM, Swayne LC, Dunn R, Ying Z, Siegel JA, Hansen HJ, Goldenberg DM. Clinical evaluation of tumor targeting with the anticarcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody fragment, MN-14 F(ab)₂. *Cancer* 1996; 78: 157-68.
17. McCuaig K, Turbide C, Beauchemin N. mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Diff* 1992; 3: 165-74.
18. Svenberg T. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile: Isolation and partial characterization. *Int J Cancer* 1976; 17: 588-96.
19. Beauchemin N, Lin SH. Role of C-CAM as a tumour suppressor. In: Stanners CP, ed. *Cell adhesion and communication*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: (sous presse).
20. Nédellec P, Turbide C, Beauchemin N. Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein 1 gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *Eur J Biochem* 1995; 231: 104-14.
21. Nédellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA, Holmes KV, Beauchemin N. *Bgp2*, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol* 1994; 68: 4525-37.
22. Frängsmyr I, Baranov V, Prall F, Yeung MMW, Wägener C, Hammarström S. Cell- and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 1995; 55: 2963-7.
23. Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Öbrink B. Trophectoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts. *Development* 1987; 100: 653-60.
24. Daniels E, Létourneau S, Turbide C, Kuprina N, Rudinskaya T, Yazova, AC, Holmes KV, Dveksler GS, Beauchemin N. Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption and myogenesis. *Dev Dynamics* 1996; 206: 272-90.
- de la membrane cellulaire. La structure épithéliale unistratifiée et les microvillosités n'apparaîtront qu'au cours du second trimestre du développement embryonnaire et coïncideront avec la restriction du CEA au domaine apical de la cellule. On peut donc supposer un lien entre la localisation cellulaire du CEA et le degré de différenciation de la cellule. Cette corrélation sera renforcée par la synthèse du CEA dans les cellules cancéreuses.
- En 1987, notre équipe procéda au clonage de l'ADNc du CEA [7]. Cela permit l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans l'élucidation de ses fonctions. Le CEA étant localisé au niveau de la membrane cellulaire et faisant partie d'une superfamille dont plusieurs membres sont impliqués dans des processus de reconnaissance intercellulaire et d'adhérence, il était tentant de postuler que le CEA était une molécule d'adhérence intercellulaire. En 1989, le laboratoire de Clifford Stanners a montré que des cellules ovariennes de hamster (LR-73, dépourvues de CEA) transfectées avec l'ADNc du CEA forment des grappes de cellules alors que les cellules parentales restent isolées. La formation de ces grappes est inhibée de façon spécifique par des fragments Fab d'anticorps anti-CEA [8]. L'antigène carcino-embryonnaire est capable d'adhérence homotypique (CEA-CEA) et hétérotypique avec d'autres membres de la famille CEA (CEA-BGP, CEA-NCA) [9]. Des études ultérieures ont montré que les domaines du CEA impliqués dans l'adhérence sont les domaines amino-terminaux et A₃B₃, selon un modèle dénommé: « double réciprocité » (figure 4). Ce modèle fut confirmé par l'inhibition de l'adhérence en présence de peptides dérivés de ces domaines [10]. Les modulations de l'adhérence intercellulaire représentent un événement important du développement embryonnaire et de la tumorigenèse. Le mode de synthèse du CEA et sa capacité de relayer l'adhérence cellulaire *in vitro* suggèrent que le CEA jouerait un rôle dans ces phénomènes.
- Plusieurs souches de bactéries *E. coli* d'origine humaine adhèrent à la protéine CEA et à d'autres membres de la famille synthétisés dans le côlon (BGP, NCA) [11]. Il est possible que ces glycoprotéines soient impliquées dans la reconnaissance des bactéries présentes dans la lumière du côlon et donc, dans la régulation de la colonisation bactérienne de l'intestin.
- La surexpression du gène CEA correspond à des situations dans lesquelles les cellules sont moins différenciées, ce qui suggère un rôle pour le CEA dans le processus de la différenciation. Cette hypothèse a été vérifiée en étudiant l'effet de l'expression ectopique du gène CEA dans des cellules myoblastiques de rat (L6). Ces cellules peuvent se différencier *in vitro* en myotubes si l'on change la concentration des facteurs de croissance du milieu de culture. Les cellules myoblastiques L6 transfectées avec l'ADNc du CEA ne peuvent se différencier. Elles peuvent à nouveau se différencier si on inhibe l'adhérence cellulaire du CEA [12]. Il semble donc que cette inhibition de la différenciation des cellules L6 dépende de l'adhérence intercellulaire engendrée par le CEA.
- L'augmentation de la synthèse du CEA dans les tumeurs du côlon a été montrée par immunohistochimie, par hybridation *in situ* ou par cytométrie de flux. Une étude d'hybridation *in situ* quantitative de 16 cas d'adénocarcinomes du côlon montre une hausse de 2,6 fois de la transcription du CEA dans les cellules tumorales par rapport à celle du côlon normal. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie. En outre, la localisation apicale du CEA s'en trouve perturbée: on retrouve maintenant cette protéine sur toute la surface de la cellule ainsi que dans l'espace intercellulaire [6] (figure 5). Plusieurs hypothèses ont été formulées quant au rôle possible du CEA dans la tumorigenèse. La surexpression du gène CEA et la délocalisation cellulaire de son produit pourraient inhiber la différenciation cellulaire. Mais l'abondance du CEA pourrait aussi modifier les propriétés adhésives des cellules, favorisant la dissémination métastatique.
- Le potentiel de croissance de tumeurs primaires du côlon transplantées chez des souris immunologiquement déficientes est corrélé à la concentration sanguine du CEA du patient avant l'opération [13]. De plus, le potentiel métastatique d'une lignée cellulaire de carcinome colorectal humain

