

CD44, invasion tumorale et métastase

Des variations d'épissage et des modifications post-traductionnelles diverses confèrent aux protéines de la famille CD44, bien que codées par un gène unique, une grande hétérogénéité. Ce sont des molécules d'adhérence aux multiples rôles. Elles participeraient à l'activation et à la domiciliation des lymphocytes T et B. Récepteurs de l'acide hyaluronique, certaines isoformes pourraient se trouver à l'origine de l'organisation des matrices extracellulaires. Elles semblent, enfin, impliquées dans les phénomènes migratoires et invasifs des cellules cancéreuses ; la mise en évidence de nouveaux variants d'épissage dans nombre de tumeurs humaines a renouvelé l'intérêt pour ces protéines.

Antoine Galmiche
Patrick Lustenberger

Le processus métastatique est caractérisé par l'acquisition par la cellule cancéreuse de propriétés originales en matière d'adhérence, d'induction d'activités protéasiques et de motilité [1].

Initialement mis en évidence dès 1980 à l'aide d'anticorps monoclonaux, le CD44 a finalement été défini par l'*International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens*. La démonstration d'identités structurales a permis de regrouper alors dans cette famille CD44 un certain nombre d'antigènes, comme Pgp-1, Ly-24, ECMRIII, gp^{90Hermes}, H-CAM, précédemment caractérisés de façon indépendante. D'emblée, cette protéine CD44 s'est vue attribuer différentes fonctions physiologiques, résultant des travaux précédents, à savoir un rôle dans le ciblage et l'activation des lymphocytes, et un rôle dans l'adhérence et la migration cellulaire. Au cours des dernières années, il est apparu que certaines étapes de la dissémination métastatique

constituaient un détournement des fonctions normales de certaines molécules du système immunitaire : l'étude de l'expression des isoformes de CD44 a permis de mettre en évidence une communauté d'emploi de molécules entre système immunitaire normal et cellule métastatique. Le clonage des gènes et l'identification d'isoformes variantes de CD44 associées au phénomène invasif et/ou métastatique ont suscité un regain d'intérêt pour cette famille de molécules [2, 3].

Les isoformes de CD44 : structure et analyse des transcrits

Les protéines de la famille CD44 sont des protéines intégrales qui proviennent d'un gène unique situé sur le bras court du chromosome 11 chez l'homme. Un épissage alternatif et des modifications post-traductionnelles importantes, notamment des glycosylations, sont à l'origine de l'hétérogénéité

ADRESSE

A. Galmiche : étudiant. P. Lustenberger : professeur de biochimie. Laboratoire de biochimie médicale, C/JF Inserm 90-11, Institut de Biologie, 9 quai Moncoussu, 44035 Nantes Cedex 01, France

néité considérable de masse moléculaire des isoformes de CD44, de 85 à plus de 200 kDa (Tableau I).

Trois types principaux d'isoformes ont été décrits [4-7] : la forme hématopoïétique (CD44H), la plus légère des isoformes – 80 à 100 kDa –, est retrouvée au niveau des cellules du système hématopoïétique et de plusieurs types cellulaires d'origine mésenchymateuse ; les isoformes épithéliales (CD44E1 et CD44E2) – 110 à 160 kDa – résultent de l'insertion de séquences additionnelles, respectivement de 135 et 69 acides aminés, dans la portion extracellulaire et sont retrouvées à la surface des épithéliums et de cellules de la lignée monocyttaire ; récemment, plusieurs isoformes « longues », ou « variants » de CD44 (souvent notés CD44v) – jusqu'à plus de 200 kDa – se sont vues impliquées dans la progression métastatique [6, 7] ; les séquences correspondantes ont pu être mises en évidence, chez le rat, à la surface de plusieurs cellules immunitaires après activation [8], et au niveau de la zone basale de l'épiderme ou de l'épithélium des cryptes intestinales [9].

Le séquençage des ADNc codant pour les diverses isoformes de CD44 a per-

mis de détailler leur structure générale (figure 1) [4-7]. Leur domaine extracellulaire comporte deux parties : du côté N-terminal, une séquence d'environ 135 acides aminés analogue à celle de la protéine de liaison du cartilage (*cartilage link*), commune à l'ensemble des isoformes de CD44, est impliquée dans la liaison de l'acide hyaluronique ; la partie juxta-membranaire constitue le site d'insertion des séquences variantes, spécifiques d'isoformes. Le domaine intracellulaire, carboxy-terminal, est probablement impliqué dans la liaison au cytosquelette et la transmission du signal en aval de CD44 [10]. Les domaines N et C-terminaux de CD44 ont une structure très conservée au cours de l'évolution. Le domaine intermédiaire, constituant le point d'insertion des exons variables, présente plus de variabilité de séquence.

L'épissage alternatif (figure 2) concerne à la fois la queue cytoplasmique et le domaine juxta-membranaire [11-13]. L'extrémité cytoplasmique de CD44 est présente sous deux formes : l'une, majoritaire, codée par une séquence de 210 pb, comportant 70 acides aminés ; l'autre codée par une séquence de

9 pb. La variabilité de séquence du domaine intermédiaire résulte de l'utilisation alternative de 10 exons (v1-v10). De l'utilisation contrôlée d'une série d'exons variants découlent les propriétés fonctionnelles de la molécule. On peut, à cet égard, noter la stricte régulation d'expression de certains de ces exons à l'échelle des divers tissus, permettant de présager l'existence de fonctions propres à chaque isoforme de CD44 : ainsi, chez la souris, l'exon v1 paraît presque exclusivement exprimé au niveau gastrique [13].

Plusieurs mécanismes de contrôle de l'expression de la protéine ont été mis en évidence dans divers types cellulaires, en particulier une régulation transcriptionnelle et un contrôle différentiel de la stabilité des messagers (plusieurs sites poly-A).

