

N° d'ordre : 1114

50376  
1983  
163



50376  
1983  
163

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE**

**EN BIOCHIMIE**

Par

Philippe DELANNOY

## **ETUDE STRUCTURALE DES GLYCANNES DES FIBRONECTINES DE FIBROBLASTES DE HAMSTER NORMAUX ET TRANSFORMES**



Soutenue le 5 décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président  
Rapporteur  
Examineur

M. J. MONTREUIL  
M. A. VERBERT  
M. M. PORCHET

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe du Professeur Jean Montreuil, sous la direction de Monsieur Henri Debray, au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relation structure-fonction des constituants membranaires).

A Monsieur le Professeur J. Montreuil

Par votre enseignement passionné de la biochimie, vous avez très vite éveillé en moi l'intérêt pour la biologie moléculaire des glycoconjugués. Au sein de votre groupe, j'ai pu m'associer à l'étude des glycoprotéines membranaires, et profiter de l'environnement scientifique enrichissant et stimulant du laboratoire dont vous avez la direction et que votre dynamisme et votre autorité scientifique ont amené à un niveau unanimement reconnu. Qu'il me soit permis ici de vous en remercier et de vous exprimer mon plus profond respect.

Henri,

Voilà trois ans que, jeune étudiant de D.E.A., tu m'as accueilli dans ton laboratoire où tu m'as formé à l'étude des glycoprotéines membranaires. Tout ce que j'ai appris, je le dois à ta grande culture scientifique. Après m'avoir fait participer à tes travaux, tu as su me guider vers l'étude de la fibronectine. Pour tout cela, je te remercie, puisses tu trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et l'espoir de continuer conjointement ce travail.

Je tiens également à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans la réalisation de ce travail et, en particulier, je remercie messieurs Philippe Debeire, Benoit Flan et Pablo Hueso pour l'amitié et la confiance qu'ils m'ont témoignées ainsi que Madame Myriam Coniez pour la culture des cellules et Messieurs Bernard Fournet et Jose Paz-Parente pour leurs conseils en H.P.L.C.

Enfin, je tiens à associer à ces remerciements, Madame Nicole Thumerelle qui a réalisé la frappe de ce mémoire.

# TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
I - Historique et définitions	3
II - Sources et localisation de la fibronectine	5
III - Propriétés physico-chimiques de la fibronectine	6
A - Propriétés physiques et conformation	6
B - Composition chimique	11
1 - Composition en acides aminés	11
2 - Groupements thiols libres	11
3 - Structure des glycanes	13
C - Rôle des glycanes	15
D - Comparaison entre fibronectines plasmatique et cellulaire	16
IV - Les domaines fonctionnels de la fibronectine	19
A - Domaine spécifique du collagène	22
B - Domaine de fixation cellulaire	23
C - Domaines de fixation des protéoglycanes	23
D - Autres sites de fixation	24
V - Fonctions et rôles de la fibronectine	25
A - Fibronectine et adhésion intercellulaire	25
B - Adhésion cellulaire à un substrat	28
1 - Organisation de la matrice extracellulaire	28
2 - Attachement des cellules au collagène	29
3 - Fixation des cellules aux matériaux plastiques	31
C - Propriétés opsonisantes de la fibronectine	31
D - Fibronectine, Hémostase et Thrombose	32

E - Fibronectine, mobilité cellulaire et chimiotactisme	32
F - Fibronectine, développement embryonnaire et différenciation cellulaire	33
VI - Biosynthèse et régulation	34
VII - Fibronectine et cancer	35
A - Conséquences de la diminution de la fibronectine cellulaire	35
B - Raisons de la diminution de la fibronectine associée à la membrane des cellules transformées	40
1 - Diminution de la synthèse de fibronectine	40
2 - Augmentation de la sensibilité aux protéases	41
3 - Modifications de structure de la fibronectine des cellules transformées	41
4 - Perte des récepteurs de la fibronectine à la surface de la cellule transformée	42
TRAVAUX PERSONNELS	44
MATERIELS ET METHODES	46
I - Matériels	46
II - Méthodes	46
A - Conditions de culture cellulaire et de marquage métabolique	46
B - Purification de la fibronectine	47
C - Electrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S.	47
D - Immunoprécipitation	48
E - Préparation des glycopeptides	48
F - Libération des glycanes par hydrazinolyse et N-réacétylation	49
G - Gel filtration	49
H - Chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines insolubilisées	50
1 - Fractionnement sur colonne de Con A-Sepharose 4-B	50
2 - Fractionnement sur colonne de LCA-Sepharose 4-B	50
I - Fractionnement des glycanes libérés par hydrazinolyse, par chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions	50

RESULTATS	52
I - Purification de la fibronectine	52
II - Fractionnement par gel filtration sur colonne d'Ultrogel AcA 202	56
A - Fractionnement des glycopeptides marqués	56
B - Fractionnement des glycannes	56
III - Fractionnement des glycopeptides par chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines insolubilisées	59
A - Fractionnement sur Con A-Sepharose 4-B	59
B - Fractionnement sur L.C.A.-Sepharose 4-B	64
IV - Fractionnement des glycannes libérés par hydrazinolyse, par chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions	67
A - Fractionnement des glycannes totaux	67
B - Fractionnement des glycannes obtenus par chromatographie d'affinité sur lectines insolubilisées	70
DISCUSSION ET CONCLUSION	74
BIBLIOGRAPHIE	77

---

## ABREVIATIONS

Asn	: L-Asparagine
ConA	: Lectine de <u>Canavalia ensiformis</u>
dpm	: désintégration par minute
E.D.T.A.	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
Fuc	: L-Fucose
Gal	: D-Galactose
GlcNAc	: N-Acetyl-D-glucosamine
HPLC	: Chromatographie liquide de haute performance
LCA	: Lectine de <u>Lens culinaris</u>
Man	: D-Mannose
$\alpha$ -M.Glc	: $\alpha$ -méthyl-D-glucoside
NeuAc	: Acide N-Acetylneuraminique
NeuGc	: Acide N-Glycolylneuraminique
NaCl/Pi	: Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 ; NaCl 0,15 M
P.M.S.F.	: Phenyl-methylsulfonyl fluoride
S.D.S.	: Dodécyl sulfate de sodium

## INTRODUCTION

La fibronectine est une glycoprotéine de haute masse moléculaire, largement répandue dans le règne animal, présente dans le plasma et associée à d'autres macromolécules dans le réseau fibrillaire dense qui constitue la matrice extracellulaire (8, 76, 81, 148, 168, 173). Découverte dans le plasma humain en 1948 par Morrison et al (108), son étude a connu un regain d'intérêt à partir de 1973, date de la mise en évidence par Hynes (75) de sa diminution sensible à la surface des fibroblastes transformés par des virus, ce qui lui valut le nom de "Large External Transformation Sensitive protein" ou LETS protein.

La transformation maligne induit de profonds remaniements de la structure et du métabolisme de la cellule : modification de la morphologie cellulaire, perturbation de la perméabilité membranaire, augmentation du nombre des mitoses, perte de l'inhibition de contact, apparition de néo-antigènes membranaires, perte de l'adhésion cellulaire (35). Parallèlement, elle provoque des modifications des constituants cellulaires et, en particulier, au niveau des glycoconjugués membranaires, elle induit de profondes modifications des structures glycaniques. Ces altérations se traduisent dans le cas des glycolipides par une simplification de la partie oligosaccharidique (62) et par une "multiantennarisation" des N-glycannes des glycoprotéines (18, 21, 36, 116, 138, 145, 159).

Bien que la diminution de la fibronectine pericellulaire ne soit pas un marqueur absolu de la tumorigénicité, elle permet d'expliquer en partie le changement de morphologie, la perte d'adhésivité et la désorganisation des cellules en culture dûs à la transformation maligne. En outre, la disparition de la fibronectine pourrait être associée au pouvoir métastasant de la cellule tumorale. Différentes hypothèses ont été émises, mais pour l'instant les raisons de la diminution de la fibronectine associée à la membrane cellulaire ne sont toujours pas connues.

Disposant d'une méthode de fractionnement des glycopeptides mise au point par Debray et al. (36) pour l'étude des modifications des structures glycaniques des glycoprotéines cellulaires associées à la transformation, nous avons entrepris d'étudier les structures glycaniques de la fibronectine des cellules transformées afin d'étendre éventuellement à cette glycoprotéine sensible à la transformation maligne les résultats obtenus pour les cellules entières et pour tenter de mettre en évidence des modifications structurales de cette glycoprotéine qui pourraient expliquer le mécanisme de sa disparition de la surface des cellules transformées et/ou cancéreuses.

Ce travail a fait l'objet de la communication suivante :

DELANNOY, P., DEBEIRE, P., MONTREUIL, J. et DEBRAY, H.

Comparison of glycan structures of fibronectin released by normal and virus-transformed baby-hamster kidney 21 fibroblasts.

VIIth International Symposium on glycoconjugates, Lund, 18-23 juillet 1983.

## GENERALITES

### I - Historique et définitions

C'est en 1948 que Morrison et al. (108) ont isolé du plasma humain une protéine partiellement purifiée, co-précipitant avec le fibrinogène à froid. Cette protéine fut désignée sous le nom de "cold insoluble globulin" ou CIG (108). Sa mobilité électrophorétique correspondait à une  $\beta$ -globuline possédant un coefficient de sédimentation de 12-14 S (108). Cette protéine fut isolée et plus amplement caractérisée par Mosesson et Umfleet (110) qui montrèrent par voie immunologique qu'elle était présente dans tous les plasmas normaux à une concentration de 0,3 g par litre (110).

Dans les années 73-74, plusieurs groupes ont caractérisé par des voies différentes une glycoprotéine de haute masse moléculaire associée à la surface cellulaire et sensible à la transformation ou maligne.

Il est bien connu qu'il est possible de marquer les glycoprotéines de la surface cellulaire par diverses techniques : iodination par la lactopéroxydase (72,75), par la chloropéroxydase (86) ou par la chloramine T (86) ; oxydation par la galactose-oxydase (31,51,53), le phosphate de pyridoxal (33), l'acide périodique (33) suivie d'une réduction par le borohydrure tritié ; ou encore par transamination (111). Dans chacun des cas, l'électro-

phorèse des protéines marquées a permis de visualiser une glycoprotéine de haute masse moléculaire ( $2,1$  à  $2,5 \cdot 10^5$  d.), sensible à l'action ménagée de la trypsine et qui, généralement, n'était pas ou peu marquée dans les cultures de cellules transformées. Hynes et Bye (78) lui donnèrent le nom de "LETS protein" (Large External Transformation Sensitive protein). D'autres auteurs l'appellèrent Protéine Zéta (128), galactoprotéine a (53), ou encore bande I (122).

Par l'analyse électrophorétique des protéines secrétées dans le milieu de culture de fibroblastes, Yamada et Weston (175) mirent en évidence une bande majeure, de haute masse moléculaire, sensible à l'action ménagée de la trypsine et également présente dans les homogénats cellulaires, qu'ils dénommèrent "Cell Surface Protein" (C.S.P.).

Par étude immunologique, Ruoslahti et al ont montré qu'il existait dans les protéines extraites de la surface des fibroblastes, un antigène majeur présent également dans le plasma (135, 136). En effet, un antisérum dirigé contre l'antigène de surface du fibroblaste (S.F.A.) ou contre la "Cold Insoluble Globulin" du plasma, précipite les deux types d'antigènes par une réaction d'identité lors d'expériences d'immuno-diffusion double (135). En outre, l'antisérum dirigé contre l'antigène plasmatique interagit avec des antigènes de surface d'un grand nombre d'espèces (93).

Ces importantes similitudes, à la fois de structure, de masse moléculaire, des propriétés immuno-chimiques, ainsi que le rôle joué dans l'adhésion cellulaire de ces différentes glycoprotéines ont permis à Kuusela et al. (93) de les regrouper sous le voca-

ble de fibronectines : du latin fibra (fibre) et nectere (lier, attacher), protéines capables de s'associer à des structures fibreuses. Ce terme de fibronectine regroupe donc les différentes formes de cette glycoprotéine polymorphe, de haute masse moléculaire et possédant des propriétés immunochimiques très voisines.

La fibronectine plasmatique (ou circulante) correspond à la "Cold Insoluble Globulin" (108), au facteur anti-gélatine (166), à l' $\alpha_2$ -opsonic-glycoprotéine (20). La fibronectine cellulaire correspond à l'antigène de surface du fibroblaste (S.F.A.) (136), à la galactoprotéine a de Hakomori et al. (53), à la LETS protein de Hynes et Bye (78), à la protéine de surface cellulaire de Yamada et al. (C.S.P.) (175), ou encore à la Protéine Zéta de Robbins et al. (128).

## II - Sources et localisation de la fibronectine

In vivo, la fibronectine est présente dans le plasma à une concentration de 300  $\mu\text{g/ml}$  (110) et semblerait provenir principalement des hépatocytes (153), les macrophages et les cellules endothéliales pouvant également contribuer à sa formation du fait de leur association à la circulation sanguine (168). On la retrouve également, à des concentrations plus faibles, dans d'autres liquides biologiques comme le liquide céphalo-rachidien (94) ou le liquide amniotique (34). En particulier, il a été montré que des cellules épithéliales amniotiques, établies en culture primaire, sécrétaient de la fibronectine (7). En outre, cette forme de fibronectine apparaît plus glycosylée que les fibronectines plasmatique

et cellulaire, et sa classification reste encore incertaine (34,130).

La fibronectine se retrouve in vivo dans les tissus conjonctifs et mésenchymateux, dans le milieu extracellulaire et au niveau d'un grand nombre de cellules où elle s'organise en un réseau fibrillaire, associée aux collagènes et à des protéoglycanes, formant une partie importante du manteau extracellulaire entourant les cellules.

Des antigènes "fibronectin -like" sont présents dans un grand nombre d'espèces du règne animal allant des Spongiaires aux Mammifères (95).

La fibronectine est également synthétisée par bon nombre de cellules en culture (Tableau I). En particulier, les fibroblastes et les cellules endothéliales ont un taux de synthèse élevé et on retrouve cette glycoprotéine intégrée dans la matrice et dans le milieu de culture. Beaucoup d'autres cellules en culture produisent de la fibronectine en quantité plus ou moins importante, comme par exemple les macrophages, les cellules épithéliales et les hépatocytes.

### III - Propriétés physico-chimiques de la fibronectine

#### A - Propriétés physiques et conformation

La fibronectine plasmatique et la fibronectine cellulaire ont des propriétés physico-chimiques très proches (Tableau II). La fibronectine plasmatique humaine est une glycoprotéine relativement riche en Proline et en Cysteine (109). Il s'agit d'un dimère constitué par l'association de sous-unités identiques ou très voisines,

Tableau I - Cellules synthétisant la fibronectine in vitro (81)

Type cellulaire	Commentaires
Fibroblastes	diminution après transformation maligne
Cellules endothéliales	taux de synthèse élevé. Pourcentage élevé secrété <u>in vitro</u>
Chondrocytes	taux variable en fonction de l'état de différenciation
Myoblastes et myotubes	fonction du type cellulaire. Diminution après transformation maligne
Macrophages	essentiellement secrétée
Hépatocytes	essentiellement secrétée
Cellules amniotiques	produisent la fibronectine du liquide amniotique
Entérocytes	en très faible quantité
Cellules épithéliales mammaires	diminution dans le cas de cellules métastasantes.
Cellules embryonnaires	synthèse fonction de l'état de développement
Cellules astrogliales	pas de fibronectine <u>in vivo</u>



**Tableau II - Propriétés physico-chimiques des fibronectines plasmatique et cellulaire (168).**

Les résultats rassemblés dans ce tableau proviennent des travaux de Mosesson et Umfleet (110), Mosesson et al. (109), Yamada et al.(174), Vuento et al. (155) et Alexander et al. (2,3).