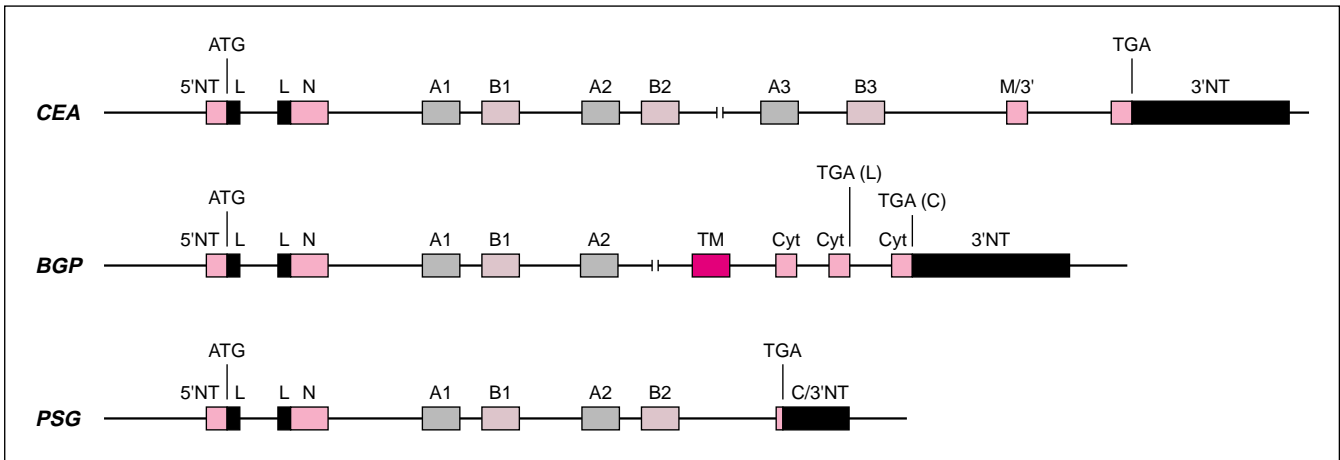


Figure 3. **Organisation génomique de trois des gènes de la famille CEA.** Les trois gènes présentent une étonnante conservation de leurs structures génomiques et même de leurs promoteurs proximaux respectifs. Les boîtes repré- sentent les exons codant pour les différents domaines des protéines. 5'NT: région 5' non traduite; L: région leader; N: région amino-terminale, analogue des domaines variables des immunoglobulines; A_n et B_n: domaines analogues des domaines constants des immunoglobulines; M: domaine permettant l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire par un lien lipidique; TM: domaine transmembranaire; Cyt: domaine cytoplasmique; C: domaine carboxy- terminal de la protéine sécrétée; 3'NT: région 3' non traduite; ATG: codon initiateur; TGA: codon de terminaison; TGA(C): codon de terminaison dans les transcrits codant pour BGP à domaine cytoplasmique court; TGA(L): codon de terminaison dans les transcrits codant pour BGP à domaine cytoplasmique long.