Les fonctions physiologiques de CD44 (Tableau II)

CD44 et régulation des réponses immunitaires

Plusieurs fonctions immunitaires de

Tableau I
CARACTÈRES STRUCTURAUX DES ISOFORMES DU CD44

		PM (kDa)	Nombre d'acides aminés	Sites N-glyc	Sites O-glyc	Sites GAG	Origine
Standard							
CD44H		80-100	341	6	9	4	Cellules hématopoïétiques Leucocytes, cellules d'origine mésodermique
Épithélial							
CD44E1	prédominant	130-160	476	7	17	5	Cellules épithéliales
CD44E2	rare	130-160	410	7	11	5	Cellules épithéliales Granulocytes, mononucléaires
Variable							
CD44M	v3-v10	variable 180-210	max 761 503	variable ≥ 6 9	variable ≥ 9 30	variable ≥ 4 6	Cellules carcinomateuses
CD44TR	pas de domaine cytoplasmique	70-90	274	6	9	4	Cellules hématopoïétiques
CD44SP		3	29	0	0	0	Pas de protéine correspondante détectée
Soluble							
SD44 sol		80-90 idem CD44 standard 130-160 idem variants CD44					Sérum

Les nombres de sites de N-glycosylation (N-glyc), O-glycosylation (O-glyc) et de liaisons aux glycosaminoglycans (GAG) sont hypothétiques, fondés sur la présence des sites consensus d'acides aminés.

RÉFÉRENCES

1. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993 ; 71 : 1368-83.
2. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993 ; 14 : 395-9.
3. Lesley J, Hyman R, Kinkade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993 ; 54 : 271-335.
4. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J* 1991 ; 10 : 343-8.
5. Jackson DG, Buckley J, Bell JI. Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 4732-9.
6. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991 ; 65 : 13-24.
7. Hofman M, Rudy W, Zoller M, et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 5292-7.
8. Arch R, Wirth K, Hofmann M, et al. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 1992 ; 257 : 682-5.
9. Wirth K, Arch R, Somasundaram C, et al. Expression of CD44 isoforms carrying metastasis-associated sequences in newborn and adult rats. *Eur J Cancer* 1993 ; 29A : 1172-7.
10. Lokeshwar VB, Bourguignon LYW. The lymphoma transmembrane glycoprotein GP85 (CD44) is a novel guanine nucleotide-binding protein which regulates GP85(CD44)-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 22073-8.
11. Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H. Splicing choice from ten exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 1993 ; 21 : 1225-9.
12. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 12160-4.
13. Sreaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 12235-8.

CD44 ont pu être mises en évidence. En premier lieu, le CD44 participe aux phénomènes de circulation leucocytaire : *in vitro*, CD44H semble impliqué dans la liaison des cellules T à l'endothélium dans plusieurs systèmes, en particulier les veinules post-capillaires (*high endothelial venules*) des plaques de Peyer [14]. Dans sa forme protéoglycane, chondroïtine sulfate surtout, CD44 est susceptible de présenter certaines cytokines chimiotactiques de la famille des chémokines (MIP-1 β), permettant ainsi l'adhérence de cellules T à l'endothélium [15]. *In vivo*, l'importance de CD44 dans les phénomènes migratoires a pu être étudiée chez la souris par transfert adoptif de cellules à la surface desquelles l'expression de CD44 avait été diminuée par un anticorps [16] : la molécule de CD44 semble requise pour l'extravasation leucocytaire au niveau des sites d'hypersensibilité retardée cutanée ; en revanche, l'entrée dans les organes lymphoïdes n'est pas modifiée [16]. La participation de CD44 à l'établissement d'une réaction inflammatoire d'intensité normale montre qu'elle est impliquée dans l'activation des cellules immunitaires initiatrices de l'inflammation et, peut-être, dans leur production de cytokines. Elle pourrait être le témoin de l'importance directe d'un ligand de CD44 dans l'extravasation leucocytaire.

L'expression de CD44 à la surface des immunocytes pourrait, d'autre part, régler plusieurs interactions susceptibles de constituer un signal accessoire dans l'activation T, en particulier l'interaction CD2-LFA3 [17]. CD44 pourrait participer à l'activation des lignées monocyttaire et lymphocytaire T [17] ; en surface des lymphocytes T à potentiel cytotoxique, CD44 peut transmettre un signal mettant en route le « programme » cytotoxique [18]. Dans sa forme chondroïtine-sulfatée, la chaîne invariante (Ii-CS), à la surface des cellules présentant l'antigène (CPA), semble susceptible d'interagir avec toutes ou partie des isoformes de CD44 à la surface des cellules T : en utilisant comme CPA une lignée de thymome transfectée avec un vecteur contenant Ii, Naujokas *et al.* [19] ont en effet pu mettre en évidence la participation (non indispensable) de l'interaction Ii-CS/CD44 à la stimulation d'une réponse proliférative allogé-