	<b>Fibronectine cellulaire</b>	<b>Fibronectine plasmatique</b>
Masse moléculaire/SU.	220-240 000 d	215-220 000 d
structure	dimérique et multimérique	dimérique
Constante de sédimentation	8,5 (pH 8) 7,6 (pH 11)	12-14 (pH 7) 8,0 (pH 11)
Rayon de stokes	110 Å (pH 11)	-
Volume spécifique partiel	0,72	0,72
Coefficient de friction	2,8-2,9 (pH 11)	2,8 (pH 11) 1,7 (pH7)
point isoélectrique	5,5-6,2	5,5-6,2
Coefficient d'extinction molaire	1,2	1,28
Dichroïsme circulaire (minimum/maximum)	212/227 nm	213/227 nm
Solubilité	pH 7 insoluble	pH 7 soluble

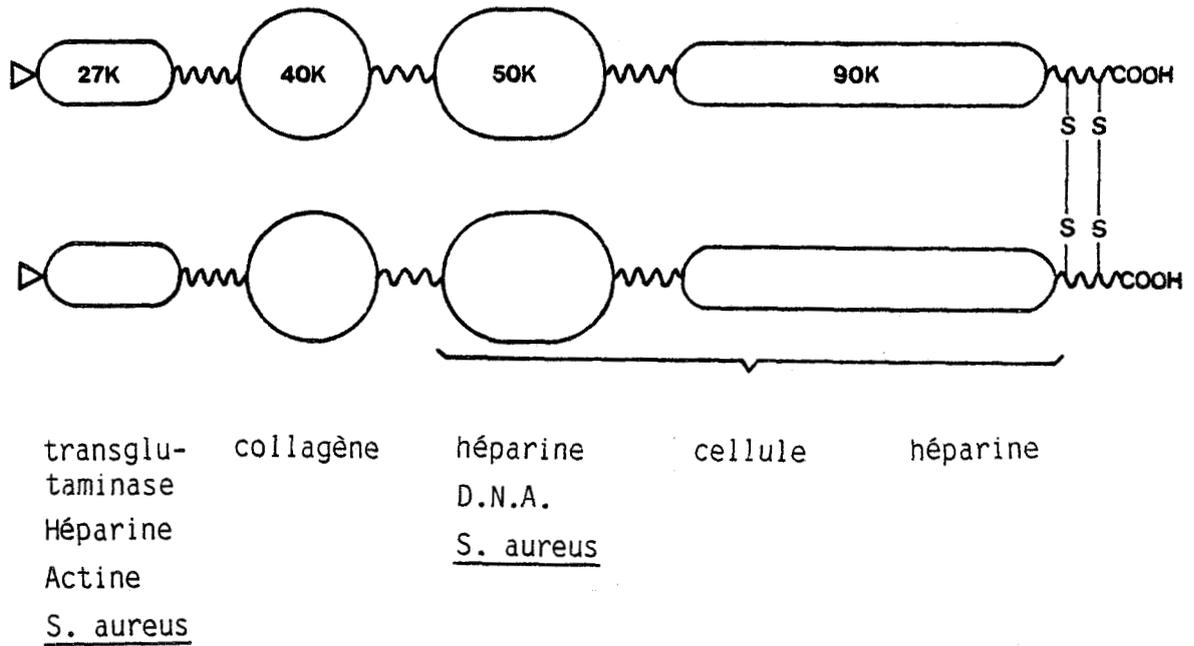


d'une masse moléculaire de 215 000 à 220 000 daltons, réunis par un ou plusieurs ponts disulfures situés à proximité de l'extrémité C-terminale de la molécule. Les deux sous-unités constituant la fibronectine plasmatique peuvent être légèrement différentes. Cependant, la comparaison de leur structure primaire ne présente pas de différences majeures (17, 92).

La fibronectine cellulaire synthétisée par des cellules en culture est très proche de la forme plasmatique ; sa masse moléculaire apparente, déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S., est de 220 000-240 000 daltons (31, 53, 71, 175) bien qu'elle puisse se trouver sous forme multimérique (masse moléculaire supérieure à 1 200 000 daltons).

Des études effectuées par dichroïsme circulaire ont montré que cette macromolécule présente dans sa structure des zones globulaires compactes bien qu'elle soit relativement flexible et allongée dans son ensemble (2, 3, 155). Les observations de microscopie électronique confirment l'allongement et la flexibilité relative de la molécule, cependant les domaines globulaires n'ont pu être observés par cette technique (45, 91).

La constante de sédimentation de 12-14 S (108) mesurée à pH neutre pour la fibronectine plasmatique correspond bien à celle d'une molécule globulaire de 440 000 daltons. Par contre, quand la mesure est effectuée à pH élevé, on observe une diminution de la constante de sédimentation, correspondant à un état beaucoup plus étalé de la molécule (2,3). En ce qui concerne la fibronectine cellulaire, cette constante de sédimentation reste stable et faible lors d'une élévation du pH. La figure 1 présente un modèle général tenant compte de ces différentes observations : la molécule est



**figure 1 - Modèle général de l'organisation des domaines fonctionnels de la fibronectine (168).** Il s'agit d'un dimère constitué de deux chaînes peptidiques de 220 000 daltons reliées par deux ponts disulfures. La masse moléculaire des domaines résistants aux protéases est indiquée au niveau de la chaîne supérieure (K = 1 000 d.) et sous chacun d'eux sont indiquées les activités biologiques qui ont pu leur être associées.

constituée de domaines structuraux globulaires séparés par des régions charnières plus souples, ce qui peut expliquer l'influence des conditions ioniques sur la conformation de la molécule. Ce modèle tient compte également des résultats obtenus par attaque protéolytique de la molécule (168).

On peut considérer que la molécule de fibronectine plasmatique, soluble, se trouve dans le plasma sous une forme globulaire, cette conformation pouvant être modifiée en fonction de son environnement ionique, alors que la fibronectine cellulaire est sous une forme beaucoup plus étalée, insoluble, associée aux autres macromolécules de la matrice extracellulaire.

## **B - Composition chimique**

### **1 - Composition en acides aminés**

Les fibronectines excrétées dans le milieu de culture de divers types cellulaires ont une composition en acides aminés très voisine de celle de la fibronectine plasmatique ou amniotique (11, 114, 155, 174) (Tableau III). Les peptides obtenus par action ménagée de la trypsine sont parfaitement comparables en ce qui concerne leur comportement électrophorétique (155).

### **2 - Groupements thiols libres**

Il existerait deux groupements thiols libres dans la structure primaire de la fibronectine ; l'un localisé à 170 000 daltons de l'extrémité N-terminale de la molécule (157), le second près de

Tableau III - Composition en acides aminés des fibronectines humaines plasmatique, amniotique et cellulaire (11)

Résidus/1 000 Résidus			
	: Fibronectine : plasmatique : (CIG) <sup>a</sup>	: Fibronectine : amniotique :	: Fibronectine : cellulaire :
Acide aspartique	: 94	: 95	: 92
Thréonine	: 106	: 101	: 106
Sérine	: 74	: 78	: 78
Acide glutamique	: 120	: 122	: 118
Proline	: 93	: 92	: 71
Glycocolle	: 87	: 88	: 90
Alanine	: 42	: 43	: 47
Cystéine <sup>b</sup>	: 24	: 25	: 23
Valine	: 76	: 73	: 77
Méthionine	: 10	: 11	: 12
Isoleucine	: 42	: 42	: 45
Leucine	: 51	: 56	: 61
Tyrosine	: 39	: 36	: 40
Phénylalanine	: 23	: 25	: 27
Histidine	: 21	: 20	: 23
Lysine	: 35	: 32	: 37
Arginine	: 51	: 50	: 52
Tryptophane	: 15	: 11	: ND

a : Cold Insoluble Globulin

b : Déterminé par oxydation par l'acide performique

ND : non déterminé



l'extrémité C-terminale (141, 157). L'alkylation de ces groupements thiols libres inhibe l'intégration de la fibronectine dans la matrice extracellulaire (156, 157). Ces groupements libres seraient impliqués dans la formation de structures multimériques à la surface cellulaire par des ponts disulfures entre les molécules de fibronectine elles-mêmes d'une part, et les molécules de fibronectine et d'autres constituants extracellulaires tels que les protéoglycannes, d'autre part.

### 3 - Structure des glycannes

La fibronectine ne renferme que des glycannes de type N-acétyl-lactosaminique (47, 48, 146, 167, 176). Il existe cinq chaînes oligosaccharidiques liées N-glycosidiquement à un résidu d'asparagine par monomère et elles sont situées au niveau du domaine de fixation du collagène (54, 140, 156).

Contrairement à la composition en acides aminés, les structures glycaniques diffèrent de manière significative selon le type de fibronectine (24, 47, 48, 49, 146). Les structures des N-glycannes majeurs de la fibronectine plasmatique bovine (146) et de la fibronectine de hamster, plasmatique (49) et cellulaire (24, 48) sont présentées à la figure 2. La présence d'un résidu de  $\beta$ -D-galactose lié en  $\beta$ -1,3 sur la N-acétylglucosamine est inhabituelle. Cependant, les structures existantes sont proches de celles d'autres glycoprotéines sériques ou tissulaires (107). La structure de la partie glycanique de la fibronectine plasmatique de hamster (49) diffère par le nombre, le type et la liaison de l'acide sialique, ainsi que par la présence de fucose sur la fibronectine cellulaire (24, 48).



Parallèlement, il apparaît que la fibronectine du liquide amniotique serait plus glycosylée que les fibronectines plasmatique ou cellulaire (11, 130) ; en particulier, enrichie en N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, galactose et fucose, les taux de mannose et d'acide N-acétyl-neuraminique restant stables. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de O-glycannes et par l'augmentation des structures tri et tetra-antennées (120). En outre, la glycosylation pourrait être en relation avec le stade de développement de l'embryon (11, 120).

La glycosylation apparaît tôt dans la synthèse des sous-unités de fibronectine (30). Initialement de type oligomannosidique, sensible à l'action de l'endo-N-acétylglucosaminidase H, les chaînes glycaniques de type N-acétyllactosaminique apparaissent, après dimérisation de la molécule, avant sa sécrétion.

### C - Rôle des glycannes

L'utilisation de la tunicamycine (inhibiteur de la formation des dolichol-pyrophosphate N-acétylglucosamines et de ce fait inhibiteur de la biosynthèse des glycannes de type N-glycosidique) bloque totalement la glycosylation de la fibronectine. L'obtention de fibronectines non glycosylées a permis d'explorer le rôle joué par la partie glycanique (41, 42). De ces études est ressorti le fait que la partie glycanique de la fibronectine n'avait pas de rôle fonctionnel apparent, puisque la fibronectine non glycosylée demeure active comme la molécule native dans les tests d'hémagglutination, d'adhésion cellulaire au collagène, d'étalement des cellules et de reversion de la morphologie des cellules transformées (23, 118).

Dans certaines souches de fibroblastes résistant à la Ricine, la glycosylation de la fibronectine est affectée du fait des modifications existant au niveau des glycosyl-transférases nécessaires à l'assemblage des N-glycannes (152). La fibronectine synthétisée par ces mutants possède des structures glycaniques simplifiées et pourtant s'intègre normalement dans la matrice extracellulaire des fibroblastes humains normaux. Parallèlement, la fibronectine synthétisée par des fibroblastes cultivés en présence de monensine porte des glycannes de type oligomannosidique et cependant, elle est sécrétée dans le milieu de culture (100). Ceci semble indiquer que les structures glycaniques portées par la fibronectine ne sont pas indispensables à sa sécrétion.

La fibronectine non glycosylée, synthétisée par des fibroblastes cultivés en présence de tunicamycine est nettement plus sensible à la dégradation par la Pronase ou d'autres protéases, et possède un "turn-over" plus élevé (118-119). Les glycannes apparaissent donc comme stabilisateur de la molécule contre l'attaque protéolytique, protégeant plus particulièrement le domaine de la molécule porteur du site de fixation au collagène (15).

#### **D - Comparaison entre fibronectines plasmatique et cellulaire**

Les fibronectines plasmatique et cellulaire possèdent des structures voisines, mais pas totalement identiques (Tableau II). Leurs masses moléculaires sont légèrement différentes et bien que les deux molécules soient très proches en ce qui concerne leur composition en acides aminés (Tableau III) et leurs structures secondaires et tertiaires, elles diffèrent par leur  $pH_i$  (3), leur solubilité (2,3, 174), le nombre de liaisons disulfures intermoléculaires (174) et la structure de leur

partie glycanique (Figure 2).

Les structures de ces fibronectines ont été récemment comparées de manière détaillée (9, 64). Il apparait que les fibronectines plasmatique et cellulaire ont les mêmes domaines fonctionnels, résistants à l'attaque protéolytique. Cependant, il existe de légères délétions dans la structure comparée des deux molécules. Ces différences de structure ont été mises en évidence dans la partie centrale de la chaîne peptidique. Ceci montre que la fibronectine plasmatique ne dérive pas de la fibronectine cellulaire par élimination d'un petit peptide d'une des extrémités de la molécule comme il avait été préalablement suggéré (9, 13, 64). L'utilisation d'anticorps monoclonaux est en faveur de l'existence d'une certaine variabilité de la séquence d'acides aminés et confirme que l'on est bien en présence de deux molécules distinctes (9).

Ces différences de structure entre les deux types de fibronectines peuvent être corrélées à des modifications dans les propriétés biologiques des deux molécules (Tableau IV). En effet, elles agissent de manière différente sur la morphologie, l'alignement des cellules transformées cultivées in vitro et sur l'hémagglutination, la fibronectine cellulaire étant plus active que son homologue plasmatique, phénomène qui pourrait être partiellement expliqué par une différence d'affinité entre fibronectines plasmatique et cellulaire vis-à-vis de l'acide hyaluronique (99). Par contre, elles ont les mêmes propriétés dans l'attachement cellulaire et la phagocytose.

Ces observations montrent qu'il s'agit bien de deux molécules distinctes, bien que très proches ; celles-ci pouvant être codées par des R.N.A. messagers distincts.

Tableau IV - Comparaison des activités biologiques des fibronectines plasmatique et cellulaire (168)

Activité biologique	Activité spécifique relative de la fibronectine cellulaire/à une activité théorique de la fibronectine plasmatique = 1
. Attachement des cellules au collagène (170)	1
. Etalement des cellules au plastique (170,123)	1
. Activité opsonisante/macrophages (105)	1
. Hémagglutination (170)	150 - 200
. Restauration de l'organisation des cellules transformées (170)	50
. Attachement des cellules transformées aux matériaux plastiques (77)	2 - 3



#### IV - Les domaines fonctionnels de la fibronectine

La fibronectine est capable de se fixer directement et spécifiquement au collagène, aux protéoglycannes et à un certain nombre d'autres "cibles" biologiques (Tableau V). Du fait de ces interactions, elle intervient dans différents mécanismes biologiques.

A première vue, la fibronectine pouvait être considérée comme une molécule peu spécifique, capable de "coller" à différents substrats comme un ciment cellulaire (glue-like molecule). En fait, il apparaît que ces diverses interactions sont hautement spécifiques et qu'elles intéressent des zones différentes de la molécule qui coïncident avec les domaines structuraux mis en évidence par les méthodes biophysiques. Ces domaines correspondent à des parties de la molécule que l'on peut isoler tout en leur conservant l'activité biologique dont ils sont le siège.