(SW1222), testé par injection intra- splénique chez des souris immunolo- giquement incompetentes, est aug- menté par la transfection de l'ADNc du *CEA* dans ces cellules [14]. La capacité d'agrégation des cellules tumorales est associée au potentiel métastatique, probablement parce que des grappes de cellules seront plus facilement immobilisées dans la microcirculation (figure 5). Le *CEA* favorise peut-être le développement des métastases par adhérence homo- typique. Par ailleurs, on trouve des récepteurs spécifiques du *CEA* sur les cellules de Kupffer dans le foie et sur les macrophages alvéolaires dans le poumon [15]. Le foie est l'un des sites les plus fréquents d'implanta- tion de métastases des tumeurs du côlon; il est possible que l'arrêt et l'implantation des cellules tumorales dans cet organe soient favorisés par la liaison du *CEA* à ces récepteurs. Le *CEA* jouerait donc un rôle important dans le processus métastatique par sa présence à la surface des cellules tumorales.

La concentration sanguine du *CEA* est généralement élevée chez les patients atteints de divers types de tumeurs: côlon, sein, poumon, ovaires, etc. Toutefois, comme la

concentration de *CEA* dans le sérum est également élevée dans d'autres situations, par exemple chez les fumeurs et dans les cas de cirrhose alcoolique, on ne peut utiliser ce cri- tère pour le dépistage des tumeurs. En revanche, une fois la tumeur dia- gnostiquée, le *CEA* devient un bon marqueur de l'évolution de la mala- die. Cliniquement, il est utilisé après l'intervention chirurgicale comme indicateur de récurrence locale de la tumeur ou lors de l'apparition de métastases. On exploite depuis une trentaine d'années cette propriété du *CEA* dans le suivi des patients cancé- reux [2].

La présence de *CEA* sur les cellules tumorales est aussi utilisée pour déve- lopper d'autres méthodes diagnos- tiques et thérapeutiques potentielles. Par exemple, des anticorps monoclo- naux anti-*CEA* marqués par ¹³¹I sont utilisés à faible dose en immunoscinti- graphie pour repérer les tumeurs pri- maires ou les métastases (sensibilité: 86%) ou, à plus forte dose, pour trai- ter la tumeur irradiée [16]. Ces nou- velles méthodes sont prometteuses.

Le *CEA* semble avoir, chez l'homme, plusieurs fonctions importantes qu'il serait plus facile de pouvoir étudier dans un modèle animal. Après avoir

cloné l'ADNc du *CEA*, notre groupe tenta de trouver l'analogue du gène *CEA* chez la souris. Un tel gène ne fut jamais trouvé et n'existe probable- ment pas. Cette absence du *CEA* fut aussi constatée chez le rat et il semble que seuls les primates expri- meraient un analogue du *CEA* bien qu'aucun gène de cette famille n'ait encore été caractérisé dans ces espèces. Des lignées de souris trans- géniques exprimant le gène complet du *CEA* ont récemment été créées; l'expression du *CEA* chez ces mam- mifères n'a donné lieu à aucune mal- formation évidente, ni à aucun défi- cit immunitaire chez l'animal. Il semble que la synthèse de cette pro- téine soit généralement bien tolérée dans ce système. Ce nouveau modèle animal est donc maintenant utilisé pour le développement de vaccins anti-*CEA* et pour l'évaluation de thé- rapies visant le ciblage spécifique des tumeurs produisant le *CEA*.

La glycoprotéine biliaire (BGP)

En revanche, chez la souris, un autre membre de la famille du *CEA* fut découvert; il s'agit de *Bgp1*, l'ana- logue du gène *BGP* humain [17]. A

RÉFÉRENCES

25. Rosenberg M, Nédellec P, Jothy S, Fleischer D, Turbide C, Beauchemin N. The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 4938-45.

26. Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10744-8.

27. Kleinerman DI, Troncoso P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh JT. Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 1995; 55: 1215-20.

28. Sippel CJ, Fallon RJ, Perlmutter D. Bile acid efflux mediated by the rat liver canalicular bile acid transport/Ecto-ATPase protein requires serine 503 phosphorylation and is regulated by tyrosine 488 phosphorylation. *J Biol Chem* 1994; 269: 19539-45.

29. Dveksler GS, Pensiero MN, Dieffenbach CW, Cardellicchio CB, Basile AA, Elias PE, Holmes KV. Mouse coronavirus MHV-A59 and blocking anti-receptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor MHVR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1716-20.

30. Kunath T, Ordonez C, Turbide C, Beauchemin N. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 1995; 11: 2375-82.

31. Hsieh JT, Luo W, Song W, Wang Y, Kleinerman DI, Van NT, Lin SH. Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res* 1995; 55: 190-7.