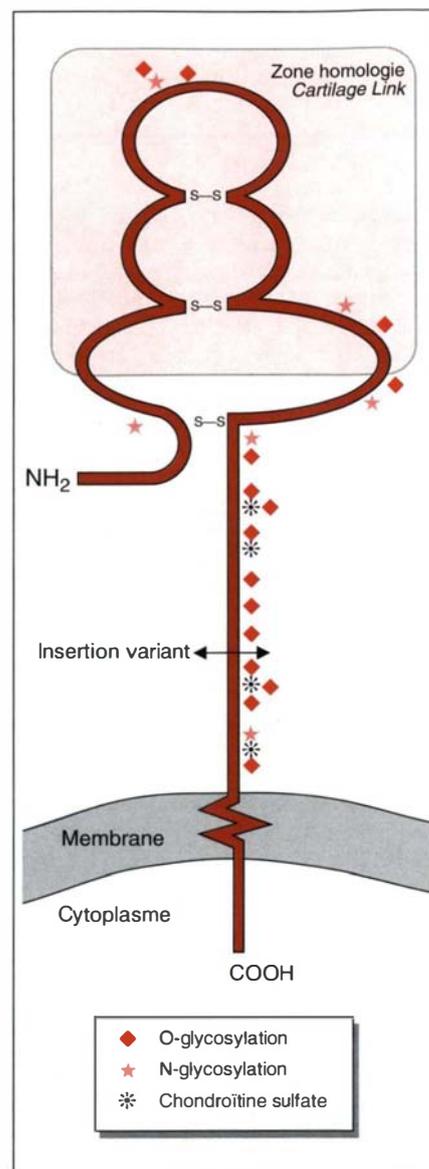


Figure 1. Représentation schématique de la protéine CD44 forme H. Protéine transmembranaire, sa partie C-terminale cytoplasmique comporte 72 acides aminés et le domaine membranaire 21 acides aminés. La partie extracellulaire est organisée en deux domaines : (1) côté N-terminal, une région homologue des régions cartilagineuses avec trois ponts disulfure ; (2) un domaine intermédiaire où se trouve le point d'insertion des séquences variantes. Cette partie comporte la majorité des sites potentiels de N- et O-glycosylation, ainsi que les sites d'attachement des enchaînements chondroïtine sulfatés (2 sites de part et d'autre du point d'insertion).

Tableau II

PRINCIPALES FONCTIONS BIOLOGIQUES DE CD44

- Adhérence intercellulaire et aux composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, acide hyaluronique, chondroïtine sulfate)
- Ciblage des lymphocytes
- Activation des lymphocytes T
- Transduction des signaux: interaction avec le système protéine G et modulation de la sécrétion de facteurs de croissance
- Liaison de l'acide hyaluronique et internalisation (renouvellement de la matrice)

nique. Il reste à identifier les isoformes de CD44 qui pourraient délivrer un signal accessoire au cours de l'activation T, et jouer ainsi un rôle dans l'activation de certaines réponses immunitaires. La mise en évidence par Arch *et al.* [8] de la participation des isoformes variantes longues (CD44v, comprenant l'exon v6) dans les réponses antigéniques primaires humorales (dépendantes ou non des cellules T), mais également cellulaires, pourrait signifier la participation de ces dernières isoformes à la présentation antigénique.

CD44 : récepteur de l'acide hyaluronique et organisateur de la matrice

CD44 appartient à la famille des hyaladhérines (Tableau III) [20]. Les diverses isoformes de CD44 ont des affinités différentes pour l'acide hyaluronique: après transfection dans des cellules Nalmwa (dérivées d'un lymphome de Burkitt), le CD44H standard présente une affinité importante pour l'acide hyaluronique, mais pas l'isoforme CD44E [4].