La technique utilisée pour isoler ces différents domaines a consisté en l'utilisation d'enzymes protéolytiques tels que: chymotrypsine ou Pronase. Les protéases ont tendance, dans un premier temps, à attaquer la protéine au niveau des régions flexibles de la chaîne polypeptidique et elles préservent les régions globulaires, compactes, souvent stabilisées par des ponts disulfures, où les coupures sont plus difficiles. Ce phénomène, utilisable pour d'autres molécules à activité biologique, a permis d'isoler les différents sites actifs de la fibronectine à l'état natif. Deux méthodes sont possibles, comme l'indique la figure 3. La première consiste à coupler la fibronectine à son ligand, par exemple de la gélatine fixée de manière covalente à des billes d'Agarose. Le complexe fibronectine-ligand est alors soumis à

Tableau V - Les interactions de la fibronectine (81)

	références
. Collagène natif, gélatine	12, 13, 50, 55, 60, 61, 133, 139, 156, 157, 163
. Fibrine, fibrinogène	44, 67, 73, 83, 101, 113, 127, 139
. F. XIIIa transglutaminase	58, 83, 112
. Protéoglycannes, héparine	59, 63, 64, 65, 67, 70, 72, 84, 85, 105, 108, 127, 131, 132, 139, 140, 151, 172
. Cellules	60, 101, 125, 131, 140
. <u>Staphylococcus aureus</u>	112, 137
. Actine	79, 88
. D.N.A.	65, 176
. Acide hyaluronique	72, 84, 131, 172
. Gangliosides	66, 171
. Acétylcholinestérase	43
. Composant CIq du complément	16
. Thrombospondine	98



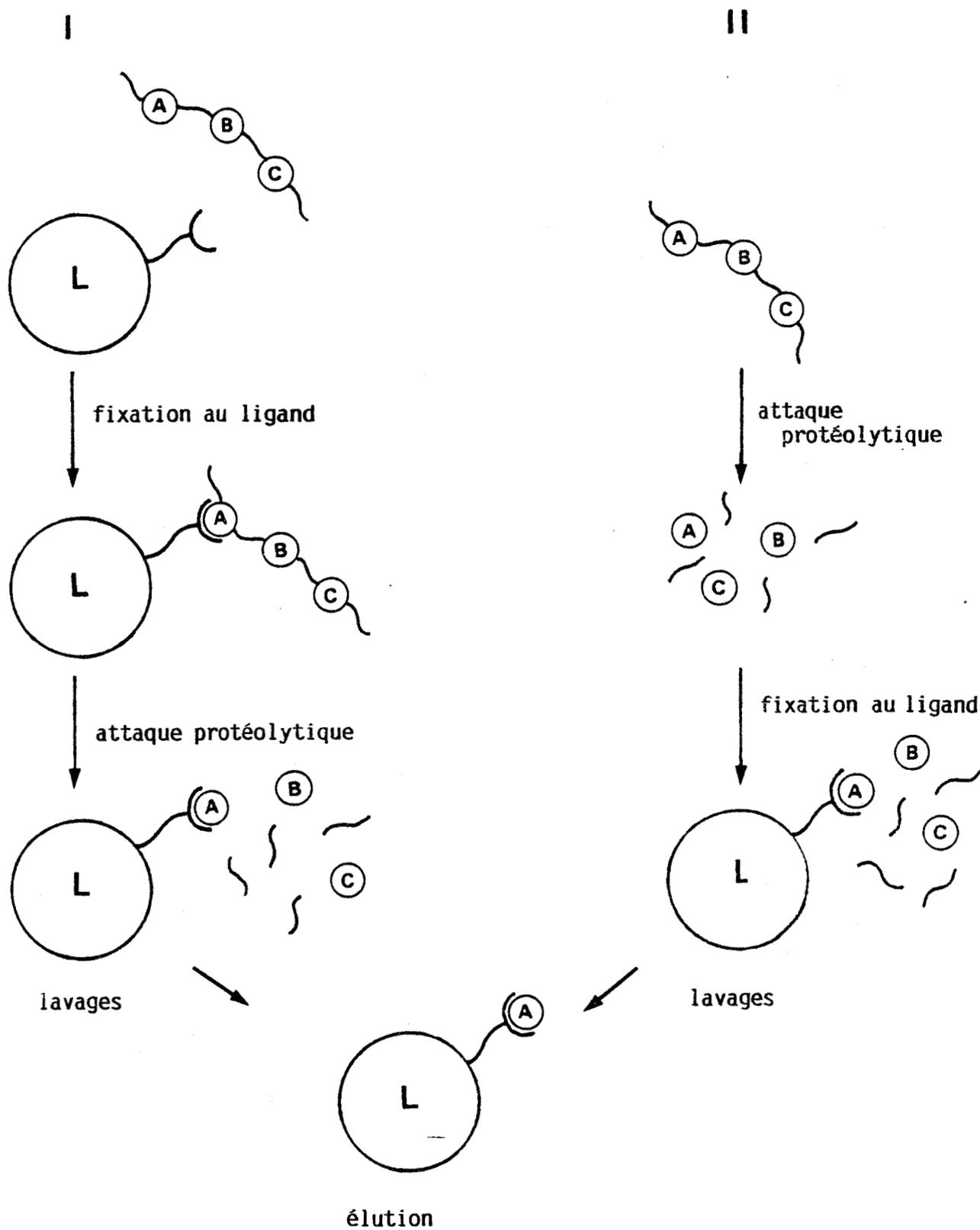


Figure 3 - Méthode générale de purification des domaines fonctionnels de la fibronectine par chromatographie d'affinité (168)

l'action des protéases. Après élimination de l'enzyme et des peptides non spécifiques, il est possible d'éluer le domaine considéré de son ligand insolubilisé. La seconde méthode consiste à digérer préalablement la fibronectine par des protéases et, ensuite, à purifier le domaine spécifique par chromatographie d'affinité.

#### **A. Domaine spécifique du collagène**

La fibronectine possède un site de fixation au collagène qui a pu être isolé par plusieurs laboratoires. Il s'agit d'une fraction peptidique de 40 000 daltons, nettement définie au niveau structural, de forme globulaire et résistant à l'action protéolytique (13, 55, 61, 133). Cette stabilité vient de l'existence d'un nombre élevé de ponts disulfures intra-caténaire, nécessaires au maintien de l'activité biologique (163), et à la présence de glycanes (les cinq glycanes portés par la molécule se trouvant au niveau de ce domaine) et l'on sait le rôle protecteur de ces deux facteurs vis-à-vis des enzymes de dégradation. L'état de complexité de ce domaine pourrait être le reflet d'une longue évolution, à partir d'un gène ancestral, de cette partie de la molécule. Contrairement à la fibronectine native, ce fragment biologiquement actif est incapable d'induire la fixation des cellules. Par contre, il peut inhiber de manière compétitive cette fixation, prouvant ainsi qu'il est porteur de l'intégralité de l'activité. Ce domaine a pu être replacé à l'intérieur de la molécule, à proximité de l'extrémité N-terminale (12, 50, 139, 157).

## B. Domaine de fixation cellulaire

L'interaction de la fibronectine avec la surface de la cellule lui confère un rôle essentiel dans les phénomènes d'adhésion cellulaire. Cette activité est portée par un fragment protéolytique de 160 000 daltons (60, 101, 131, 140). Ce fragment est incapable d'induire la fixation des cellules à un film de collagène. Par contre, il peut encore permettre l'attachement et l'étalement des cellules au matériau plastique des flacons de culture (60, 101). Ce fragment est relativement allongé et flexible bien qu'il contienne un domaine globulaire de 50 000 daltons spécifique de l'héparine. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'isoler un petit peptide de 15 000 daltons conservant la propriété d'adhérer aux cellules (125).

## C. Domaines de fixation des protéoglycannes

La fibronectine s'associe à l'héparine et cette interaction a vraisemblablement un rôle important dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans la phagocytose. La dégradation protéolytique de la molécule de fibronectine a permis de mettre en évidence trois régions distinctes de la molécule capables de s'associer à l'héparine (54, 63, 64, 67, 127, 132, 139, 140). L'une d'elles se trouve dans la partie N-terminale de la molécule (64, 127, 139, 140). La fixation de l'héparine au niveau de ce site est fonction de la concentration en calcium (65) et inhibée à une concentration en sels de 0,5 M (127). Un deuxième domaine spécifique de l'héparine peut être obtenu par digestion pronasique. Il s'agit d'un polypeptide de 40 000 daltons, intégré dans la molécule au

niveau de la partie C-terminale (54, 64, 67, 127, 132, 139, 140). Il apparait comme un domaine globulaire, compact, mais contrairement à celui du collagène, il ne possède pas de ponts disulfures intra-moléculaires (63). L'association de ce domaine avec l'héparine est beaucoup moins sensible à la force ionique (127) et indépendante de la concentration en ions divalents (65). Enfin, un troisième domaine ayant une affinité plus faible a été caractérisé dans la région centrale de la molécule (54).

Pour l'instant, on ne connaît pas encore la nature des interactions permettant l'association de la fibronectine avec l'héparine, mais la présence de ces trois sites d'affinité nettement différenciés fait pressentir l'existence d'un mécanisme complexe pouvant être modulé par l'environnement de la molécule.

La fibronectine s'associe également à d'autres protéoglycannes et à l'acide hyaluronique. Ce site de fixation est nettement différencié de celui de l'héparine. Il n'existe pas d'inhibition de la fixation de l'un des composés par l'autre ; en outre, les cinétiques de fixation sont différentes. Ce site est particulièrement spécifique de la séquence disaccharidique  $[\text{GlcUA} (\beta 1-3) \text{GlcNAc} (\beta 1-4)]_{4-5}$ .

L'existence sur la molécule de fibronectine de sites de fixation différents pour le collagène, l'héparine et l'acide hyaluronique suggère que cette molécule doit jouer un rôle central dans l'organisation et dans l'association de ces molécules dans la matrice extracellulaire.

#### D. Autres sites de fixation

La fibronectine s'associe avec la fibrine sérique et ce phénomène est important dans les premiers stades de la coagulation. La

fibrine peut se fixer de façon covalente à la fibronectine sous l'action du facteur XIII<sub>a</sub> transglutaminase (58). Il existe plusieurs sites de reconnaissance de la fibrine ou du fibrinogène sur la molécule de fibronectine (67, 73, 139). Cependant, la fixation covalente catalysée par la transglutaminase s'effectue au niveau d'un résidu de glutamine de l'extrémité N-terminale de la molécule (83, 101, 113, 127, 139).

Plusieurs autres interactions intéressent cette extrémité N-terminale. Cette région se fixe à la paroi de Staphylococcus aureus et à l'actine (64, 79, 88, 112, 137). Bien que les conséquences physiologiques de ces interactions ne soient pas connues pour le moment, la fixation de ces molécules à la fibronectine pourrait induire leur phagocytose par le système réticulo-endothélial.

Enfin, le D.N.A. se fixe également en plusieurs endroits de la molécule de fibronectine (65, 176).

## **V - Fonctions et rôles de la fibronectine**

La fibronectine intervient dans un grand nombre de phénomènes biologiques, mais la fonction qui apparaît comme la plus développée et aussi comme la plus étudiée est celle qu'occupe cette glycoprotéine dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.

### **A - Fibronectine et adhésion inter-cellulaire**

La fibronectine peut induire l'adhésion inter-cellulaire. Des cellules obtenues par dissociation mécanique ou trypsique et placées dans des conditions de culture, voient leur adhésion augmenter par addition de fibronectine dans le milieu de culture. Le modèle le plus simple

d'étude de l'adhésion cellulaire est l'agglutination des hématies. Des érythrocytes fixés à la glutaraldéhyde ou trypsinisés sont rapidement agglutinés par la fibronectine cellulaire et beaucoup moins par la fibronectine plasmatique (154, 170).

Le mécanisme de la fixation de la fibronectine sur la surface cellulaire n'est pas encore connu. Il ne semble pas exister de région particulière de fixation de la fibronectine à la surface de la cellule (27). Des tests d'inhibition d'hémagglutination ont permis de montrer que les lipides acides permettaient d'inhiber la fixation cellulaire de la fibronectine. A cet égard, le ganglioside  $GT_1b$  (Figure 4) est un très bon inhibiteur (89). Les gangliosides ne bloquent pas la fixation de la fibronectine au collagène mais inhibent l'attachement aux cellules. Le  $GT_1b$  et le  $GD_1a$  sont les inhibiteurs les plus actifs suivis du  $GD_1b$ ,  $GM_1$ ,  $GM_2$  ; le  $GM_3$  n'étant pas inhibiteur (89).

Ces glycolipides se fixent à la fibronectine au niveau du domaine de fixation cellulaire par leur partie oligosaccharidique (89, 169, 171). Les phospholipides sont également inhibiteurs de la fixation cellulaire mais à un degré moindre que les gangliosides (66, 171). Par contre les glycopeptides n'ont pas d'action décelable sur cette fixation (171). Ces glycolipides pourraient donc être des récepteurs membranaires de la fibronectine que l'on peut considérer comme une forme complexe de lectine animale.

Il a été également suggéré que le récepteur de la fibronectine pourrait être une protéine ; la reconnaissance et la phagocytose par les macrophages, de billes de latex recouvertes de fibronectine étant inhibée par un traitement protéolytique préalable (56). En outre, des travaux récents suggèrent qu'une glycoprotéine de 47 000 daltons pourrait être récepteur de la fibronectine (8).

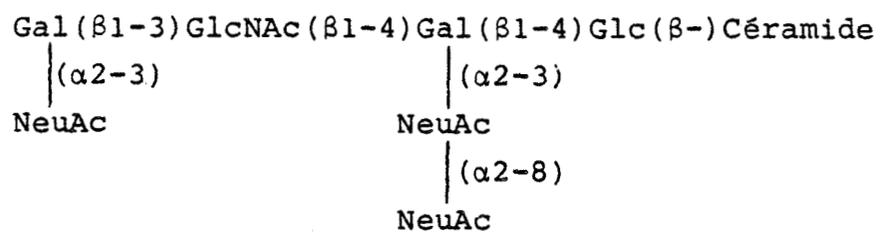


figure 4 - Structure de ganglioside GT<sub>1b</sub>.



Actuellement donc, la nature du récepteur membranaire n'est pas encore clairement définie ; il pourrait s'agir d'une structure complexe associant glycolipide(s) et glycoprotéine(s) membranaires (8).

## **B - Adhésion cellulaire à un substrat**

La fibronectine permet l'adhésion des cellules en culture à un substrat et on peut distinguer l'adhésion des cellules au collagène de l'attachement et de l'étalement aux matériaux plastiques des flacons de culture. Les protéoglycannes jouent également un rôle essentiel dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans ces phénomènes d'adhésion.

### **1 - Organisation de la matrice extracellulaire**

Les interactions existant entre fibronectine et héparine sont un facteur primordial de l'attachement des cellules et les protéoglycannes se retrouvent en concentrations élevées au niveau des zones d'adhésion.

La fibronectine sécrétée par les cellules ou ajoutée dans le milieu de culture, adhère spontanément au substrat de culture (matériaux plastiques ou film de collagène) tapissant le fond des flacons de culture. Cette "couche" de fibronectine semble indispensable à l'attachement et à l'étalement des cellules. Les protéoglycannes se fixeraient à ce film de fibronectine, s'associant en complexes de très haute masse moléculaire et présentant ainsi un nombre élevé de sites de fixation aux molécules de fibronectine fixées spécifiquement à la membrane plasmique de la cellule. Les protéoglycannes sembleraient donc agir comme agents de liaison, interagissant avec les molécules de

fibronectine organisées en deux "couches" distinctes.

La figure 5 schématise l'organisation de la matrice extracellulaire au niveau d'une zone d'adhésion. Elle montre l'organisation de la fibronectine associée aux protéoglycannes, à la membrane cellulaire et au substrat. Cependant, la présence de trois sites de fixation de l'héparine par monomère de fibronectine nous fait pressentir l'existence de plusieurs types d'interactions possibles, ce qui est en faveur d'une structure supramoléculaire beaucoup plus complexe. En outre, au niveau de cette matrice, la fibronectine est souvent associée en complexes multimériques par formation de ponts disulfures. Enfin, la fibronectine fixée à la membrane serait en relation avec le cytosquelette, induisant les modifications de la morphologie de la cellule qui accompagnent les phénomènes d'attachement et d'étalement cellulaires.

## 2 - Attachement des cellules au collagène

La fibronectine s'associe aux différents isomères du collagène natif (types I-IV) bien que l'affinité soit légèrement différente vis à vis de ces différentes formes. Par contre, son affinité augmente après dénaturation du collagène. D'ailleurs, c'est la forme dénaturée de la molécule, la gélatine, qui est utilisée comme support d'affinité pour la purification de la fibronectine (44). In vitro, la fibronectine permet l'attachement des cellules à un film de collagène déposé au fond des flacons de culture. Cette fixation nécessite la présence de facteurs exogènes. L'acide hyaluronique semble, en particulier, augmenter l'affinité de la fibronectine pour le collagène (84, 131).