32. Edlund M, Blikstad I, Öbrink B. Calmodulin binds to specific sequences in the cytoplasmic domain of C-CAM and down-regulates C-CAM self-association. *J Biol Chem* 1996; 271: 1393-9.

33. Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* 1997 (sous presse).

34. Kleinerman DI, Zhang WW, Lin SH, Van NT, von Eschenbach AC, Hsieh JT. Application of a tumor suppressor (C-CAM1)-expressing recombinant adenovirus in androgen-independent human prostate cancer therapy: a preclinical study. *Cancer Res* 1995; 55: 2831-6.

35. Chan WY. The pregnancy-specific β 1 glycoprotein family. *Adv Contr Deliv Syst* 1991; 7: 21-52.

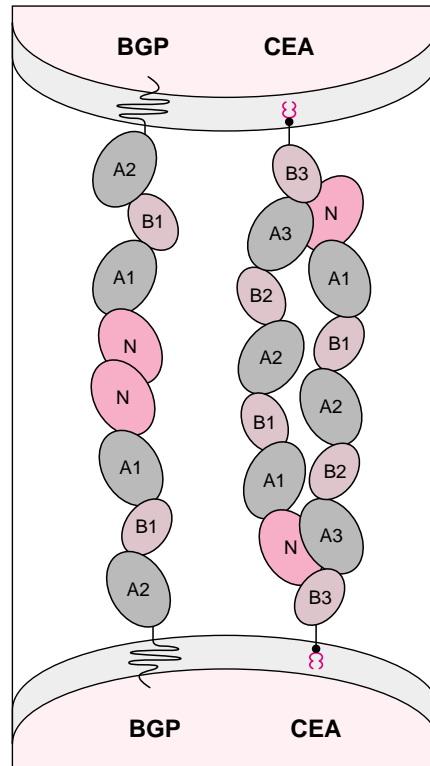


Figure 4. **Domaines d'adhérence de CEA et de BGP.** Les domaines du CEA impliqués dans l'adhérence cellulaire sont les domaines amino-terminaux et A_3B_3 selon un mécanisme de double réciprocité. Seuls les domaines amino-terminaux de BGP sont impliqués dans cette fonction.

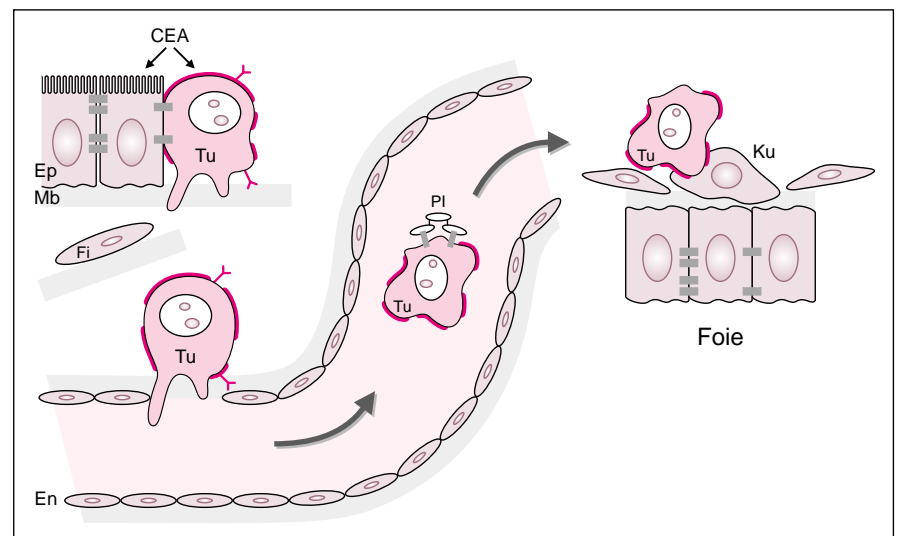


Figure 5. **Schéma illustrant le rôle de CEA dans le processus métastatique.** Le CEA est synthétisé sur le glycocalyx de cellules épithéliales normales, mais se retrouve sur toute la surface de la cellule tumorale. Cette cellule tumorale infiltre un capillaire, circule jusqu'à son point d'ancrage et adhère à une cellule du foie, peut-être à l'aide d'un récepteur spécifique du CEA. Ep: cellules épithéliales; Mb: membrane basale; Fi: fibroblaste; En: cellules endothéliales; Tu: cellules tumorales; PI: plaquettes; Ku: cellule de Kupffer.

l'origine, la protéine BGP fut identifiée comme un antigène montrant une réaction croisée avec les anticorps anti-CEA. Ce nouvel antigène était présent dans la bile, d'où son nom de glycoprotéine biliaire [18]. Simultanément, d'autres laboratoires purifiaient une protéine responsable de l'agrégation des hépatocytes, une protéine des hépatocytes possédant une activité ecto-ATPase et une protéine responsable du transport des acides biliaires dans les hépatocytes. Quand les ADNc de ces protéines furent clonés, on s'aperçut qu'il s'agissait de la même entité. Cela explique la multiplicité des noms associés à la BGP dans la littérature (Bgp, C-CAM, HA4, ecto-ATPase, pp120, CD66) [19].