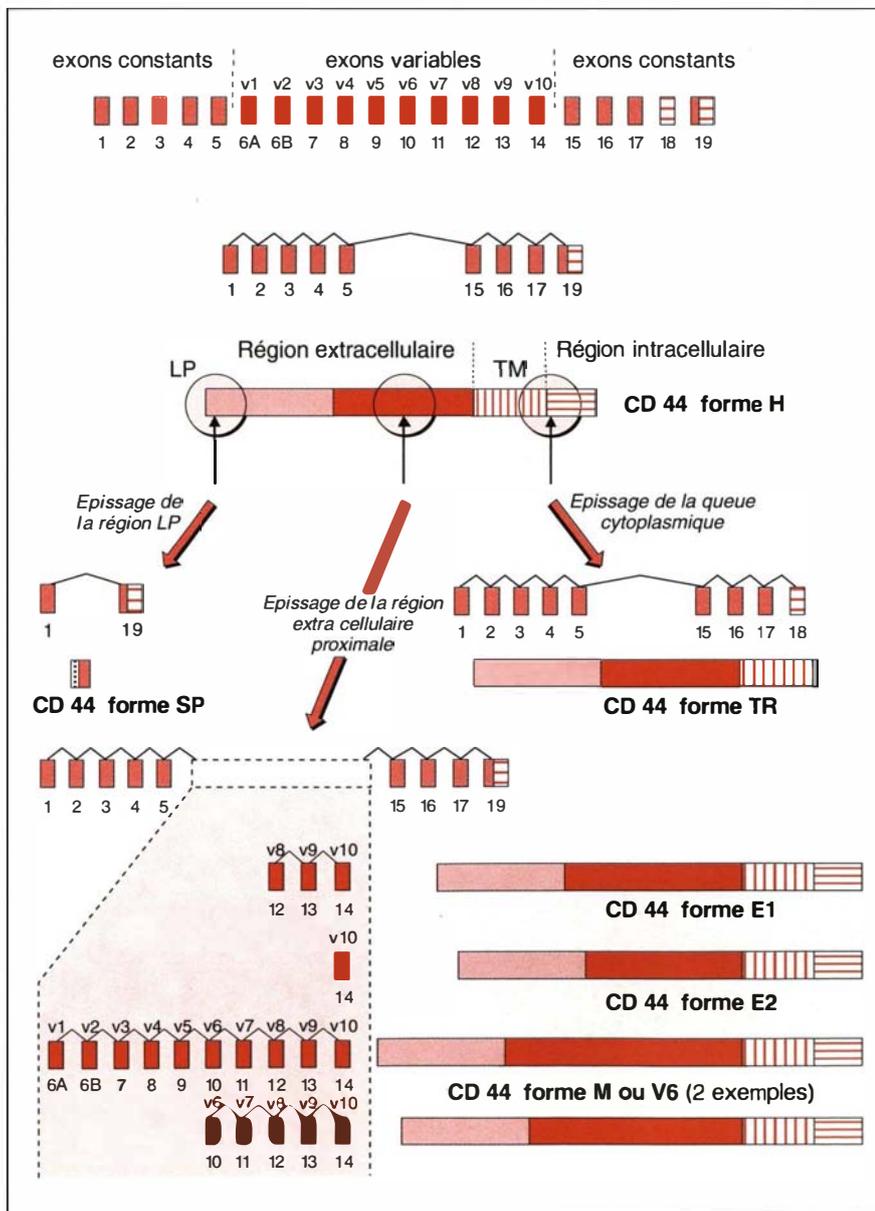


Figure 2. **Représentation schématique du gène du CD44 chez l'homme et expression différentielle.** Dans la partie supérieure, sont représentés l'organisation génomique et la traduction des exons constants aboutissant au CD44 forme H correspondant à la protéine dite normale. Dans la partie inférieure, les trois possibilités d'épissage sont détaillées. La protéine correspondant au variant CD44 forme SP, prévisible en fonction du site d'épissage au voisinage du peptide signal (leader peptide, LP), n'a pas encore été mise en évidence. Le variant TR, dépourvu de la partie intracellulaire de la protéine, possède des propriétés particulières. Les variants au niveau de la partie juxta-membranaire, nombreux en théorie, font l'objet des études en cours. Ils sont exprimés de façon normale dans certains tissus, mais également par certains tissus cancéreux. D'autres possibilités d'épissage, notamment de la région 3' non traduite, ont également été décrites.

RÉFÉRENCES

14. Hamann A. Mechanisms of lymphocyte traffic and cell targeting. *Int J Cancer* 1992 ; 7 Suppl : 19-23.
15. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 1993 ; 361 : 79-82.
16. Camp RL, Scheynius A, Johansson C, Puré E. CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 497-507.
17. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44 : a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989 ; 10 : 423-8.
18. Seth A, Gote L, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. T-cell-receptor-independent activation of cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes mediated through CD44 and gp90MEL-14. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7877-81.
19. Naujokas MF, Morin M, Anderson MS, Peterson M, Miller J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 1993 ; 74 : 257-68.
20. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 1993 ; 7 : 1233-41.
21. Lesley J, He Q, Miyake K, Hamann A, Hyman R, Kincade PW. Requirements for hyaluronic acid binding by CD44 : a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 257-66.
22. He Q, Lesley J, Hyman R, Ishihara K, Kincade PW. Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J Cell Biol* 1992 ; 119 : 1711-9.
23. Hathcock KS, Hirano H, Murakami S, Hodes RJ. CD44 expression on activated B cells. Differential capacity for CD44-dependent binding to hyaluronic acid. *J Immunol* 1993 ; 151 : 6712-22.
24. Murakami S, Shimabukuro Y, Miki Y, et al. Inducible binding of human lymphocytes to hyaluronate via CD44 does not require cytoskeleton association but does require new protein synthesis. *J Immunol* 1994 ; 152 : 467-77.
25. Lesley J, Kincade PW, Hyman R. Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur J Immunol* 1993 ; 23 : 1902-9.

Chez la souris, alors que pratiquement toutes les cellules hématopoïétiques ont du CD44 à leur surface, la capacité de lier l'acide hyaluronique apparaît strictement restreinte [21]. Des expériences de mutagenèse/transfection de CD44 ont permis de préciser les conditions dans lesquelles apparaît la liaison à l'acide hyaluronique : le contexte cellulaire, notamment le type de cellules transfectées, lymphomes B ou T, paraît capable de moduler la liaison [22]. Certaines modifications post-traductionnelles de CD44, comme la N-glycosylation, pourraient constituer d'autres modes de contrôle de l'adhérence à l'acide hyaluronique [23]. Enfin, dans plusieurs lignées cellulaires humaines, la synthèse de nouvelles protéines paraît indispensable à l'induction par les esters de phorbol des propriétés d'adhérence du CD44 à l'acide hyaluronique [24]. Au cours de l'activation des cellules B ou T, l'apparition de propriétés d'adhérence à l'acide hyaluronique dépend probablement au premier chef

du regroupement des molécules de CD44 [25]. Des données obtenues après transfection du CD44H humain dans la lignée Jurkat confirment l'importance du domaine cytoplasmique : les 52 acides aminés C-terminaux paraissent impliqués dans l'induction par les esters de phorbol de la liaison du CD44H à l'acide hyaluronique [26]. Les esters de phorbol pourraient enclencher le processus d'adhérence à l'acide hyaluronique en activant la protéine kinase C qui s'associe au domaine cytoplasmique de CD44.

Des chondrocytes en culture, en présence d'acide hyaluronique et de protéoglycane matriciels, assemblent autour d'eux une matrice péricellulaire ; Knudson *et al.* ont mis en évidence une aptitude semblable des cellules COS après transfection avec l'ADNc des isoformes CD44H ou CD44E [27]. L'isoforme CD44E, dans des conditions proches de celles rencontrées *in vivo* par les cellules CD44E+ de l'organisme, semble donc capable d'ad-

Tableau III
LES PROTÉINES INTERAGISSANT AVEC L'ACIDE HYALURONIQUE

Famille des hyaladhérines	Site de liaison de l'acide hyaluronique*	Tissus ou cellules d'origine
<i>Cartilage large proteoglycan</i> ou <i>agrecan</i>	2 sites	Cartilage
<i>Cartilage link protein</i>	2 sites	Cartilage
<i>Receptor for HA mediated motility</i> RHAMM	2 sites	Fibroblastes transformés
Hyaluronectine		Tissu nerveux
<i>Fibroblast large proteoglycan</i> ou <i>versican</i>	2 sites	Fibroblastes
<i>Hyaluronan binding protein</i> HABP	1 site	Cellules gliales
<i>Cell associated hyaluronan binding protein</i> HARC		Fibroblastes transformés
<i>TNF stimulated gene</i> TSG 6	1 site	Fibroblastes
CD44	2 sites	Cellules hématopoïétiques, épithéliales

* Séquence consensus B (X,) B où B est un résidu R ou K et X, comporte au moins un résidu basique et aucun résidu acide.

héer significativement à l'acide hyaluronique [27]. On peut ainsi penser que le regroupement induit par la reconnaissance des protéoglycanes matriciels ou d'autres glycoprotéines, pourrait constituer un signal déclenchant l'adhérence à l'acide hyaluronique des isoformes variantes de CD44.