Cependant, la fibronectine n'intervient pas dans la fixation de toutes les cellules. Elle n'a par exemple aucun effet sur l'atta-

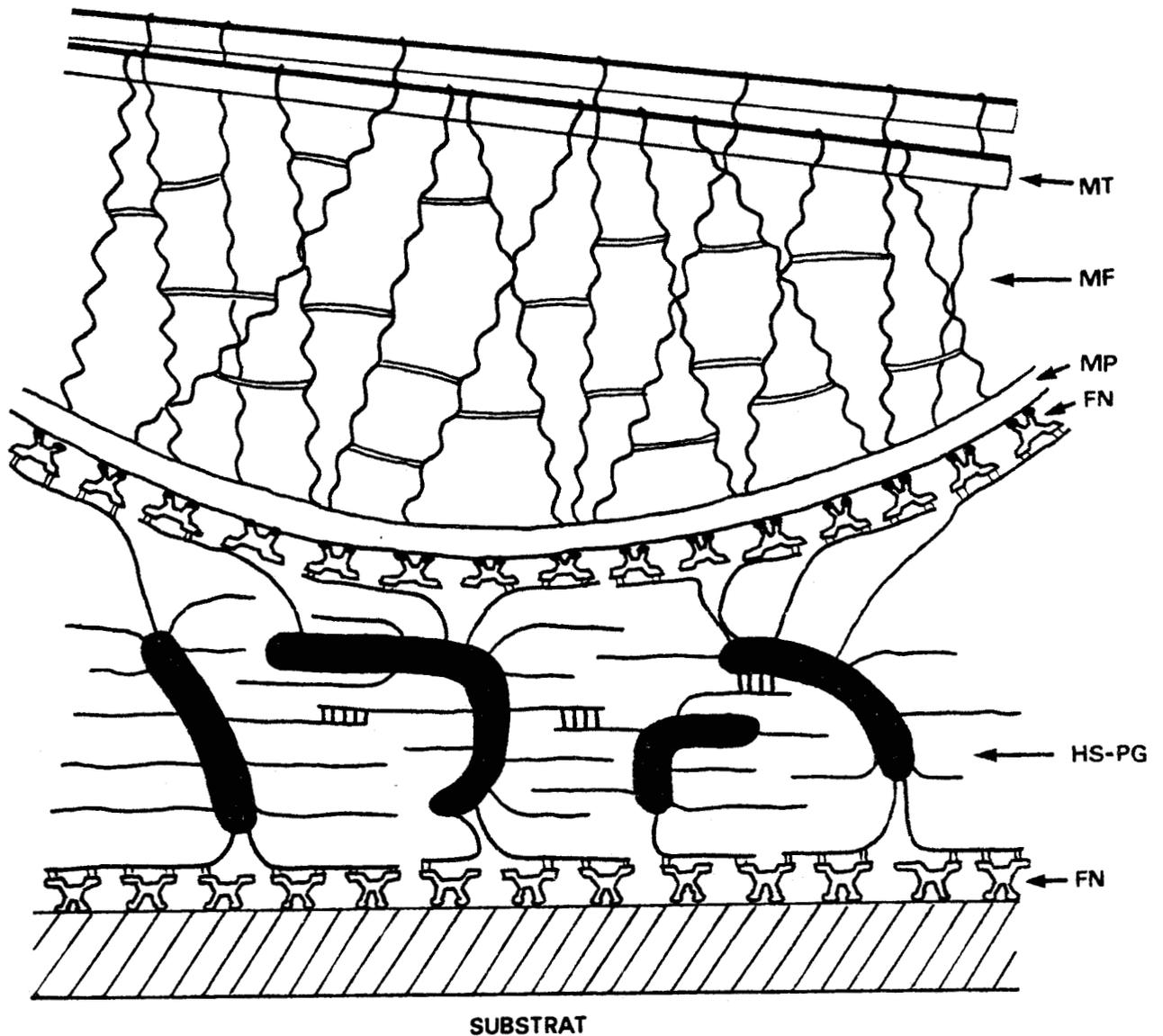


Figure 5 - Schéma de l'organisation de la matrice dans l'adhésion cellulaire à un substrat (collagène ou matériaux plastiques). BUS LILLE

FN : fibronectine ; HS-PG : heparane sulfate protéoglycannes ; MF : micro-filaments ; MT : microtubules MP : membrane plasmique

chement au collagène des chondrocytes et de certaines souches de cellules épithéliales ; ces dernières utilisant respectivement la chondronectine et la laminine (168).

### **3 - Fixation des cellules aux matériaux plastiques**

L'attachement et l'étalement des cellules au substrat (en général, le plastique) dans les cultures de cellules nécessitent la présence de fibronectine. Certaines cellules utilisent la fibronectine du sérum ajouté fréquemment dans le milieu. Les cellules fibroblastiques, synthétisant leur propre fibronectine en quantité suffisante, ne nécessitent pas l'addition de fibronectine plasmatique dans le milieu de culture et s'étaient normalement sur le substrat (57). Certaines estimations suggèrent que 45 000 molécules de fibronectine sont nécessaires à l'étalement total d'une seule cellule fibroblastique (74).

La fibronectine peut être utilisée dans certains cas particuliers de culture cellulaire, en l'absence totale de sérum. La fibronectine plasmatique purifiée peut être préalablement fixée à la surface du flacon de culture, ce qui permet l'attachement et l'étalement de cellules ajoutées en suspension dans un milieu sans sérum.

### **C - Propriétés opsonisantes de la fibronectine**

La fibronectine plasmatique pourrait induire la fixation et l'ingestion de certaines substances par les macrophages et d'autres cellules réticulo-endothéliales. Certaines études ont montré que, par exemple, des billes de latex recouvertes de gélatine étaient phagocytées par les macrophages sous l'action d'un facteur non immun identifié à la fibronectine (19, 20, 56, 59, 106, 151). Cependant, ce phé-

mène nécessite la présence d'héparine en concentration relativement élevée dans le milieu d'incubation, taux largement supérieur à celui que l'on peut rencontrer in vivo. Il est possible que, dans l'organisme, ces deux molécules présentent une synergie d'action.

La fibronectine est capable de se fixer à la bactérie Gram + Staphylococcus aureus (112, 137). Cependant on ne sait pas s'il existe d'autres bactéries qui soient reconnues par la fibronectine et si cette fixation agit sur leur phagocytose par les cellules reticulo-endothéliales.

#### **D - Fibronectine, Hemostase et Thrombose**

La fibronectine joue un rôle important dans l'hémostase et la thrombose, Pendant la coagulation, la fibronectine se lie de manière covalente à la fibrine sous l'action du facteur XIII a transglutaminase (113). La fibronectine peut également jouer un rôle au niveau de l'adhésion plaquettaire. Dans le cas d'une lésion vasculaire, les plaquettes sanguines adhèrent aux fibres de collagène de la paroi vasculaire. Or, l'addition de fibronectine semble augmenter l'adhésion des plaquettes. Le rôle de la fibronectine pourrait cependant se limiter à favoriser l'étalement des cellules sans intervenir dans la promotion de l'adhésion plaquettaire ni dans les phénomènes de dégranulation (81).

Le rôle de la fibronectine endogène plaquettaire, stockée dans les granules  $\alpha$  et qui se fixe à la surface des plaquettes lors de la dégranulation, n'est toujours pas connu.

#### **E - Fibronectine, mobilité cellulaire et chimiotactisme**

Il a été montré que la fibronectine pouvait augmenter l'importance et le caractère directionnel de la migration des cellules fibroblastiques in vitro.

Elle permettrait, en particulier, la migration des cellules isolées ainsi que la dispersion d'agrégats cellulaires (5, 126). Les interactions avec le cytosquelette, les propriétés d'adhésion cellulaire et d'adhésion au substrat de la fibronectine sont vraisemblablement impliquées dans ce phénomène mais, pour le moment, les mécanismes qui coordonnent ces différentes propriétés restent inconnus. Il est possible que les effets de la fibronectine sur la migration cellulaire et sur le chimiotactisme puissent être impliqués dans la réparation des tissus blessés.

#### **F - Fibronectine, développement embryonnaire et différenciation cellulaire**

Le rôle de la fibronectine dans la migration des cellules en culture est en faveur du fait que cette glycoprotéine puisse induire ou guider la migration des cellules dans l'embryon, la fibronectine étant associée à différentes zones de migration cellulaire de l'embryon (32, 69, 143). Parallèlement, il apparaît une perte de la fibronectine cellulaire pendant la formation des tissus musculaire et cartilagineux dans le développement embryonnaire et des différences similaires dans le taux de fibronectine cellulaire ont également été décrites in vitro (25, 124).

En outre, la fibronectine semble avoir un rôle d'inhibiteur de la différenciation cellulaire. L'addition de fibronectine exogène induit la dédifférenciation des chondrocytes avec un retour à des caractères de cellules mésenchymateuses (morphologie, synthèse des protéoglycannes sulfatés, type de collagène synthétisé). Il semble que la fibronectine doive disparaître de ce tissu afin de permettre un développement normal du cartilage (124, 161).

Un effet inhibiteur similaire a été observé in vitro sur la fusion des membranes plasmiques des myoblastes lors de la formation du tissu muscu-

laire. Des concentrations relativement élevées de fibronectine inhibent la fusion des cellules bien que cette glycoprotéine soit nécessaire à l'adhésion des cellules dans les premiers temps de la culture (29).

Le rôle de la fibronectine dans les phénomènes de différenciation cellulaire suggère que cette molécule exogène possède une grande influence sur le métabolisme intracellulaire.

## **VI - Biosynthèse et régulation**

La fibronectine est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granulaire. Le niveau de synthèse peut être régulé par la quantité de m RNA codant pour cette glycoprotéine. Le m RNA de la fibronectine a été isolé et le DNA complémentaire a été cloné dans une bactérie (46). La fibronectine est synthétisée tout d'abord sous forme monomérique. Elle se dimérise rapidement et la molécule néosynthétisée se retrouve exportée à l'extérieur de la cellule, portant alors des glycanes de type N-acetyllactosaminique, trente minutes après le début de la synthèse (30).

La fibronectine est sécrétée soit directement à la surface de la cellule où elle forme des structures multimériques par ponts disulfures intermoléculaires, soit dans le milieu de culture. Les mécanismes de l'organisation de la fibronectine avec les autres macromolécules constituant la matrice extracellulaire ne sont toujours pas connus. La vitesse de renouvellement de cette glycoprotéine à la surface cellulaire est relativement lente, sa demi-vie étant de 30-36 heures (119). Celle-ci s'accélère sensiblement dans le cas de cellules transformées ou si la fibronectine n'est pas glycosylée, elle est alors plus sensible à l'action protéolytique (25, 80, 117, 118).

Enfin, la synthèse de la fibronectine peut être modulée par l'action d'hormones (25) et il semble qu'au niveau des cellules en culture, le taux de fibronectine diminue pendant la mitose (144).

## VII - Fibronectine et cancer

Nous avons vu, dans les chapitres précédents, le rôle important que joue la fibronectine dans les nombreux processus biologiques où son action a été mise en évidence (adhésion et organisation des cellules dans la matrice tissulaire, opsonisation des macrophages, agrégation plaquettaire etc ...). L'intérêt porté à cette glycoprotéine a permis de caractériser sa structure de manière relativement détaillée et en particulier de définir l'existence de différents domaines fonctionnels montrant l'étroite relation entre structure et fonctions de la fibronectine.

Les différents domaines semblent avoir des structures différentes en ce qui concerne leur taille, le degré de stabilisation par des ponts disulfures, et l'existence ou non de glycanes. Cette molécule n'en reste pas moins étirée et flexible dans son ensemble, ce qui laisse supposer l'existence de régions charnières entre les différents domaines, régions particulièrement exposées à l'attaque protéolytique. Cette molécule est donc, bien que glycosylée, très sensible à la dégradation.

### A - Conséquences de la diminution de la fibronectine cellulaire

Une des raisons de l'intérêt porté à la fibronectine est sa diminution de la surface des cellules transformées. Cette perte de fibronectine de la surface cellulaire caractérisée par Hynes en 1973 au niveau de culture de cellules viro-transformées (75) a été mise en évidence par de nombreux auteurs utilisant différentes méthodes de marquage de la surface cellulaire. Cette diminution de la quantité de fibronectine a été caractérisée au niveau d'un nombre important de types cellulaires (Tableau VI). Ces cellules peuvent provenir soit de la transformation virale d'une cellule en culture, de tumeurs cancéreuses animales ou humaines établies en culture,

## Tableau VI - Fibronectine et cellules transformées

Diminution de la fibronectine de la surface des cellules transformées par différents agents (148).

PERTE DE LA FIBRONECTINE ASSOCIEE A LA MEMBRANE			
VIRUS	ANIMAL	TYPE CELLULAIRE	REFERENCES
<u>. Comparaison cellules normales/cellules transformées viralement</u>			
RSV	Poulet Rat	cellules embryonnaires NRK, myoblastes L8	86,119,128,149,160
Polyome	Hamster Souris	NIL, BHK 21 3T3, 3T6, C. embryon.	51,52,71,75,122
SV 40	Homme Souris	WI-38 3T3	31,51,71,149,150
HSV	Hamster	NIL, BHK 21	75,158
MSV	Souris	3T3	71
Adénovirus	Rat	Cellules embryonnaires	26
<u>. Comparaison cellules normales/C. transformées par un virus thermosensible</u>			
RSV			80,119,128,149
Polyome			53
SV 40			82
DIMINUTION DE LA SYNTHÈSE DE FIBRONECTINE			
RSV	Poulet	Cellules embryonnaires	119
Astrocytome humain			150
Sarcome humain			111,149,150
Résultats discordants			22,40,82,104,121
Abréviations: RSV: virus du sarcome de Rous HSV: virus du Sarcome de Hamster MSV: virus du Sarcome de la Souris			

ou de la transformation chimique ou spontanée de cultures cellulaires normales.

Il nous paraît important à ce niveau de redéfinir ce que l'on entend par cellule transformée, par opposition aux cellules "normales" (35). Le critère commun aux différentes cellules cancéreuses, quelle que soit leur origine, est la tumorigénicité qui se définit comme la propriété d'induire la formation rapide de tumeurs malignes après injection de ces cellules à l'animal. D'autres critères ne sont pas absolus, comme la modification de la morphologie, la perte de l'inhibition de contact, l'apparition de néo-antigènes, ou, comme dans le cas présent, la diminution du taux de fibronectine associée à la membrane, et ne peuvent être retenus comme preuves de la transformation maligne. Par opposition, une cellule en lignée établie est considérée comme "normale", si elle n'est pas tumorigène. Les modifications des glycoconjugués des cellules transformées, phénomène qui va dans le sens d'une simplification des glycolipides (62) et d'une polyantennarisation des glycoprotéines pourrait être également un caractère commun aux différentes cellules transformées. Cependant, ce phénomène de polyantennarisation semble se retrouver dans d'autres cas pathologiques.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la perte de fibronectine de la surface cellulaire n'est pas un marqueur absolu de l'oncogénicité. En effet, il existe un certain nombre d'exceptions à cette règle. Une cellule ne possédant pas ou peu de fibronectine cellulaire n'est pas obligatoirement oncogène ; et inversement, il existe certaines cellules oncogènes dont le taux de fibronectine associée à la membrane reste normal (22, 40, 82, 104, 121).

La diminution de la fibronectine de la surface des cellules tumorales est souvent associée au pouvoir métastasant de la cellule, la fibronectine n'existant souvent qu'en très faible quantité au niveau des tumeurs (28, 142). Nous avons vu le rôle primordial de cette glycoprotéine dans l'orga-

nisation de la matrice extracellulaire. La diminution de la fibronectine cellulaire a obligatoirement des conséquences au niveau de l'assemblage et de la structure de cette matrice, induisant une désorganisation du réseau fibrillaire qui entoure les cellules. L'apparition de tumeurs secondaires par l'implantation de cellules tumorales au niveau d'organes cibles s'opère par essaimage des cellules de la tumeur primaire. Une désorganisation de la matrice extracellulaire ne peut que favoriser le départ des cellules de la tumeur primaire et on entrevoit à ce niveau les conséquences que peut avoir la diminution de la fibronectine cellulaire. Pour le moment on ne sait rien d'un hypothétique rôle de la fibronectine plasmatique dans les phénomènes de métastase in vivo.