Un seul gène *BGP* existe chez l'homme. Cependant, chez la souris, on trouve trois gènes de type *BGP*, dont deux sont très semblables au gène *BGP* humain au niveau de leur structure génomique et de la séquence des acides aminés de leurs produits [20, 21]. Chez le rat, un seul analogue du gène *BGP* humain est connu (*C-CAM*) [19].

La protéine BGP est le seul membre de la famille CEA possédant des domaines cytoplasmiques. Plusieurs isoformes sont produites par épissage alternatif. Ces isoformes varient selon le

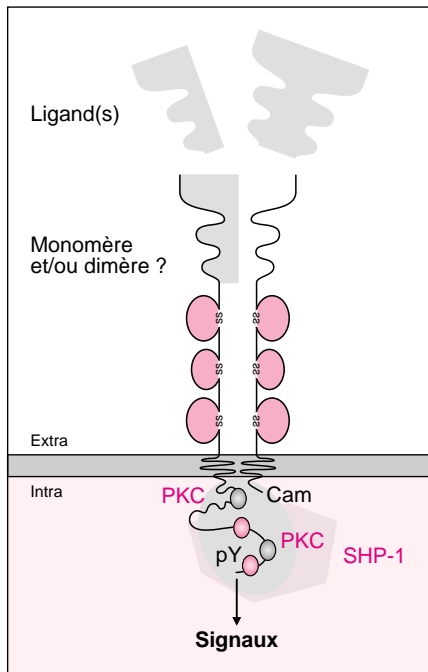


Figure 6. **Modèle illustrant le mécanisme possible de transmission de signal par BGP.** BGP pourrait reconnaître son (ses) ligand(s) sous forme monomérique ou en s'associant en dimères. Les ligands de BGP seraient eux-mêmes présentés soit à la surface d'autres cellules (non illustré) ou sécrétés par ces cellules. Ils se lieraient au récepteur BGP en monomères ou en dimères. Cette liaison ligand-récepteur pourrait induire des changements conformationnels conduisant à la phosphorylation du domaine cytoplasmique (pY, PKC) et à l'association à des protéines cytoplasmiques telles la calmoduline (Cam) et la tyrosine phosphatase (SHP-1), entraînant potentiellement l'activation cellulaire (signaux).

pY: phosphotyrosine; PKC: protéine kinase C.

nombre de leurs domaines constants immunoglobulines et la taille de leurs domaines cytoplasmiques. Ces derniers sont composés de 10 ou 71-73 acides aminés. Toutes les isoformes comportent un domaine amino-terminal (domaine immunoglobuline variable) (figure 1). La structure intron/exon ainsi que le mode d'épissage sont conservés entre les espèces. Les domaines cytoplasmiques sont cependant les plus conservés, ce qui suggère qu'ils rempliraient une fonction importante [19].

La synthèse de BGP a été étudiée chez l'homme, la souris et le rat, dans les tissus adultes et embryonnaires et dans les tumeurs. On a observé une excellente concordance dans les modes de synthèse entre les espèces. Deux observations générales se dégagent: BGP est présente du côté apical des cellules épithéliales et à la surface des cellules du système hématopoïétique. On retrouve cette protéine dans le côlon, du côté apical des cellules d'absorption et dans le glycocalyx luminal se trouvant à leur surface [22]. On la retrouve également dans les cellules de l'épithélium endométrial où sa synthèse est réglée par les œstrogènes et la progestérone, dans l'épithélium de la prostate, où sa production est réglée par les androgènes, du côté canaliculaire des hépatocytes et du côté apical des cellules des tubules rénaux. BGP est, en outre, présente sur la face luminale des cellules endothéliales des capillaires, des artéioles et des veinules. De nombreux types de cellules sanguines synthétisent BGP: mégacaryocytes, plaquettes, leucocytes polymorphonucléaires et mononucléaires, macrophages, lymphocytes B et T activés. Sa fonction dans ces cellules est encore inconnue [19].