Les techniques de mutagenèse dirigée ont été utilisées pour déterminer le ou les domaines impliqués dans la liaison à l'acide hyaluronique [28] : deux régions riches en acides aminés basiques ont été identifiées, l'une située en dehors de la zone d'analogie à la protéine *cartilage link*. Dans l'autre, située au sein de la zone d'analogie aux protéines de la famille des hyaladhérines, l'arginine en position 41 semble particulièrement critique. L'existence de cet acide aminé basique à cette position paraît d'ailleurs très conservée au sein de la famille des hyaladhérines [28]. Ces seules régions basiques suffisent probablement à permettre la liaison à l'acide hyaluronique.

Le travail de Knudson suggère qu'un ou plusieurs récepteurs de l'acide hyaluronique de la famille CD44 pourraient, *in vivo*, se trouver à l'origine de l'organisation de la matrice extracellulaire péricellulaire [27]. Alternative-ment, l'expression de CD44 module le taux de renouvellement de l'acide hyaluronique de la matrice [29]. Au cours du développement, une corrélation inverse est observée entre l'expression de CD44 à la surface des cellules du derme et la teneur en acide hyaluronique de la matrice au niveau du follicule pileux ; l'expression de CD44 pourrait constituer le signal induisant la condensation du derme [30].

En participant à l'organisation de la matrice extracellulaire et en réglant la composition en glycosaminoglycanes de type sulfatés chargés négativement, l'expression de CD44 pourrait, en retour, moduler la présentation aux cellules des facteurs de croissance et cytokines [31, 32].

CD44 et motilité cellulaire

A côté de son rôle dans l'organisation de la matrice, l'interaction CD44/acide hyaluronique semble intervenir dans la motilité cellulaire. Thomas *et al.* ont étudié la réponse migratoire de cellules mélanomateuses RPM-MC transfectées avec un ADNc codant pour CD44H ou CD44E en présence d'acide hyaluronique [33] ; seul CD44H semble être capable d'induire un comportement mobile. Ce comportement requiert à la fois la liaison de CD44H à l'acide hyaluronique et la présence du domaine cytoplasmique. Ce dernier n'étant pas indispensable pour la liaison à l'acide hyaluronique, il participe probablement à la réponse mobile par son association au cytosquelette [10]. Dans certaines situations, la réponse mobile des cellules à l'acide hyaluronique pourrait dépendre d'autres récepteurs que CD44 [34, 35] : cette réponse pourrait cependant se trouver orientée par CD44 du fait de l'organisation des protéo-

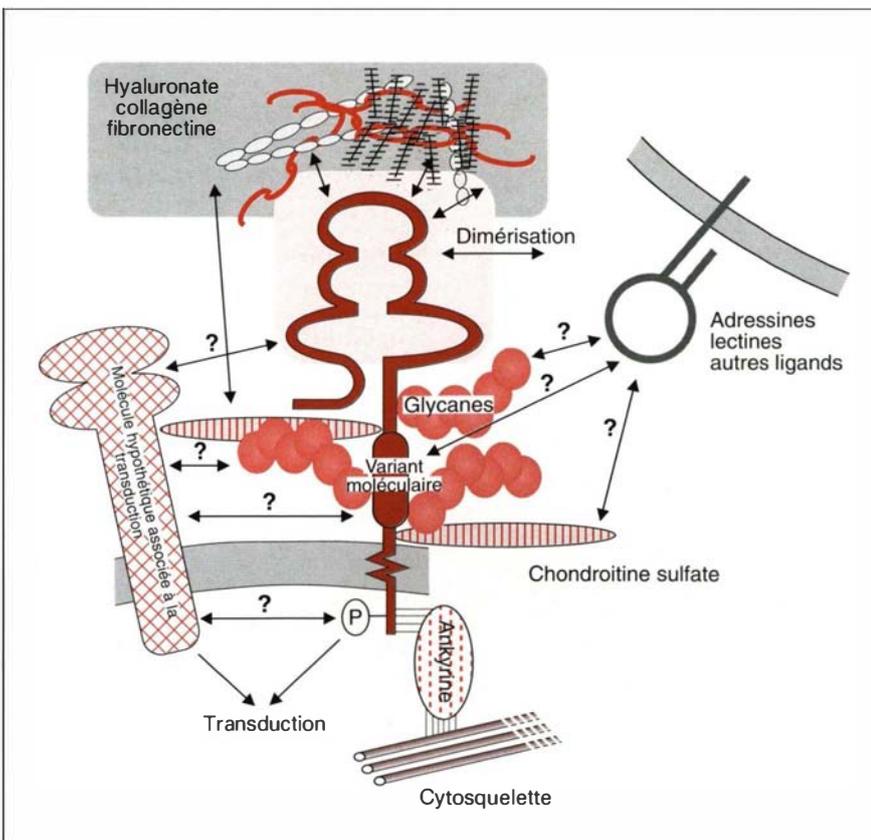


Figure 3. Interactions moléculaires et fonctions de la protéine CD44. Dans sa forme normale (CD44H), les interactions avec la matrice extracellulaire et le rôle dans la transduction apparaissent majeurs. La partie juxtamembranaire semble plus concernée par les interactions avec d'autres protéines. Dans les formes moléculaires variantes, les modifications quantitatives et qualitatives de l'environnement glycanique (chaînes N- et O-liées et chondroïtine sulfatée) du CD44 sont vraisemblablement à l'origine des potentialités nouvelles d'interaction : dimérisation, interaction avec d'autres molécules et/ou modification des interactions normales.