Dans les cultures cellulaires, la fibronectine induit l'attachement et l'étalement des cellules au substrat. La perte de cette glycoprotéine et la désorganisation de la matrice extracellulaire qui en découle se traduit par des modifications morphologiques des cellules transformées. La plupart des cellules tumorigènes possèdent une morphologie caractéristique ; elles apparaissent comme de petites cellules rondes, n'adhérant que faiblement au substrat et réparties anarchiquement, avec l'existence de nombreux agrégats cellulaires. L'addition de fibronectine purifiée dans le milieu de culture de fibroblastes transformés entraîne un réattachement spontané de la fibronectine à la membrane plasmique. La fibronectine se réarrange en un réseau fibrillaire apparemment normal et les cellules ont tendance à s'étaler au substrat reprenant ainsi une morphologie de cellule fibroblastique normale. En outre, lorsque les cellules parviennent à confluence, certaines souches ont tendance à s'aligner comme le feraient des cellules normales. Ce "retour à la normale" nécessite la réacquisition de l'adhésion intercellulaire et de l'attachement des cellules au substrat, phénomènes dans lesquels la fibronectine joue un rôle primordial.

Parallèlement, la fibronectine agit sur l'architecture de la surface

cellulaire. Elle diminue le nombre des microvillosités affectant la surface membranaire des cellules transformées. Enfin elle permet le réarrangement du cytosquelette, perturbé dans les cellules transformées (6, 164). Cependant, dans ce type d'expériences, il n'y a pas à proprement parler "détransformation" de la cellule. L'addition de fibronectine exogène rend à la cellule maligne les caractères morphologiques d'une cellule "saine", mais elle n'en reste pas moins tumorigène (6, 164).

Dans les expériences de "détransformation" utilisant des mutants viraux thermo-sensibles dont l'expression peut être inhibée par élévation de la température, la fibronectine péricellulaire, détectée par immunofluorescence, réapparaît une à deux heures après le début du processus et se développe avec une cinétique comparable à celle observée lors de la remise en culture de cellules trypsinisées (160). Ceci induit le réattachement et le réarrangement de ces cellules sur le substrat.

Durant la transformation, le phénomène est beaucoup plus difficile à observer. Le réseau dense de fibronectine péricellulaire ne disparaît que très lentement et il n'est pas possible d'apprécier de façon précise comment, au niveau d'une cellule, s'opère la dissociation de la matrice (80, 160).

Tous ces phénomènes peuvent être comparés à ce qui se passe au niveau des cellules en mitose. Pendant la division cellulaire, la cellule prend une forme sphérique et des études ont montré que le taux de fibronectine associée à la membrane diminuait sensiblement (144). La cellule cancéreuse peut être considérée comme une cellule en perpétuelle division (la croissance cellulaire étant fortement augmentée dans les cellules transformées). Il est donc vraisemblable qu'il existe une interdépendance de ces différents phénomènes.

## **B - Raisons de la diminution de la fibronectine associée à la membrane des cellules transformées**

Pourquoi la quantité de fibronectine diminue-t-elle à la surface des cellules transformées ? La comparaison des propriétés structurales et biologiques des fibronectines normales et transformées a été entreprise afin de tenter d'expliquer ce phénomène. Pour le moment, cette question reste sans réponse et nous examinerons les différentes hypothèses avancées pour tenter d'expliquer cette diminution.

### **1 - Diminution de la synthèse de la fibronectine**

Nous avons vu que le taux de synthèse de la fibronectine pouvait être régulé par la quantité de RNA messenger codant pour cette glycoprotéine. Sa diminution de la surface des cellules cancéreuses pourrait donc être partiellement expliquée par une diminution sensible du taux de m RNA de la fibronectine (1). Il est d'ailleurs vraisemblable que cette régulation de la transcription génique soit également à l'origine de la diminution de fibronectine dans les cellules en mitose. Cependant, certaines cellules transformées ne possédant pas ou peu de fibronectine associée à la membrane ont un taux de synthèse quasiment normal (68) et, bien que certaines études aient démontré l'existence d'une diminution de cette synthèse associée à la transformation (1, 77, 119), ce phénomène ne peut expliquer que partiellement la désorganisation totale de la matrice extracellulaire et d'autres altérations doivent être en cause.

## **2 - Augmentation de la sensibilité aux protéases**

La possibilité d'une dégradation protéolytique de la fibronectine associée à la transformation maligne a été avancée (102, 119, 162). En particulier, lors de sa purification, la fibronectine transformée est très sensible à l'action des protéases (158). Pour l'instant, les travaux effectués afin de vérifier cette hypothèse n'ont pas permis de montrer de manière évidente l'existence de cette dégradation au niveau de lamatrice extracellulaire bien que le turn-over de cette glycoprotéine soit plus rapide dans le cas des cellules transformées (102, 117, 119).

## **3 - Modifications de structure de la fibronectine des cellules transformées**

Des travaux récents ont tenté de caractériser au niveau de la fibronectine des cellules transformées, des modifications de structure qui pourraient expliquer sa disparition de la surface cellulaire. Il ne semble pas que la fibronectine transformée ait une structure primaire modifiée. Elle est sécrétée dans le milieu de culture sous forme dimérique et les fragments obtenus par dégradation protéolytique ménagée sont parfaitement comparables à ceux de la fibronectine normale (4, 158). Par contre, elle pourrait posséder une structure secondaire différente. La fibronectine transformée semble plus sulfatée (165) et/ou plus phosphorylée (4). Ces modifications des charges portées par la molécule peuvent induire des modifications de sa transformation, modifications qui pourraient expliquer l'abaissement du point isoélectrique (134), l'augmentation du nombre de groupements amines libres accessibles à l'action de la transglutaminase (129), l'augmentation de la sensibilité aux protéases (158) et les changements dans la réponse

immunitaire de la molécule. La modification des structures glycaniques et en particulier l'augmentation du nombre de résidus d'acides sialiques pourrait également modifier la charge globale et la conformation de la molécule.

La diminution de la quantité de fibronectine associée à la membrane pourrait donc être due à un changement de conformation induisant une perte d'affinité de cette glycoprotéine vis-à-vis de la membrane cellulaire.

#### **4 - Perte des récepteurs de la fibronectine à la surface de la cellule transformée**

La diminution de fibronectine de la surface cellulaire pourrait également être due à une disparition ou à une diminution des récepteurs membranaires de la fibronectine. Les interactions qui régissent la fixation de cette glycoprotéine à la membrane ne sont pas encore parfaitement définies, mais les gangliosides et, en particulier le ganglioside  $GT_1b$ , semblent jouer un rôle important dans cette fixation (89). Le rôle d'une glycoprotéine de 47 000 daltons a également été suggéré dans l'adhésion de la fibronectine aux cellules (8). Comme les troubles de la glycosylation semblent affecter à la fois glycolipides et glycoprotéines cellulaires, la perte de fibronectine extracellulaire pourrait être causée par des modifications de ces constituants importants dans sa fixation (8). En particulier, des tests d'inhibition d'héماغglutination ont montré que des gangliosides plus simples que les  $GT_1b$  semblaient avoir moins d'affinité vis à vis de la fibronectine et la transformation maligne s'accompagne d'une simplification des structures glycaniques des glycolipides membranaires (62). Cependant cette hypothèse est en contradiction avec le fait que l'introduction de fibronectine exogène dans le milieu de culture de cellules transformées

induite dans de nombreux cas leur réattachement au substrat. La diminution de la fibronectine de la membrane et la perte d'adhésivité cellulaire qui en découle semblent donc résulter d'un processus complexe induit par la modification de différents facteurs cellulaires qui pourraient être modulés en fonction du type cellulaire et, bien que plusieurs hypothèses soient actuellement avancées, aucune explication n'est encore donnée à cette perte de fibronectine péricellulaire.

## TRAVAUX PERSONNELS

Afin d'essayer de mieux comprendre ces phénomènes et de mieux définir les modifications de structures des glycanes de la fibronectine des cellules transformées, nous avons entrepris l'étude de la partie glycanique de cette glycoprotéine isolée des milieux de culture de fibroblastes viro-transformés.

Pour cela, nous avons utilisé un schéma de fractionnement mis au point au laboratoire par Debray et al. (36) pour l'étude des modifications de structures des glycoprotéines cellulaires. Ce schéma de fractionnement est basé sur l'incorporation au niveau des chaînes glycaniques de monosaccharides radioactifs ajoutés dans le milieu de culture cellulaire et comparaison en double marquage du comportement chromatographique des glycopeptides pronasiques et des glycanes de fibronectine transformée par rapport à ceux de la fibronectine cellulaire normale.

Après purification, les glycopeptides ont été co-chromatographiés :

- en fonction de leur masse moléculaire par chromatographie de tamisage moléculaire
- en fonction de leur affinité vis-à-vis de la Concanavaline A et de la lectine de Lens culinaris, insolubilisées sur Sepharose
- après libération des glycanes par hydrazinolyse/N-réacétylation, en fonction de leur charge par chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions.

Cette technique de fractionnement permet d'obtenir des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs sur la nature des structures glycan-

niques étudiées. En outre, l'utilisation de produits radioactifs permet de travailler sur des quantités faibles de produit tout en négligeant la contamination par des protéines du sérum de veau ajouté dans le milieu de culture comme facteur de croissance.

## MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre rappelle brièvement les techniques que nous avons utilisées lors de cette étude.

### I - MATERIELS

Les monosaccharides radioactifs : D - [1 -  $^{14}\text{C}$ ] glucosamine, D - [6 -  $^3\text{H}$ ] glucosamine et D - [2 -  $^3\text{H}$ ] Mannose proviennent de la firme Amersham ; les supports d'affinité : Gélatine-Sepharose 4-B, Con-A-Sepharose 4-B, Protéine A-Sepharose 4-B proviennent de la firme Pharmacia. Le S.D.S., l'acrylamide et le N,N' - méthylènebisacrylamide de B.D.H. laboratories ; le P.M.S.F. de Eastman C° (U.S.A.) ; la Pronase de Calbiochem (U.S.A.) et l'hydrazine anhydre de la société Pierce.

### II - METHODES

#### A. Conditions de culture cellulaire et de marquage métabolique.

Dans cette étude, nous avons utilisé comme cellule de référence le fibroblaste embryonnaire de hamster (cellule E.H.) et comme cellule transformée, le fibroblaste de rein de hamster transformé par le virus du sarcome de hamster (cellule BHK -HSV). Nous remercions le Professeur L. Montagnier de l'Institut Pasteur de Paris qui nous a fourni ces souches cellulaires.

Ces cellules sont maintenues en culture dans le milieu minimum de Eagle complété par :  $\text{NaHCO}_3$  33 mM ; L. Glutamine, 2 mM ; Bactotryptose, 0,3 % ; Auréomycine, 5  $\mu\text{g/ml}$  ; Fungizone, 25  $\mu\text{g/ml}$  ; 10 % de sérum de veau nouveau-né. Dans certains cas, la fibronectine du sérum de veau est éliminée par chromatographie d'affinité sur Gélatine - Sepharose 4-B (44).

Le marquage métabolique est effectué par addition dans le milieu de culture, au moment du repiquage, pour les cellules E.H., de 125  $\mu\text{Ci}$  de D - [6- $^3\text{H}$ ] glucosamine (activité spécifique 30 Ci/mM) ou de D - [2- $^3\text{H}$ ] Mannose, (activité spécifique 15 Ci/mM) et pour les cellules BHK-HSV, de 25  $\mu\text{Ci}$  de D - [1- $^{14}\text{C}$ ] glucosamine (activité 55 mCi/mM)

Ces cellules sont cultivées en présence du précurseur radioactif pendant 48 à 72 heures afin d'obtenir une culture confluente.

## **B. Purification de la fibronectine**

Après marquage métabolique, la fibronectine est isolée des milieux de culture par chromatographie d'affinité sur colonne de Gélatine-Sepharose 4-B (44) selon la méthode décrite par Wagner et al (158). Le milieu de culture (environ 30 ml) est récupéré, additionné d'E.D.T.A. et de P.M.S.F. (préalablement dissout dans 1 ml d'éthanol) à une concentration de 5 mM et 2 mM respectivement. Ce milieu est ensuite réfrigéré à 4°C et centrifugé à 2 000 rpm afin d'éliminer les cellules en suspension. Ces étapes préliminaires sont effectuées le plus rapidement possible afin de limiter au maximum la dégradation protéolytique.

A ce stade, le milieu débarassé des cellules en suspension est, soit stocké congelé à - 20°C, soit directement injecté sur la colonne d'affinité. Avant la colonne de gélatine-Sepharose 4-B (10 x 1,5 cm) le milieu de culture est passé sur une colonne de Sepharose 4-B (10 x 1,5 cm) afin d'éliminer d'éventuels contaminants non-spécifiques. Ces deux colonnes sont montées en série et équilibrées dans le NaCl/Pi additionné d'E.D.T.A. (2 mM) et de P.M.S.F. (2 mM), le débit étant d'environ 10 ml/h. Après un lavage prolongé par le même tampon (vérifié par mesure de la D.O. à 280 nm et comptage de la radioactivité d'une aliquot de l'éluat), la fibronectine est éluee de la colonne de Gélatine-Sepharose 4-B par l'urée 4M dans le NaCl/Pi. Des fractions de 2 ml sont récupérées et l'élution est suivie par mesure de la radioactivité. Le pic radioactif élué est dialysé dans l'eau

Toutes les étapes de ce fractionnement sont effectuées à 4°C.

## **C. Electrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S.**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. des fractions purifiées de fibronectine est effectuée selon la technique de Kerkaert (87) utilisant le système tampon discontinu de Laemmly (96,97). Nous avons utilisé comme gel de séparation, un gradient de polyacrylamide de 5 à 25 %, le gel de concentration étant de 5 %. La masse moléculaire est déterminée par rapport à un mélange de protéines témoins provenant de la firme Pharmacia (High molecular weight calibration kit proteins).

Après concentration, les échantillons (50 000 dpm environ) sont repris par 50  $\mu$ l de Tampon Tris/HCl 0,3 M pH 8,9 ; 5 % S.D.S. ; 5 % B-mercaptoéthanol ; 20 % glycérol ; le bleu de bromophénol est ajouté comme témoin de migration. Avant l'injection, les échantillons sont portés à 100°C pendant 2 minutes. Après électrophorèse et séchage du gel, la fibronectine marquée est visualisée par autoradiographie.

#### D. Immunoprécipitation

Vu les quantités très faibles de fibronectine isolée à partir des milieux de cultures des cellules transformées, il nous était impossible de réaliser une immunoprécipitation classique. Nous sommes donc passés par l'intermédiaire de la protéine A de Staphylococcus aureus insolubilisée sur Sepharose 4-B pour précipiter la fibronectine. L'échantillon concentré est repris par 1 ml de NaCl/Pi ; E.D.T.A. : 5 mM ; P.M.S.F. : 2 mM.

L'antiserum anti-fibronectine (10  $\mu$ l) est préalablement incubé avec 25  $\mu$ l de protéine A-Sepharose 4-B en suspension dans 200  $\mu$ l de NaCl/Pi. Après 1 heure à 30°C et plusieurs lavages par le NaCl/Pi, le complexe Ig-G antifibronectine-Protéine A-Sepharose 4-B est ajouté à l'échantillon. Après 16 heures à 4°C et plusieurs lavages par 1 ml de NaCl/Pi, le complexe antigène-anticorps est repris par 50  $\mu$ l de tampon d'électrophorèse et les bandes radioactives sont visualisées par électrophorèse et autoradiographie.