La protéine BGP est synthétisée de façon très dynamique au cours du développement. Chez le rat, l'analogue de BGP est synthétisé à la surface de la blastula avant l'implantation, mais disparaît au moment de l'implantation [23]. Chez la souris, notre laboratoire a montré que l'embryon ne synthétise pas Bgp1 au moment de la gastrulation alors que les tissus extra-embryonnaires la synthétisent abondamment. Bgp1 apparaît dans l'embryon de souris à 8,5 jours *post-coïtum* (dpc) dans l'épiderme et sa synthèse y est maintenue jusqu'à la naissance. Vers 10,5 dpc, Bgp1 apparaît dans l'épithélium du tube digestif primitif. Le mode de synthèse de Bgp1 pendant le développement suggère que cette protéine exercerait un rôle dans les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme de plusieurs tissus (méninges, poumons, reins, pancréas, glandes salivaires) et dans la myogenèse, pendant la formation des myotubes secondaires. La synthèse de BGP dans le foie fœtal survient

tardivement (15,5 dpc chez le rat) et reste faible jusqu'à la naissance, où elle augmente rapidement [19]. La synthèse de BGP durant le développement embryonnaire indique que cette protéine joue un rôle important bien qu'encore imprécis dans l'homéostasie fœtale [24]. Ce rôle devrait être précisé prochainement chez des souris ayant subi une inactivation du gène *Bgp1*.

Alors que l'expression du gène *Cea* est généralement augmentée dans les tumeurs du côlon, celle du gène *Bgp* est abolie dans plusieurs lignées de cellules tumorales de côlon et dans les tumeurs primaires de côlon de souris. Nous avons montré que la baisse de la synthèse de Bgp1 chez la souris est un événement précoce durant la carcinogenèse; les tumeurs du côlon de stade A en sont déjà dépourvues [25]. De même, chez l'homme, l'examen de 21 tumeurs primaires du côlon a révélé que 80 % de ces tumeurs exprimaient peu ou pas le gène *BGP* [26]. L'expression de *BGP* est également diminuée dans la prostate hyperplasique et précancéreuse [27]. Les carcinomes de prostate modérément et peu différenciés ne produisent pas de BGP, contrairement aux glandes normales. Une diminution significative de la synthèse de BGP a aussi été constatée dans les carcinomes du foie. L'expression du gène *BGP* est donc inhibée dans plusieurs types de tumeurs [19]. Tout comme le CEA, la BGP fonctionne *in vitro* comme une molécule d'adhérence intercellulaire homotypique et est capable d'adhérence hétérotypique avec d'autres membres de la famille CEA. Le domaine d'adhérence de BGP est le domaine amino-terminal, et cette adhérence semble indépendante de son domaine cytoplasmique [19] (figure 4).

Le transport des acides biliaires du sang vers le canalicule biliaire s'effectue en deux étapes: d'abord du sang vers l'intérieur de l'hépatocyte, ensuite de l'hépatocyte vers la lumière du canalicule. La protéine BGP serait impliquée dans cette dernière étape du transport biliaire. La transfection du gène codant pour l'isoforme à domaine cytoplasmique long de BGP dans des cellules hétérologues leur confère un potentiel d'efflux d'acides biliaires [28]. De plus, des anticorps anti-BGP inhibent le trans-

port des acides biliaires dans des vésicules de membrane de canalicules biliaires. Ces résultats suggèrent que la BGP serait associée au transport biliaire dans les hépatocytes. N'ayant qu'un seul domaine transmembranaire, le mécanisme pourrait impliquer l'association de BGP en homodimères ou en hétérodimères avec d'autres protéines [19].

Bgp1 est aussi le récepteur des virus de l'hépatite chez la souris. Cette fonction de Bgp1 dépend de la présence de son domaine amino-terminal [29]. Cela montre qu'*in vivo* Bgp1 peut agir dans un système récepteur-ligand pour une protéine de la capsid virale. Un ou plusieurs ligands physiologiques de Bgp1 pourraient donc exister dans certaines cellules.

La diminution de la synthèse de BGP dans plusieurs types de cellules tumorales a suscité des études visant à déterminer le potentiel de suppression tumorale de cette protéine. Nous avons inséré, soit l'isoforme à domaine cytoplasmique long, soit l'isoforme à domaine cytoplasmique court de Bgp1 dans des cellules de carcinome du colon de souris (CT51, normalement dépourvues de Bgp1). Lors d'injections sous-cutanées dans des souris syngéniques immunocompétentes, seules les cellules CT51 transfectées avec l'isoforme à domaine cytoplasmique long voyaient leur potentiel de formation de tumeurs diminué (70 %-80 % d'inhibition) [30]. Le même phénomène a été montré de façon très convaincante pour les cellules tumorales prostatiques humaines [31] et pour les cellules humaines de carcinome du sein [19]. Il semble donc que BGP puisse agir comme un suppresseur de tumeur, et que cette fonction dépende de la présence du domaine cytoplasmique long mais non de la fonction d'adhérence intercellulaire de cette protéine.