RÉFÉRENCES

26. Liao HX, Levesque MC, Patton K, et al. Regulation of human CD44H and CD44E isoform binding to hyaluronan by phorbol myristate acetate and anti-CD44 monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 1993 ; 151 : 6490-9.
27. Knudson W, Bartnik E, Knudson CB. Assembly of pericellular matrices by COS-7 cells transfected with CD44 lymphocyte-homing receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4003-7.
28. Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol* 1993 ; 122 : 257-64.
29. Culty M, Nguyen AH, Underhill CB. The hyaluran receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 1992 ; 116 : 1055-62.
30. Underhill CB. Hyaluronan is inversely correlated with the expression of CD44 in the dermal condensation of the embryonic hair follicle. *J Invest Dermatol* 1993 ; 101 : 820-6.
31. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991 ; 113 : 981-6.
32. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factors activities. *Cell* 1991 ; 64 : 867-9.
33. Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 1992 ; 118 : 971-7.
34. Turley EA. Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev* 1992 ; 11 : 21-30.
35. Turley EA. Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Exp Cell Res* 1993 ; 207 : 277-82.
36. Faassen AE, Schrager JA, Klein DJ, Oegema TR, Couchman JR, McCarthy JB. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 1992 ; 116 : 521-31.
37. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 1992 ; 116 : 817-25.
38. Ishii S, Ford R, Thomas P, Nachman A, Steele G Jr, Jessup JM. CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen. *Surg Oncol* 1993 ; 2 : 255-64.
39. Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth *in vivo*. *J Exp Med* 1991 ; 174 : 859-66.
40. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, De-Franzo B, Kim Y, Ottensmeier C. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium *in vitro* is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 3830-8.
41. Birch M, Michell S, Hart IR. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 6660-7.
42. Salmi M, Gron-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 1993 ; 122 : 431-42.
43. Pandolfi F, Trentin L, Boyle LA, et al. Expression of cell adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* 1992 ; 69 : 1165-73.
44. Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 1993 ; 14 : 483-6.
45. Pessac B, Defendi V. Cell aggregation: role of acid mucopolysaccharides. *Science* 1972 ; 175 : 898-900.
46. Ishii S, Steele G., Ford R, et al. Normal colonic epithelium adheres to carcinoembryonic antigen and type IV collagen. *Gastroenterology* 1994 ; 106 : 1242-50.
47. Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, et al. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 1262-8.
48. Matsumara Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992 ; 340 : 1053-8.
49. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 1993 ; 341 : 725-6.
50. Heider KH, Hofman M, Hors E, et al. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993 ; 120 : 227-33.
51. Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus JA, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 4754-6.
52. Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, et al. De novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993 ; 342 : 1019-22.

glycanes de la matrice [27]. Les variants de haut poids moléculaire de CD44 (CD44v), notamment associés à la constitution des métastases de carcinomes, sont physiologiquement présents à la surface des entérocytes des cryptes et des kératinocytes de la couche basale. [9]. Cette disposition pourrait assurer à ces cellules des propriétés particulières en matière de motilité.

Les propriétés d'adhérence de CD44 au collagène matriciel [36], à la fibronectine [37], et aux constituants des membranes basales (laminine et collagène de type IV) [38] pourraient également être impliquées dans les phénomènes migratoires et invasifs. Les chaînes chondroïtine-sulfate de CD44 sont indispensables à la migration de cellules mélanomateuses sur une matrice de collagène [36]. Au même titre que le regroupement spatial induit par la reconnaissance des protéoglycans matriciels, la reconnaissance de la fibronectine pourrait constituer un signal déclenchant l'adhérence à l'acide hyaluronique des isoformes de CD44.

La création de souris chez lesquelles certains exons de CD44 seraient invalidés devrait permettre d'éclaircir les fonctions physiologiques de CD44 dans un avenir proche (figure 3).

Participation des isoformes de CD44 à la formation de métastases

Isoformes standard de CD44

L'expression de CD44H augmente les propriétés tumorigène et métastatique de la lignée lymphomateuse murine Namalwa après injection chez la souris *nude* [39]. CD44H pourrait posséder un rôle dans l'extension intrapéritonéale des tumeurs développées aux dépens du revêtement épithélial de surface de l'ovaire, en permettant une liaison au mésothélium péritonéal dépendante de l'acide hyaluronique [40]. CD44H pourrait également participer à la constitution des métastases pulmonaires de mélanomes ; les cellules mélanomateuses B16 injectées chez la souris *nude* voient, en effet, leur potentiel métastatique favorisé par l'expression de CD44H [41]. Chez l'homme, la transformation maligne des épithéliomas

malpighiens semble s'accompagner sélectivement de l'augmentation d'expression des formes standard de CD44, accompagnée d'une diminution d'expression des formes variantes comprenant l'exon v6 [42]. Le stroma péritumoral, comme les matrices extracellulaires embryonnaires, est particulièrement riche en acide hyaluronique [20]. L'expression des formes standard de CD44 pourrait constituer un élément important dans son apparition ; en effet, CD44 participe largement aux phénomènes assurant la régulation de la synthèse, de la disposition et du taux de renouvellement des composants matriciels, spécialement de l'acide hyaluronique [27, 30]. L'influence de ce stroma sur l'évolution du clone transformé est cependant mal connue : s'agit-il d'un facteur favorisant la motilité tumorale, protégeant la cellule des effets du système immunitaire ou, au contraire, d'un mode de limitation par les cellules normales de l'invasion tumorale [20] ? D'autre part, l'expression de CD44 à la surface des cellules mélanomateuses participe certainement à la cytotoxicité relayée par les lymphocytes infiltrant la tumeur ou TIL [43] ; en effet, l'acide hyaluronique rajouté *in vitro* en excès semble inhiber la cytolysse [43], suggérant l'importance du stroma en matière de protection