#### E. Préparation des glycopeptides

Les glycopeptides sont préparés à partir des échantillons de fibronectine purifiée par hydrolyse pronasique selon la méthode de Muramatsu et al (115). Après concentration, les échantillons sont repris par 7 ml de tampon Tris/HCl 0,14 M pH 8,4 ; CaCl<sub>2</sub> 14 mM, additionné de 5 mg de Pronase. L'hydrolyse est réalisée à 37°C pendant 72 h sous légère agitation, 2,5 mg de Pronase étant ajoutés après 24 h et 48 h d'incubation. Après hydrolyse, l'excès de Pronase est dénaturé par chauffage 2 minutes à 100°C et les échantillons glycopeptidiques sont purifiés par gel filtration sur Biogel P2 équilibré dans l'eau.

A ce niveau, les glycopeptides marqués par la D-[6-<sup>3</sup>H] glucosamine (cellules normales) et D-[1-<sup>14</sup>C] glucosamine (cellules transformées) sont rassemblés et toutes les étapes suivantes sont réalisées en mélange, la mesure de la radioactivité étant effectuée par comptage en double marquage dans un compteur à scintillation liquide Beckman LS 9 000.

#### F. Libération des glycannes par hydrazinolyse et N-réacétylation

Les glycannes sont préparés par hydrazinolyse des fractions glycopeptidiques selon la méthode de Bayard et Montreuil (14). Les échantillons lyophilisés sont dissous dans 0,5-1 ml d'hydrazine anhydre et portés à 105°C pendant 20 heures. L'hydrazine est évaporée sous courant d'azote, avec plusieurs rinçages par le toluène, le résidu sec est mis dans un dessiccateur sous [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] afin d'éliminer les traces d'hydrazine.

Les glycannes libérés sont alors N-réacétylés par l'anhydride acétique. Les glycannes désacétylés sont repris par 0,3 ml de NaHCO<sub>3</sub> saturé auxquels on ajoute 3 x 10 µl d'anhydride acétique à 1 heure d'intervalle. A la fin de la réaction l'excès de NaHCO<sub>3</sub> est neutralisé par l'acide acétique à 1 %. Les échantillons sont ensuite desalés sur une colonne de Biogel P2 équilibrée dans l'eau. Les glycannes purifiés sont ensuite concentrés à l'évaporateur rotatif, repris par 2 ml d'H<sub>2</sub>O, filtrés sur filtre Millipore 0,22 µm et lyophilisés.

#### G. Gel filtration

Les glycopeptides pronasiques et les glycannes libérés par hydrazinolyse ont été chromatographiés par Gel filtration sur une colonne d'Ultrogel AcA 202 (1,6 x 100 cm) équilibrée dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4 ; NaCl 0,17 M. Les échantillons concentrés sont repris par 0,5 ml de tampon et injectés sur la colonne. Le débit d'élution est de 9 ml/h et des fractions de 1,5 ml sont recueillies. Le volume d'exclusion est de 60 ml (40 fractions) : une aliquot de chaque fraction est prélevée pour comptage de la radioactivité et les résultats sont exprimés pour chacun des isotopes en fonction de la radioactivité totale.

## H. Chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines insolubilisées

### 1. Fractionnement sur colonne de Con A-Sepharose 4-B

Les échantillons glycopeptidiques sont fractionnés en fonction de leur affinité vis à vis de la Con A-Sepharose 4-B (colonne de Con A-Sepharose 4-B Pharmacia de 10 x 1 cm, équilibrée dans un tampon Acétate de sodium 5mM pH 5,2 ; NaCl 0,1 M ; CaCl<sub>2</sub> 1 mM ; MnCl<sub>2</sub> 1 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1 mM). A ce pH, la Concanavaline A se trouve sous forme dimérique. Les échantillons sont repris par 0,5 ml de tampon, injectés, et la colonne rincée par 30 ml de tampon (5 fois son volume), puis éluée par l' $\alpha$ -M. Glc ( $\alpha$ -methyl-D-glucoside) ; tout d'abord par 30 ml d' $\alpha$ -M. Glc 10 mM, puis par 30 ml d' $\alpha$ -M. Glc 0,3 M, en solution dans le même tampon. Le débit d'éluion est de 9 ml/h et on recueille des fractions de 1,5 ml. Les différents pics d'éluion obtenus sont des-salés sur Biogel P2 équilibré dans l'eau et repris par 0,5 ml de NaCl/Pi en vue du fractionnement suivant.

### 2. Fractionnement sur colonne de L.C.A.-Sepharose 4-B

Les différentes fractions obtenues sur Con A-Sepharose 4-B sont chromatographiées sur colonne de Lens Culinaris agglutinine immobilisée sur Sepharose 4-B par la technique au bromure de cyanogène (103), à raison de 5 mg de lectine par millilitre de gel. La préparation de L.C.A. utilisée pour le couplage a été effectuée au laboratoire selon la méthode de Toyoshima et al (147). La colonne (10 x 1 cm) dans le NaCl/Pi et le fractionnement a été effectué dans les mêmes conditions de débit que précédemment. Après rinçage par 30 ml de NaCl/Pi, la colonne est éluée par l' $\alpha$ -M.Glc 0,15 M en solution dans NaCl/Pi. Les fractions glycopeptidiques obtenues sont ensuite dessalées sur Biogel P2 équilibré dans l'eau et lyophilisées afin d'être soumises à l'action de l'hydrazine.

## I. Fractionnement des glycanes libérés par hydrazinolyse, par chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions

Les glycanes libérés par hydrazinolyse et N-réacétylés ont été fractionnés, en fonction du nombre de résidus d'acides sialiques, par H.P.L.C. d'échange d'ions sur une colonne Micropak AX-10 (Varian Associates) selon la méthode de Baenziger et Natowicz (10).

ies conditions expérimentales sont les suivantes : phase mobile :  $H_2O$  ; élution par un gradient discontinu de  $KH_2PO_4$  pH 4,0 ; débit 1 ml/min. ; fractions 0,64 ml comptées directement en scintillation liquide. Après lyophilisation, les échantillons préalablement filtrés sont repris par  $H_2O$  (50  $\mu$ l) et injectés, la colonne étant équilibrée dans l'eau. Après 10 minutes de rinçage, la concentration en  $KH_2PO_4$  est amenée linéairement de 0 à 25 mM en 10 minutes. Cette concentration est maintenue à 25 mM pendant 5 minutes, puis augmentée, toujours linéairement, à 100 mM en 30 minutes. La fraction neutre n'est pas retenue sur la colonne et éluee directement par  $H_2O$ , les glycanes acides étant élués par des concentrations croissantes de  $KH_2PO_4$ .

Pour étalonner la colonne, nous avons utilisé les glycanes de l'orosomucoïde libérés par hydrazinolyse et N-réacétylés par l'anhydride acétique  $^{14}C$ . Comme précédemment, les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale de chaque isotope. Les quantités injectées variant entre 10 et 50 000 d.p.m.

## RESULTATS

### I - Purification de la fibronectine

Bien que la fibronectine semble disparaître de la surface des fibroblastes transformés, une fibronectine peut être isolée, après marquage métabolique, à partir des milieux de culture des cellules transformées. Afin d'en étudier la partie glycanique, nous avons effectué le marquage par addition dans le milieu de culture, de monosaccharides radioactifs. Ceux-ci, en s'intégrant dans les chaînes glycaniques de la fibronectine néo-synthétisée, nous ont permis de travailler sur des quantités de produits très faibles. Cette étude a été effectuée par comparaison du comportement chromatographique des fractions glycopeptidiques et/ou glycaniques obtenues à partir des deux types de cellules. Nous avons donc utilisé pour le marquage, des isotopes différents ( $^3\text{H}$  pour les cellules normales,  $^{14}\text{C}$  pour les cellules transformées) ce qui nous a permis de co-chromatographier ces deux fractions en mélange, diminuant ainsi les causes d'erreurs.

Les quantités de fibronectine marquée, exprimées en dpm, purifiée par chromatographie d'affinité sur Gélatine-Sepharose 4-B, diminuent sensiblement dans le cas des cellules transformées et varient également en fonction du précurseur utilisé. Dans le cas d'un marquage par la D-glucosamine, nous avons obtenu en moyenne après élution, un pic de radioactivité d'environ 400 000 dpm  $^3\text{H}$  pour les cellules normales, alors qu'il n'est que de 60 000 dpm  $^{14}\text{C}$  par flacon de culture pour les cellules transformées. Cependant afin de poursuivre la suite du fractionnement en double marquage, les glycopeptides pronasiques ont été

mélangés en quantité égale, le comptage de la radioactivité pouvant être faussé par un trop large excès de l'un des isotopes.

Dans le cas d'un marquage par le mannose radioactif, seul le pré-curseur tritié (D-[2-<sup>3</sup>H] Mannose) a été utilisé. En effet, l'utilisation du D-[U-<sup>14</sup>C] Mannose ne permet pas d'obtenir un marquage spécifique des résidus de mannose de la glycoprotéine. La spécificité du marquage a été vérifiée par hydrolyse des glycopeptides par l'acide trifluoroacétique et séparation des monosaccharides libérés par chromatographie descendante sur papier. Les glycopeptides obtenus à partir des deux types de fibronectine sont donc, dans ce cas, fractionnés séparément. L'incorporation du D-[2-<sup>3</sup>H] Mannose dans les chaînes glycaniques est beaucoup plus faible pour les deux types cellulaires et la radioactivité récupérée d'autant plus réduite pour les cellules transformées.

Les cellules transformées secrètent une fibronectine dimérique possédant la même affinité vis-à-vis du collagène dénaturé que la fibronectine cellulaire normale (158). Elle migre en électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. après réduction comme un polypeptide de 210 000 à 230 000 daltons. Cependant, nous avons observé une nette augmentation de la sensibilité de la fibronectine transformée à la dégradation protéolytique pendant les étapes de purification bien que celles-ci soient réalisées en présence d'inhibiteurs des protéases (E.D.T.A. et P.M.S.F.) et à 4°C. Il est apparu dans nos préparations des fragments peptidiques et, en particulier, un fragment majeur de 100-110 000 daltons de masse moléculaire, glycosylé car visualisé par autoradiographie après marquage métabolique (Figure 6).

Afin de vérifier que ce fragment purifié par chromatographie d'affinité sur Gélatine-Sepharose 4-B provenait bien de la dégradation de la fibronectine sécrétée par les cellules transformées, nous l'avons fait réagir avec des anticorps anti-fibronectine en utilisant la méthode

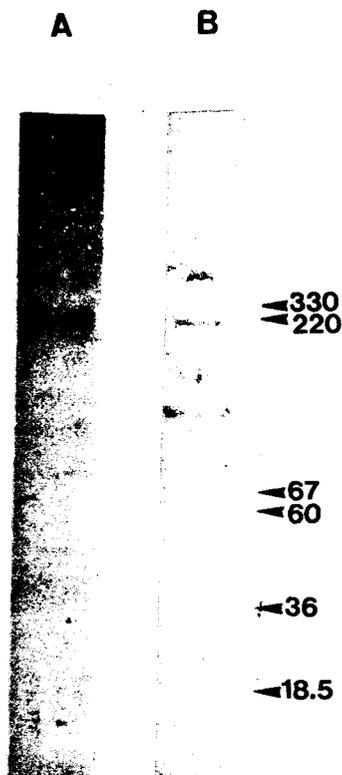


Figure 6 - Autoradiographie de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. de la fibronectine purifiée par chromatographie d'affinité sur gélatine-Sepharose 4-B (marquage par la glucosamine).

A. cellules normales, B. cellules transformées.

Les flèches indiquent la position des témoins de masse moléculaire.

d'immunoprécipitation décrite précédemment. Nous avons pour cela utilisé des anticorps anti-fibronectine plasmatique humaine, ceux-ci interréagissant avec la fibronectine d'un grand nombre d'espèces (93). L'autoradiographie de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. du complexe antigène-anticorps nous a montré que les anticorps anti-fibronectine reconnaissent ce fragment polypeptidique, démontrant qu'il s'agissait bien d'un fragment protéolytique de la fibronectine transformée et non d'une autre glycoprotéine secrétée par la cellule transformée, possédant une affinité vis-à-vis du collagène. Il existerait donc, au niveau de la fibronectine transformée, une zone plus sensible à la dégradation protéolytique dans la partie centrale de la molécule.

Il est peu probable que la fibronectine soit dégradée avant d'être secrétée dans le milieu de culture. Cette augmentation de la sensibilité vis-à-vis des protéases pourrait être due soit à une modification de la conformation de la chaîne peptidique associée à la transformation qui favoriserait l'action des enzymes de protéolyse dans la partie centrale de la molécule, soit à un accroissement de cette activité dans le milieu de culture des cellules transformées.

Dans tous les cas, ce phénomène peut être en relation avec la diminution du "stock" de fibronectine associée à la membrane des cellules cancéreuses. Ces observations sont en accord avec le fait que la vitesse de renouvellement de la fibronectine soit plus élevée dans le cas des cellules transformées.

Ce fragment conserve une grande affinité vis-à-vis du collagène dénaturé. Il est donc porteur du domaine de fixation du collagène, domaine au niveau duquel sont regroupés les glycanes de la fibronectine. Le fait d'obtenir une fibronectine transformée partiellement dégradée ne gêne donc en rien l'étude de sa partie glycanique, celle-ci étant réalisée sur les glycopeptides et les glycanes isolés.

## II - Fractionnement par gel filtration sur colonne d'Ultrogel

### AcA 202

#### A - Fractionnement des glycopeptides marqués

La gel filtration des glycopeptides obtenus par digestion pronasique de la glycoprotéine marquée soit par la glucosamine, soit par le mannose, montre qu'il existe une différence importante de masse moléculaire de la partie glycanique de ces deux types de fibronectines (Figures 7a et 7b). Ceci indique que l'augmentation de la masse moléculaire des structures N-glycanniques associée à la transformation maligne et mise en évidence au niveau des cellules entières ou de la membrane cellulaire par trypsination de la surface des cellules en culture (36, 159) est également le fait de cette glycoprotéine particulière.

Dans le cas de la fibronectine transformée, nous pouvons observer un enrichissement en glycopeptides de masse moléculaire élevée (fractions 40 à 60) qui n'existent qu'en faible quantité dans la fibronectine normale. En outre, le profil d'élution obtenu est relativement hétérogène ce qui témoigne de la complexité de cette fraction glycopeptidique. Inversement, dans le cas de la fibronectine normale, le profil obtenu, beaucoup plus homogène (fractions 60 à 85), correspond à des glycopeptides de masse moléculaire plus faible. Il est à noter que cette famille glycopeptidique est également présente au niveau de la fibronectine transformée, mais en proportions beaucoup plus faibles.