Notre groupe travaille maintenant à l'élucidation de la transmission intracellulaire du signal dépendant de BGP. L'isoforme de BGP possédant un domaine cytoplasmique long est particulièrement intéressante. Certaines des fonctions de BGP en dépendent (association au transport des acides biliaires [28], suppression de tumeur [30]), alors que d'autres n'en dépendent pas (adhérence).

Par ailleurs, ce domaine lie au moins trois protéines cytoplasmiques: la calmoduline [32], l'annexine VI [19] et une tyrosine phosphatase, SHP-1 [33] (*figure 6*). En outre, il contient plusieurs motifs connus dont un motif ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) et plusieurs motifs de phosphorylation par la protéine kinase C. La tyrosine 488 du motif ITIM devient phosphorylée dans plusieurs situations expérimentales: le transport des acides biliaires [28], l'internalisation du récepteur de l'insuline et l'activation des neutrophiles [19]. Les protéine tyrosine kinases Src, Lyn et Lck peuvent phosphoryler cette tyrosine *in vitro* [19]. Nous avons également montré que l'association de SHP-1 dépend de la phosphorylation de la tyrosine 488 [33]. SHP-1 est impliquée dans la transmission de signaux relayés par plusieurs récepteurs de surface des lymphocytes B. Bien que tous ces résultats suggèrent que BGP serait un récepteur impliqué dans la transmission de signal [33], aucun ligand n'a été fermement confirmé pour BGP; néanmoins, plusieurs protéines pourraient jouer ce rôle: une ou plusieurs des protéines du groupe des PSG, la sélectine E ou une protéine de la matrice extracellulaire (*figure 6*). Ces hypothèses sont à présent évaluées expérimentalement.

Des résultats encourageants ont été obtenus dans des essais précliniques visant à déterminer le potentiel de BGP en thérapie génique dans un modèle de cancer de la prostate. Les cellules humaines de carcinome de la prostate PC-3 ont pu être infectées par l'adénovirus, le vecteur de thérapie génique utilisé [34]. La présence de BGP dans les cellules PC-3 subsiste longtemps après l'infection (deux à trois semaines) et elle est détectée même après que le matériel génique du vecteur ne soit plus décelable dans les cellules. Des souris ayant reçu des cellules PC-3 parentales, tumorigènes, ont vu leurs tumeurs régresser pendant au moins deux semaines après avoir été traitées localement par ce vecteur contenant l'ADNc de BGP. Ces résultats préliminaires sont encourageants et indiquent que BGP pourrait être efficace en thérapie génique, au moins dans les cas de cancer de la prostate [34].

Les glycoprotéines spécifiques de la grossesse (PSG)

Les gènes PSG forment, parmi ceux de la famille CEA, le sous-groupe des gènes codant pour des protéines sécrétées (*figure 3*). Ce sous-groupe est constitué d'au moins 17 gènes. Pour les besoins de cet article, nous traiterons globalement des PSG.

Les protéines PSG furent d'abord caractérisées par leur présence dans le sérum maternel durant la grossesse [35]. On sait maintenant qu'elles sont synthétisées dans certaines cellules du placenta, des testicules, de l'intestin, de l'utérus, du système hématopoïétique, de la moelle osseuse et du foie fœtal [35]. Les fonctions des PSG comprendraient la modulation du système immunitaire maternel durant la grossesse et la stimulation de la croissance cellulaire [35]. Cliniquement, une élévation de la concentration sanguine des PSG est un indicateur de grossesse. La concentration de PSG dans le liquide amniotique est également révélatrice de certains désordres congénitaux du fœtus; une augmentation de la concentration est observée dans les cas de syndrome de Meckel et de trisomies 18 et 21 [35]. Par ailleurs, une augmentation de PSG dans le sérum et dans les cellules tumorales est observée dans les cas de tumeurs trophoblastiques (môles hydatiformes, choriocarcinomes), et dans les tumeurs du sein (quoique la concentration sanguine de PSG ne soit pas un indicateur fiable dans ce dernier cas).