de la tumeur vis-à-vis de la cytolysse T. Plusieurs travaux mettent actuellement en lumière l'importance des signaux co-activateurs de la réponse immunitaire en surface de la cellule tumorale, notamment l'interaction CD28/B7 [44]. L'expression de CD44 pourrait renforcer les réponses immunitaires dirigées contre les cellules tumorales par un mécanisme voisin. Enfin, il a été rapporté, dès 1972, que l'acide hyaluronique est impliqué dans la formation d'agrégats par les cellules tumorales [45]. Si la participation de CD44 à ce phénomène en tant que récepteur de l'acide hyaluronique demande à être vérifiée, il apparaît, en revanche, qu'il intervient dans l'agrégation intercellulaire, notamment en modulant les interactions homophiliques telle que celles de l'antigène carcino-embryonnaire [46].

Isoformes variantes (CD44v)

La présence de formes variantes longues de CD44 comportant l'exon v6 semble nécessaire et suffisante à l'apparition des métastases dans un modèle de carcinome pancréatique du rat [6] : la lignée BSp73ASML produit spontanément des métastases pulmonaires après injection au rat syngénique. Par criblage d'une banque

ADNc avec l'anticorps 1.1ASML (reconnaissant un antigène de surface spécifique de BSp73ASML), l'équipe de P. Herrlich a pu cloner plusieurs variants longs de CD44 associés au phénotype métastatique [6]. Comparés à CD44H, les deux variants les plus abondants possèdent des séquences supplémentaires de 162 et 85 acides aminés [47]. La transfection de ces variants dans BSp73AS (normalement non métastatique chez le rat syngénique) suffit à induire l'apparition des propriétés métastatiques [6, 47]. L'apparition de ces variants de CD44 est non seulement associée dans le temps au déclenchement des métastases, mais elle joue certainement un rôle dans leur apparition.

L'expression d'ARNm codant pour ces formes comprenant l'exon v6 a pu être mise en évidence dans des lignées cancéreuses humaines pulmonaires, mammaires et coliques [7]. Plusieurs études, fondées sur l'amplification par PCR de prélèvements tumoraux humains et l'utilisation d'antisérums reconnaissant les épitopes correspondant aux exons variants, confirment l'importance de ces mêmes isoformes, notamment au cours des lymphomes malins non hodgkiniens et dans la constitution des métastases de carcinomes de cancers digestifs et de cancers du sein [48-55] (Tableau IV).

Les mécanismes à l'origine de l'association des isoformes variantes de CD44 au phénotype métastatique restent largement inconnus. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : les isoformes variantes de CD44 pourraient transmettre un signal mitogène ou, plus généralement, favoriser la diversification clonale au sein des tumeurs, ce qui permettrait l'apparition de clones à potentiel métastatique. Cependant, l'hypothèse de la transmission d'un signal activateur « non spécifique » paraît peu vraisemblable, au vu notamment de la rapidité de survenue des métastases après injection [6]. Des modifications d'adhérence induites par l'expression des variants de CD44 pourraient être à l'origine des corrélations observées, en particulier celle des cellules métastatiques à un hypothétique ligand ganglionnaire [56]. Enfin, la présence des isoformes variantes de CD44 en surface de cellules cancéreuses pourrait assurer un statut de protection contre le système immunitaire.

Tableau IV

PRINCIPAUX TYPES DE TUMEURS ASSOCIÉES A L'APPARITION D'ISOFORMES VARIANTES EXON-V6+ DE CD44

CARCINOMES

Tissus	Nature des tumeurs	Références
Côlon	Adénocarcinomes avec ou sans métastases Polypes adénomateux Métastases	[48-51]
Estomac	Carcinomes avec ou sans métastases Adénocarcinomes	[52, 53]
Sein	Fibroadénomes Carcinomes avec ou sans métastases	[48]
LYMPHOMES NON HODGKINIENS		
Types de lymphomes		Références
Lymphomes non agressifs Lymphomes agressifs		[54, 55]

RÉFÉRENCES

53. Heider KH, Dammrich J, Skroch-Angel P, *et al.* Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 4197-203.
54. Koopman G, Heider KH, Horst E, *et al.* Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med* 1993 ; 177 : 897-904.
55. Salles G, Zain M, Jiang WM, Boussioutis VA, Shipp MA. Alternatively spliced CD44 transcripts in diffuse large-cell lymphomas : characterization and comparison with normal activated B cells and epithelial malignancies. *Blood* 1993 ; 82 : 3539-47.
56. Seiter S, Arch R, Reber S, *et al.* Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993 ; 177 : 443-55.
57. Blottière HM, Burg C, Zennadi R, *et al.* Involvement of histo-blood group antigens in the susceptibility of colon carcinoma cells to natural killer mediated cytotoxicity. *Int J Cancer* 1992 ; 52 : 609-18.
58. Labarrière N, Piau JP, Zennadi R, Blanchardie P, Denis M.G, Lustenberger P. Retinoic acid modulation of $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase activity and correlation with sensitivity to LAK-mediated cytotoxicity. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993 ; 29 : 140-4.
59. Piau J.-P, Labarriere N, Dabouis G, Denis MG. Evidence for two distinct $\alpha(1,2)$ fucosyltransferases differentially expressed throughout the rat colon. *Biochem J* 1994 ; 300 : 623-6.
60. Hofman M, Rudy W, Gunthert U, *et al.* A link between ras and metastatic behavior of tumor cells : ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREB cells. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 1516-21.
61. Tang DG, Chen YQ, Newman PJ, *et al.* Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 22883-94.
62. Opendakker G, VanDamme J. Cytokines and proteases in invasive processes : molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine* 1992 ; 4 : 251-8.
63. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder, *et al.* Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 1994 ; 124 : 71-82.
64. Mannel DN, Ruschoff J, Orosz P. The role of TNF in tumour growth and metastasis. *Res Immunol* 1993 ; 144 : 364-9.
65. Sy MS, Guo YJ, Stamenkovik I. Inhibition of tumor growth *in vivo* with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J Exp Med* 1992 ; 176 : 623-7.
66. Labarrière N, Piau JP, Otry C, Denis M, Lustenberger P, Meslah K, Le Pendu J. H blood group antigens carried by CD44v modulate tumorigenicity of rat colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1994 (sous presse).