#### B - Fractionnement des glycannes

Nous avons effectué le même type de fractionnement sur les glycannes obtenus par hydrazinolyse/N-réacétylation des glycopeptides pronasiques

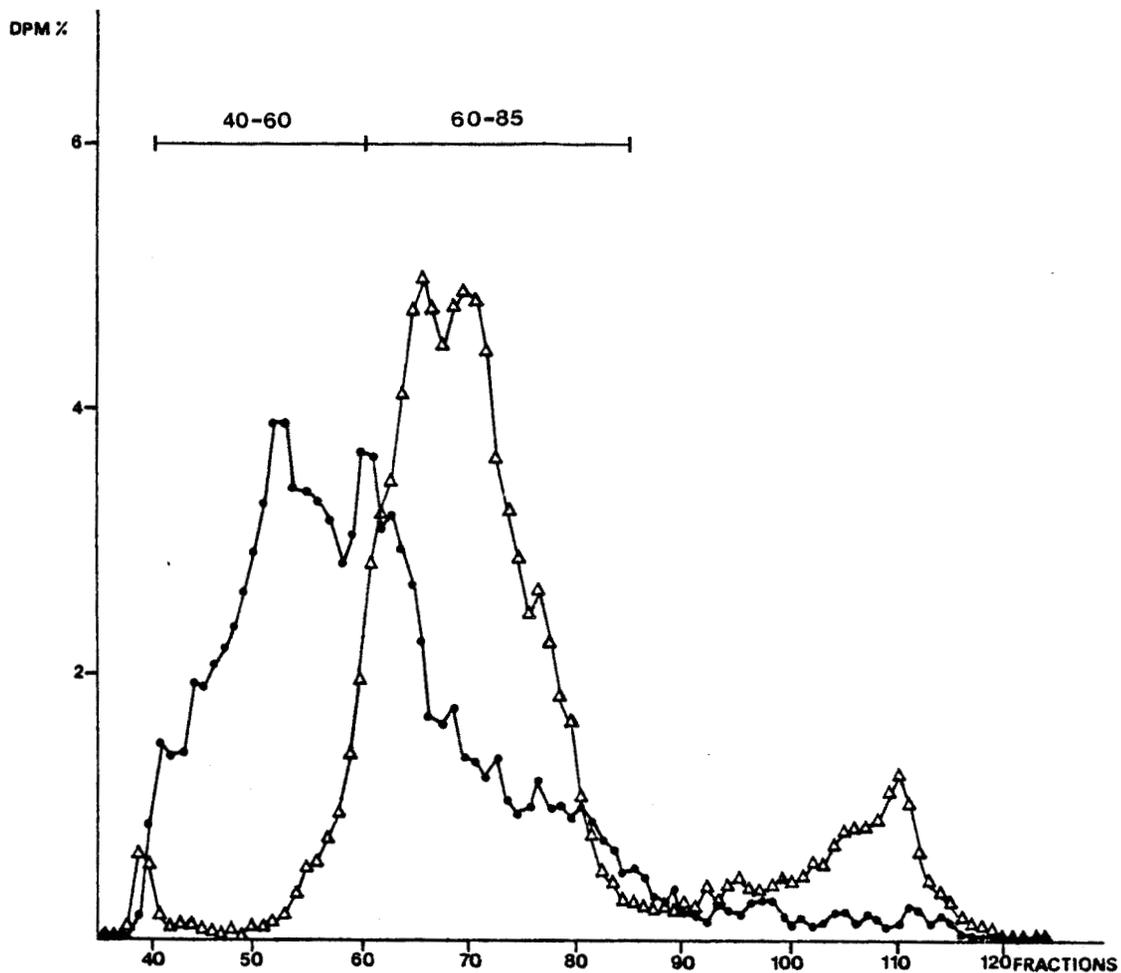


Figure 7a - Gel filtration des glycopeptides marqués à la glucosamine sur colonne d'ultrogel AcA 202 (100 x 1,6 cm) équilibrée dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4 ; NaCl 0,17 M. Débit 9,0 ml/h ; fraction 1,5 ml  
 (△—△—△) cellules normales  
 (●—●—●) cellules transformées

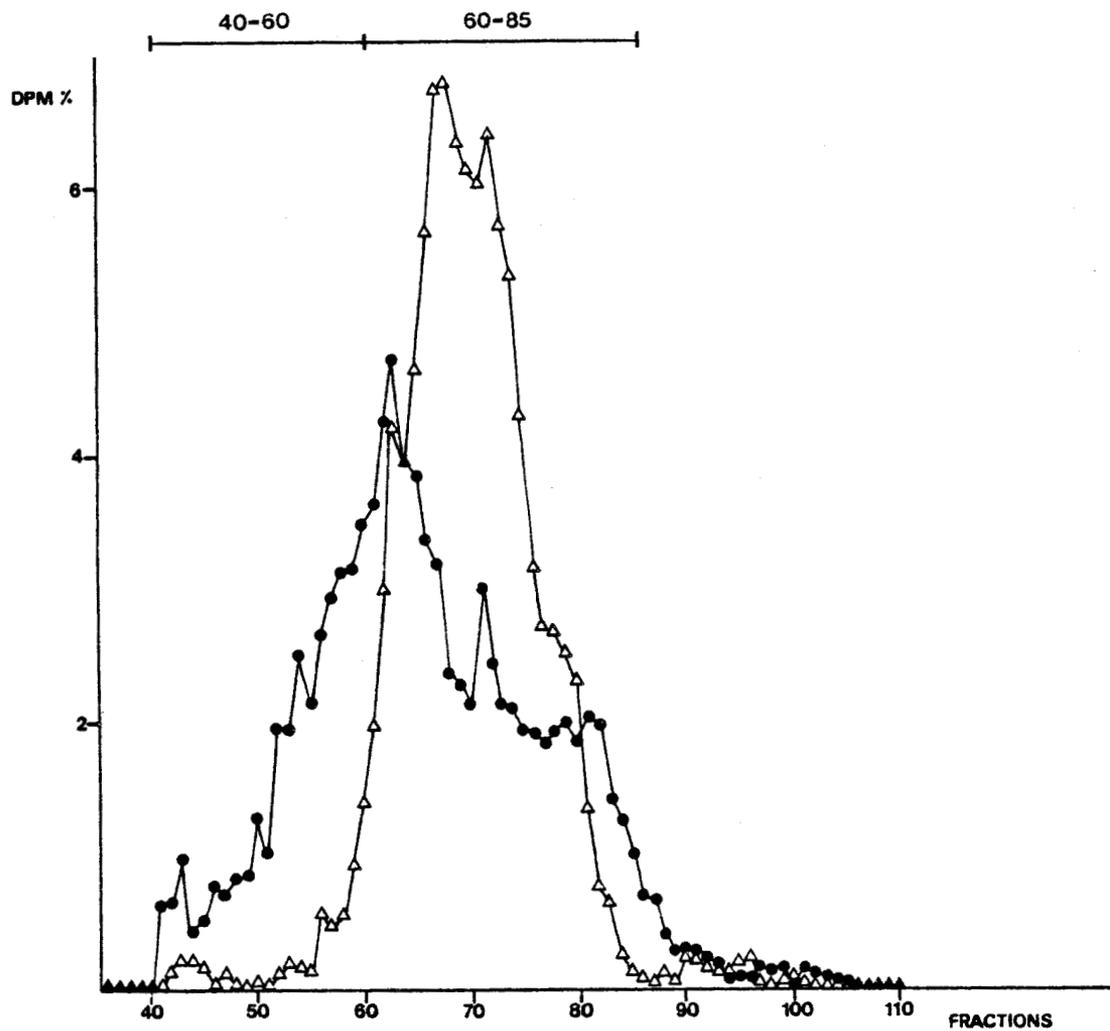


Figure 7b - Gel filtration des glycopeptides marqués au  $[2-^3\text{H}]$  Mannose sur colonne d'ultrogel AcA 202 (mêmes conditions qu'à la figure 7a)

( $\Delta$ — $\Delta$ — $\Delta$ ) cellules normales

( $\bullet$ — $\bullet$ — $\bullet$ ) cellules transformées

marqués par la glucosamine. L'hydrazinolyse permet d'éliminer l'hétérogénéité de la partie peptidique, due à l'existence d'un nombre de résidus d'acides aminés variable au niveau du point d'attaque des glycanes et d'obtenir un profil de gel filtration plus simple.

Dans ce cas, nous avons obtenu un profil similaire à celui des glycopeptides bien que légèrement déplacé vers les faibles masses moléculaires (Figure 8). Les glycanes provenant de la fibronectine normale présentent un profil plus simple (fractions 60 à 90). L'augmentation de la masse moléculaire demeure au niveau des glycanes de la fibronectine transformée ainsi que le caractère hétérogène de cette fraction (fractions 45 à 100).

Ces résultats nous confirment que l'augmentation de masse moléculaire des glycopeptides cellulaires associée à la transformation maligne est bien le fait d'une modification de la partie glycanique, modification allant dans le sens d'un alourdissement de ces structures.

### **III - Fractionnement des glycopeptides par chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines insolubilisées**

#### **A - Fractionnement sur Con A-Sepharose 4-B**

Les glycopeptides isolés des fibronectines normale et transformée ont été cofractionnés sur colonne de Con A-Sepharose 4-B (Figure 9). La spécificité de cette lectine (37, 38, 39) nous a permis d'obtenir quatre fractions distinctes dont les pourcentages sont donnés dans le tableau VII. Une première fraction non retenue sur la colonne (FNRC) est éluée par le tampon au volume mort de la colonne. Elle correspond à des N-glycopeptides tri et tétra-antennés. Une deuxième fraction légèrement retardée (FRC), possédant une faible affinité vis-à-vis de la

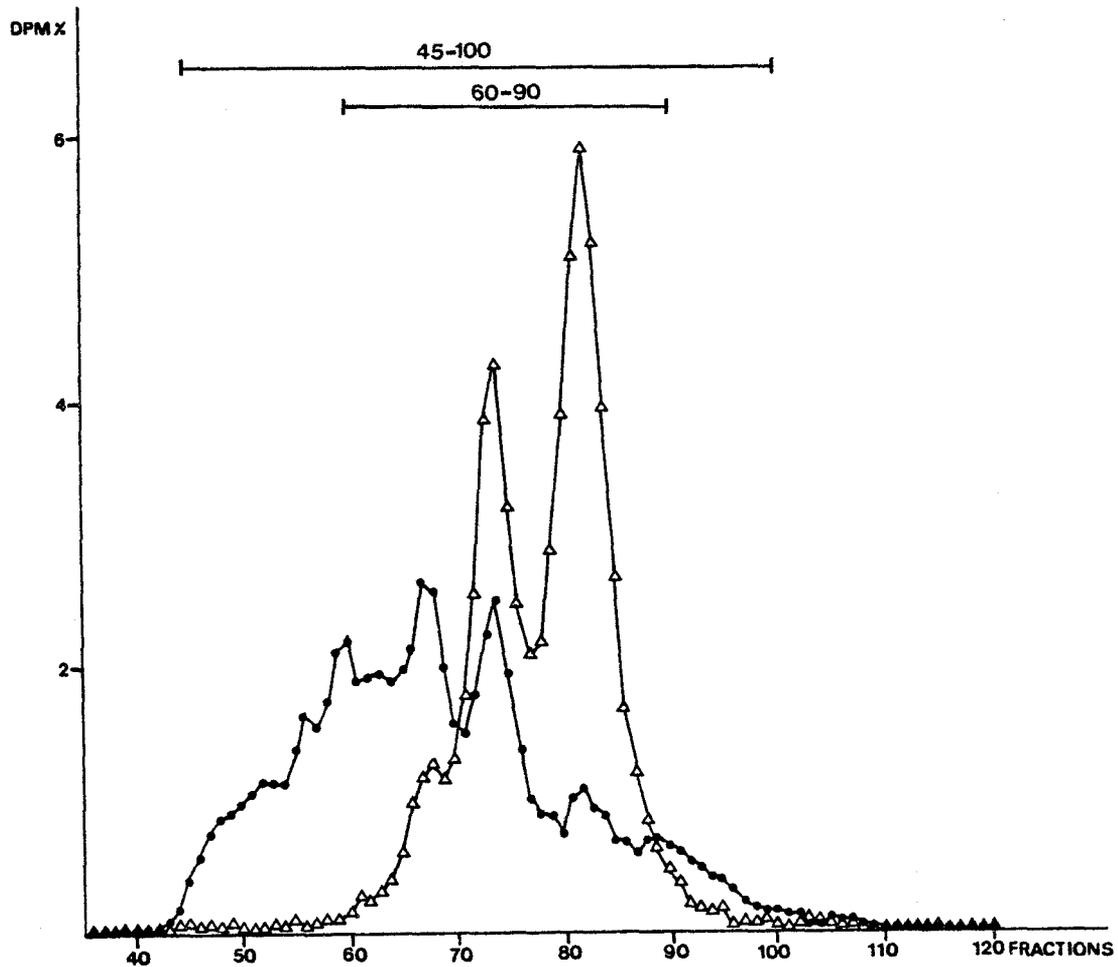


figure 8 - Gel filtration des glycanes marqués à la glucosamine, libérés par hydrazinolyse/N-réacétylation, sur colonne d'Ultrogel AcA 202 (mêmes conditions qu'à la figure 7a)

(  $\Delta$  —  $\Delta$  —  $\Delta$  ) cellules normales

(  $\bullet$  —  $\bullet$  —  $\bullet$  ) cellules transformées



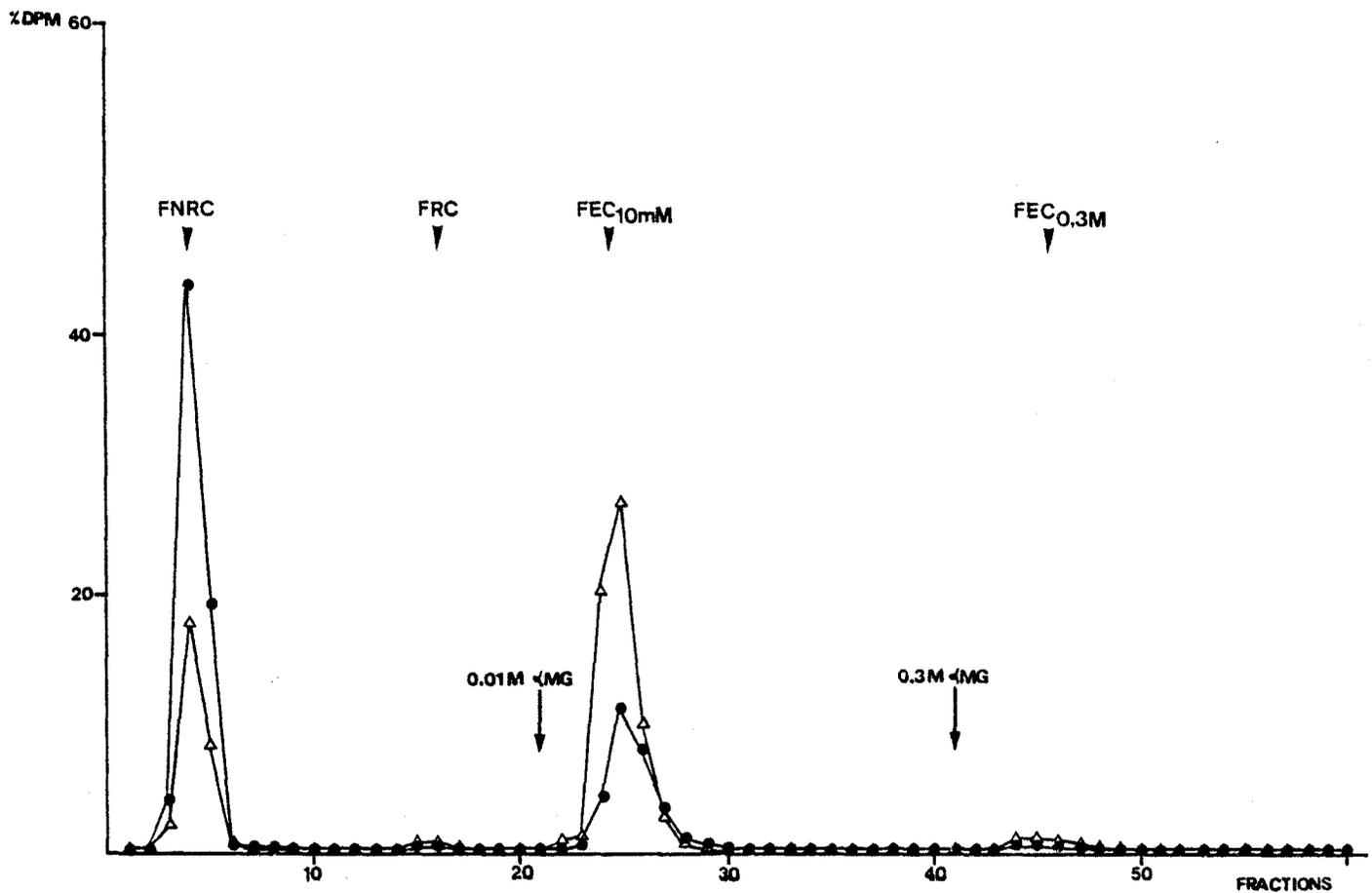


figure 9 - Chromatographie d'affinité des glycopeptides marqués à la glucosamine sur colonne de Con A - Sepharose 4-B (10 x 1 cm) équilibrée dans un tampon Acétate de sodium 5 mM pH 5,2 ; NaCl 0,1 M ; CaCl<sub>2</sub> 1 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1 mM ; MnCl<sub>2</sub> 1mM. Elution par  $\alpha$ -M Glc 10 mM et  $\alpha$ -M Glc 0,3 M dans le même tampon.