Conclusion

Les protéines CEA et BGP, quoique codées par une même famille de gènes, n'ont certainement pas un rôle physiologique identique. Ces deux protéines sont synthétisées durant le développement embryonnaire, mais BGP est synthétisée plus précocement et dans un plus grand nombre de types de cellules. Bien que les protéines CEA et BGP soient synthétisées en tandem sur les cellules épithéliales du tube digestif, plusieurs observations indiquent que leurs fonctions sont différentes. D'abord, la BGP possède un domaine cytoplasmique s'associant à des pro-

téines intracellulaires alors que le CEA est lié à la surface membranaire par un lien lipidique. Ensuite, le CEA est augmenté dans les tumeurs alors que la BGP est diminuée. Ces deux glycoprotéines sont capables d'adhérence intercellulaire, mais par des mécanismes différents. Finalement, le CEA empêche la différenciation, alors que la BGP inhibe la prolifération tumorale, deux processus cellulaires qui ont tendance à s'opposer. L'évolution des espèces a engendré dans la famille de CEA une étonnante diversité de protéines et les particularités de chaque membre permettent la multiplicité de spécialisation ■

Remerciements

Nous tenons à remercier Serge Jothy pour de fructueuses discussions et corrections de même que le conseil des recherches médicales du Canada et la Société de recherches sur le Cancer Inc. pour le soutien financier des travaux de notre laboratoire.

TIRÉS À PART

N. Beauchemin.

Summary

Roles of carcinoembryonic antigens in tumor initiation and progression

The carcinoembryonic antigen (CEA) gene family belongs to the immunoglobulin gene superfamily. This family is divided in two protein subgroups, some of these proteins being membrane-bound while others are secreted. In this review, we will discuss CEA (the family prototype), the biliary glycoproteins (BGP) and the pregnancy specific antigens (PSG). CEA is a membrane-associated glycoprotein expressed mainly in the gut epithelium and is up-regulated in tumor cells. It has been used in the last thirty years as a tumor marker. It functions *in vitro* as a cell adhesion molecule and a differentiation inhibitor. BGP, a membrane-bound protein, is expressed in many types of epithelial and endothelial cells as well as in cells of the immune system. It is down-regulated in many carcinomas. BGP functions *in vitro* as a cell adhesion molecule and acts as a tumor suppressor which is presently tested for use in gene therapy. PSGs are mainly expressed by trophoblastic cells during pregnancy. These proteins are also overexpressed in many tumors of trophoblastic origin. The family of CEA proteins exhibit similarity of structure but disparity of functions and contribute to tumorigenesis and metastasis by different mechanisms.

L'Association
et troubles
apparentés

**FRANCE
ALZHEIMER**

attribuera en 1997
La bourse YVON LAMOUR
de 150 000 F

destinée à un chercheur non statutaire, français ou étranger, de niveau post-doctoral ou plus élevé, souhaitant travailler dans un laboratoire français ou étranger dans le domaine de la maladie d'Alzheimer ou des troubles apparentés.

Cette bourse est éventuellement renouvelable.

Le dossier de candidature, adressé par le laboratoire ou le service d'accueil, comprendra :

– Pour le chercheur :

- Un curriculum vitae, précisant son statut et ses ressources, en 1997 et 1998.

- Ses titres et travaux.
- La nature des recherches déjà effectuées et résultats obtenus (description 5 pages).

- La présentation du projet de recherche envisagé auquel sera affecté le candidat (5 pages).

– Pour le laboratoire ou le service d'accueil :

- Une lettre du responsable justifiant l'insertion du projet dans l'activité du laboratoire.

- La liste des publications du laboratoire (3 dernières années).

Les dossiers devront être remis en TROIS EXEMPLAIRES avant le 1^{er} mai 1997

Le lauréat sera désigné en juin 1997 par le Jury composé des membres du COMITÉ SCIENTIFIQUE de l'Association.

Pour le retrait des dossiers de candidature et tous renseignements, s'adresser à :

FRANCE ALZHEIMER
21, boulevard Montmartre
75002 PARIS
Tél. : 01 42 97 52 41



INSTITUT COCHIN DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

XIV^e JOURNÉE

JEAN-CLAUDE DREYFUS

DE GÉNÉTIQUE ET DE PATHOLOGIE MOLÉCULAIRES

RÉCEPTEURS et MALADIES

RECEPTORS and DISEASES

Vendredi 19 septembre 1997

Grand Amphithéâtre de la Faculté de Médecine
Cochin Port-Royal
24, rue du Faubourg-St-Jacques
75014 PARIS, France