Ce dernier aspect peut être illustré par certains travaux menés dans le laboratoire. Dans un modèle de carcinome colique chimio-induit chez le rat, deux clones dérivés d'une même lignée parentale sont caractérisés par des différences de tumorigénicité : le clone PROb a un comportement fortement tumorigène après réinjection au rat BD IX syngénique, à l'opposé du clone REGb. Des expériences d'immunoprécipitation par un anticorps monoclonal anti-CD44 reconnaissant l'exon v6, avec révélation par des anticorps dirigés contre l'antigène H (ou réciproquement), démontrent la présence majeure, presque exclusive, des antigènes de groupe sanguin portés par la protéine CD44v6 en surface des cellules PROb et REGb [66]. *In vitro*, un parallèle a pu être démontré entre l'expression des formes mûres des antigènes de groupe sanguin et la susceptibilité à la lyse NK-LAK [57]. Cette relation est également présente dans le modèle de carcinome colique décrit. Le clone PROb exprime de façon plus importante des antigènes H et présente une plus forte activité $\alpha(1-2)$ fucosyltransférase que les cellules du clone REGb. La diminution de l'activité $\alpha(1-2)$ fucosyltransférase des cellules PROb a pour conséquences une baisse de l'expression des antigènes fucosylés membranaires et une augmentation significative de leur sensibilité à la lyse LAK [58]. L'importance de ces antigènes de groupe sanguin est attestée par des expériences menées avec des cellules PROb transfectées avec un ADNc antisens de l' $\alpha(1-2)$ fucosyltransférase [59]. Ces transfectants voient augmenter leur sensibilité à la lyse LAK *in vitro*. *In vivo*, réinjectés à un animal syngénique, ils sont moins tumorigènes quel que soit le mode d'injection [66].

Epissage différentiel et messagers codant pour les variants

Les mécanismes qui conduisent à l'apparition des variants de CD44 sont mal connus. Ceux-ci sont probablement la conséquence de modifications spécifiques acquises au cours de

la progression tumorale. Il faut cependant noter que chaque type cellulaire semble capable d'induire l'apparition d'une gamme spécifique de messagers comportant l'exon v6 au cours de sa transformation [53]. L'étude de prélèvements coliques humains suggère l'existence d'un lien entre dysplasie et expression du CD44v6 [50]. La transformation de fibroblastes embryonnaires de rats par les protéines de la famille Ras s'accompagne d'une augmentation de l'expression de CD44 en même temps que de perturbations de son épissage [60].

Perspectives : immuno-intervention, immunothérapie

L'étude des variants de CD44 met en lumière le détournement de fonction de certaines molécules du système immunitaire par les cellules transformées. Pour métastaser, les cellules tumorales pourraient user d'autres interactions : un travail récent met en évidence l'expression de PECAM1 (CD31) par les cellules de diverses lignées cancéreuses [61], CD31 participant probablement aux processus de migration trans-endothéliale et d'extravasation leucocytaire. Des travaux récents suggèrent qu'un minimum d'inflammation engendrée par la tumeur lui permet d'accroître son potentiel invasif [62]. L'induction d'expression de CD44 par le TNF ou l'IFN- γ pourrait expliquer les effets « paradoxaux », de promotion de la métastase, observés dans de nombreux modèles animaux d'immunothérapies anticancer [63, 64].

Finalement, l'intérêt clinique de la découverte des isoformes longues de CD44 en matière d'immunothérapie des métastases (anticorps anti-CD44v [56], ou protéine de fusion CD44-Ig [65]) est probablement à nuancer du fait qu'une telle immunothérapie ne serait efficace qu'aux stades les plus précoces de la dissémination (en fait, avant qu'un contingent de cellules cancéreuses n'ait envahi les premiers ganglions [56]), dissémination qui survient elle-même bien souvent à un stade précoce de l'évolution tumorale [1] ■

Summary

Involvement of CD44 isoforms in tumor cell invasion and metastasis

CD44 is a transmembrane glycoprotein ; one of its normal functions may relate to the activation of T- and B-cells and the homing of lymphocytes. The other major role is as a hyaluronan receptor, playing an important part in the uptake and degradation of this glycosaminoglycan. The standard form of CD44, CD44H, probably enhances the tumorigenic properties of some melanomas. Further investigations carried out with a rat pancreatic adenocarcinoma revealed that CD44 occurs in numerous splice variants and that the metastasis specific epitope is derived from exon v6. Expression of the CD44v6 epitope is also seen in human tumors, thus this marker has potential for prognosis and possibly for therapy. On the basis of the physiological functions and molecular interactions of CD44, several mechanisms can be assumed to explain the role of CD44 in invasion and/or metastasis. Among them, the most interesting are related to (1) the elaboration and organisation of an extracellular matrix facilitating tumorigenicity, (2) antitumoral immunity linked to costimulation involving several molecular signals or (3) modifications of motility and adhesion of metastatic cells. Future prospects regarding immunotherapy, must be restrained because CD44 seems to be involved in the early steps of metastatic dissemination, often before clinical expression of the tumor. On the other hand, preliminary clinico-biological studies demonstrate that CD44 is a potential marker for prognosis in the case of gastric and colorectal cancers.

TIRÉS A PART

P. Lustenberger.

m/s n° 12, vol. 10, décembre 94