Débit 9,0 ml/h ; fraction 1,5 ml.

(  $\Delta$ — $\Delta$ — $\Delta$  ) cellules normales

(  $\bullet$ — $\bullet$ — $\bullet$  ) cellules transformées



Tableau VII - Pourcentage de la radioactivité totale des 4 fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de Con A-Sepharose 4-B.

	: Fraction Non Retenue :	Fraction Retardée
	: FNRC :	FRC
Fractions	: 3-7 :	14-18
Normale %	: 30 :	2
Transformée %	: 69 :	1

	: Fraction éluée par α-M. Glc 10 mM :	Fraction éluée par α-M. Glc 0,3 M
	: FEC 10mM :	FEC <sub>0,3M</sub>
Fractions	: 22-29 :	43-49
Normale %	: 62 :	6
Transformée %	: 28 :	2



Con A, mais toujours éluée par le tampon, peut être obtenue. L'élué de la colonne par  $\alpha$ -M.Glc 10 mM permet d'obtenir une troisième fraction (FEC<sub>10mM</sub>) constituée des N-glycopeptides biantennés. Il est à noter que la présence d'une glucosamine d'intersection induit la perte d'affinité de la Con A vis-à-vis de ce type de structure et qu'on les retrouve dans la fraction non retenue. Enfin, l'élué par l' $\alpha$ -M.Glc 0,3 M permet de récupérer une quatrième fraction, possédant une forte affinité vis-à-vis de la concanavaline A et regroupant les N-glycopeptides de type oligomannosidique.

Dans le cas de la fibronectine normale, la fraction majeure est éluée par l' $\alpha$ -M.Glc 10 mM (FEC<sub>10mM</sub>) et correspond donc à des N-glycopeptides de type biantenné. Cette fraction représente 62 % de la radioactivité totale. Ce résultat est en accord avec ceux de Carter et Hakomori (24, 48) qui ont décrit le glycanne majeur de la fibronectine cellulaire normale isolée de culture de fibroblastes embryonnaires comme étant un glycanne de type biantenné possédant un résidu de fucose lié en  $\alpha$ 1-6 au niveau de la N-acétylglucosamine de l'extrémité réductrice (Figure 2). Par contre, cette fraction est fortement diminuée dans le cas de la fibronectine transformée. En effet, elle ne correspond qu'à 28 % de la radioactivité totale.

Ces résultats montrent une diminution des structures biantennées de la fibronectine des cellules transformées. Inversement, la fraction non retenue (FNRC), qui correspond à des N-glycopeptides tri et tétra-antennés, et qui dans le cas des cellules normales est une fraction mineure (30 % de la radioactivité totale), représente 69 % de la radioactivité des glycopeptides de la fibronectine transformée.

Ceci nous montre donc clairement qu'il existe une augmentation du degré de branchement des N-glycopeptides de la fibronectine associée à la transformation maligne.

En outre, ce fractionnement sur Con A-Sepharose 4-B nous a permis d'obtenir deux fractions mineures. La première, éluée par le tampon (FRC) et la seconde correspondant à des structures oligomannosidiques et éluée par l' $\alpha$ -M.Glc 0,3 M (FEC 0,3 M). Ces deux fractions sont présentes dans les deux types de fibronectines dans des proportions voisines (2 % environ). La faible proportion de ces fractions étant un facteur limitant à leur étude, celle-ci n'a pas été poursuivie. Il est possible qu'elles soient le reflet du métabolisme de cette glycoprotéine.

### B - Fractionnement sur L.C.A.-Sepharose 4-B

Dans un deuxième temps, les différentes fractions obtenues par chromatographie sur Con A-Sepharose 4-B ont été cofractionnées sur colonne de L.C.A.-Sepharose 4-B (Figure 10). Le pourcentage de chacune des fractions obtenues est donné dans le tableau VIII.

Les glycopeptides non retenus sur Con A-Sepharose 4-B (FNRC) sont principalement non retenus sur L.C.A.-Sepharose (FNRCNRL). Cependant il existe une fraction mineure éluée par l' $\alpha$ -M.Glc 0,15 M proportionnellement plus importante dans le cas des cellules normales (FNRCFEL). En effet, si on regarde le rapport entre les fractions non retenue (FNRCNRL) et éluée par l' $\alpha$ -M.Glc 0,15 M (FNRCFEL), ce rapport est égal à 3 pour les cellules normales contre 12,5 pour les cellules transformées (voir tableau VIII). La lectine de lentille possède une affinité vis-à-vis des glycopeptides fucosylés en  $\alpha$ 1-6 sur la N-acétylglucosamine de l'extrémité réductrice, biantennés et triantennés si la troisième antenne est liée sur le mannose en  $\beta$ 1-6 (37, 38, 39, 90). La diminution de la fraction éluée (FNRCFEL) pourrait donc être due à une proportion plus élevée de structures tétraantennées dans le copule glucidique de la fibronectine transformée.

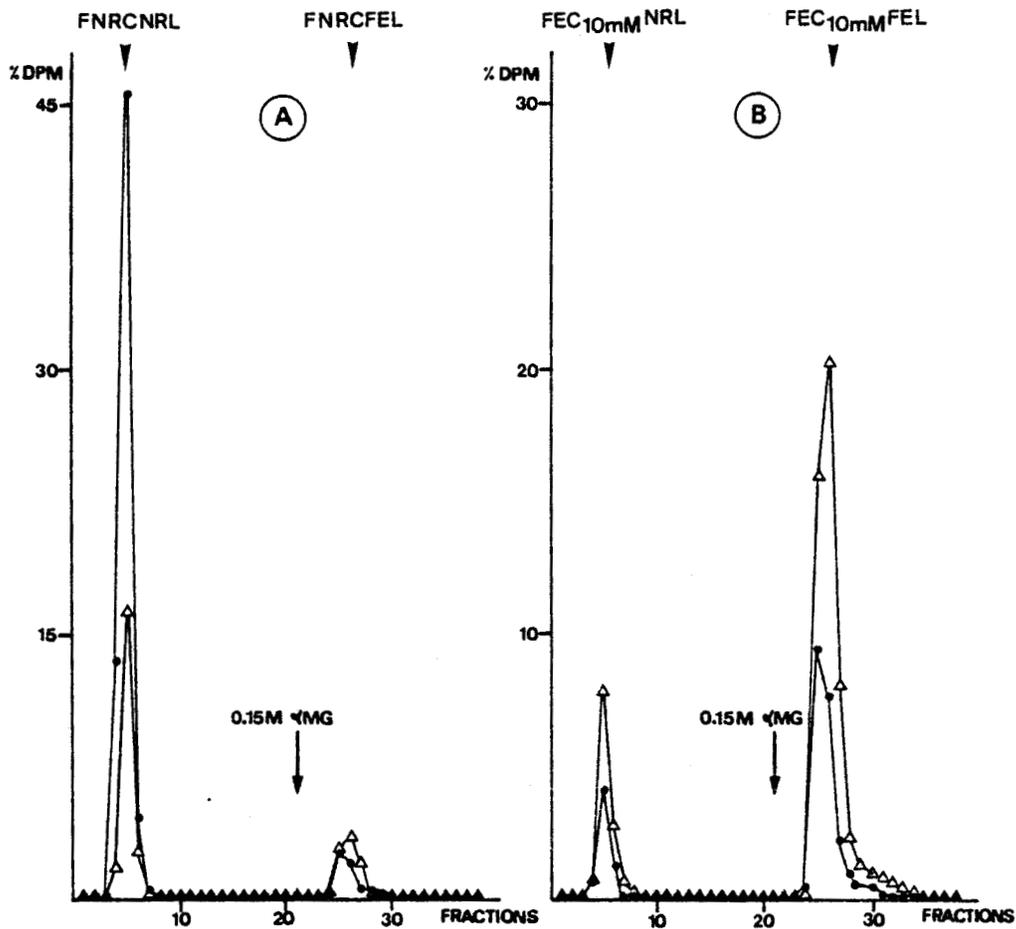


figure 10 - Chromatographie d'affinité sur colonne de L.C.A. - Sepharose 4-B des deux fractions majeures obtenues sur Con A - Sepharose.

(A) : FNRC ; (B) : FEC<sub>10mM</sub> . La colonne de L.C.A. - Sepharose 4-B (8 x 1 cm) est équilibrée dans le tampon NaCl/Pi et éluée par l' $\alpha$ -M Glc 0,15 M dans le même tampon. Débit 9,0 ml/h ; fraction 1,5 ml.

( $\Delta$ — $\Delta$ — $\Delta$ ) cellules normales  
 (●—●—●) cellules transformées

305  
LILLE

Tableau VIII - Pourcentage de la radioactivité totale des 8 fonctions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de L.C.A. Sepharose 4-B.

	: Fraction Non Retenue :		Fraction éluée par $\alpha$ -M. Glc 10 mM	
	: FNRC :		: FEC <sub>10mM</sub> :	
	: FNRCNRL	: FNRCFEL	: FEC <sub>10mM</sub> <sup>NRL</sup>	: FEC <sub>10mM</sub> <sup>FEL</sup>
Fractions	: 3-7	: 24-30	: 3-8	: 24-35
Normale %	: 23,0	: 8,4	: 12,3	: 51,0
Transformée %	: 63,0	: 5,3	: 6,1	: 22,0
<hr/>				
	: Fraction Retardée :		Fraction éluée par $\alpha$ -M. Glc 0,3 M	
	: FRC :		: FEC <sub>0,3M</sub> :	
	: FRCNRL	: FRCFEL	: FEC <sub>0,3M</sub> <sup>NRL</sup>	: FEC <sub>0,3M</sub> <sup>FEL</sup>
Fractions	: -	: -	: -	: -
Normale %	: 0,6	: 1,4	: 2,4	: 3,5
Transformée %	: 0,4	: 0,6	: 0,8	: 1,2



Parallèlement, si nous considérons la fraction biantennée ( $FEC_{10mM}$ ), la fucosylation des deux types de fibronectine apparaît similaire. En effet le rapport entre fractions non retenue ( $FEC_{10mM}^{NRL}$ ) et éluee ( $FEC_{10mM}^{FEL}$ ) est égal à 0,25 dans les deux cas. Cette fraction est donc fucosylée à 75 % ce qui confirme la structure décrite par Carter et Hakomori (24, 48) comme étant le glycanne majeur de la fibronectine normale.

Les deux fractions mineures ont également été fractionnées sur colonne de L.C.A.-Sephrose 4-B, les pourcentages obtenus n'apportent que peu de renseignements, les différentes fractions se retrouvant dans les deux types de fibronectine dans les mêmes proportions. En outre, il apparaît une fraction éluee par  $\alpha$ -M. Glc 0,3 M de la Con A (zone d'élu-tion des glycopeptides de type oligomannosidique) et éluee de la colonne de L.C.A.-Sephrose 4-B.

#### IV - Fractionnement des glycanes libérés par hydrazinolyse par chroma-tographie liquide haute performance d'échange d'ions

##### A - Fractionnement des glycanes totaux

Les N-glycanes obtenus par hydrazinolyse/N-réacétylation des gly-peptides totaux ont été cofractionnés en fonction de leur charge par H.P.L.C. d'échange d'ions sur colonne de Micropak AX-10 (Figure 11). Cinq familles de glycanes ont été obtenues et identifiées de 0 à 4, en fonction du nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique ; neutre, mono, di, tri et tétra-sialysés respectivement. Nous avons utilisé comme témoin de migration les glycanes de l'Orosomucoïde. Le tableau IX nous donne le pourcentage de la radioactivité totale de chacune des fractions.

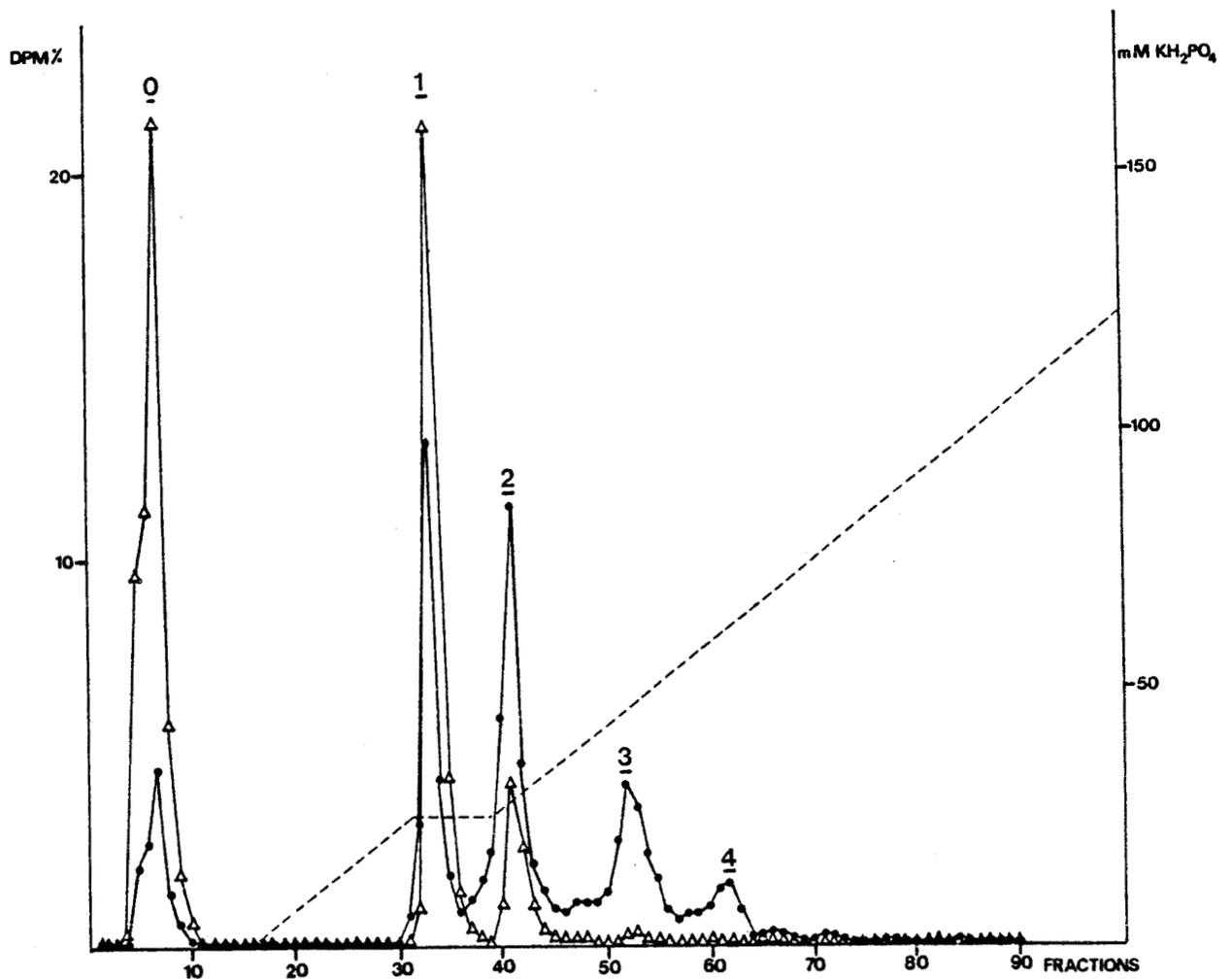


figure 11 - Chromatographie liquide haute performance des glycanes marqués à la glucosamine, obtenus par hydrazinolyse/N-réacétylation sur une colonne Micropak AX-10. Cinq familles de glycanes sont obtenues (0 à 4, neutre, mono, di, tri et tétrasialysés respectivement). Les glycanes neutres sont élués par H<sub>2</sub>O. Les glycanes sialysés sont séparés par un gradient de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> pH 4,0 (-----). Débit 1 ml/min ; fraction 0,64 ml.

( Δ—Δ—Δ ) cellules normales  
 ( ●—●—● ) cellules transformées



Tableau IX - Pourcentage de la radioactivité totale des cinq familles de N-glycannes obtenues par H.P.L.C. d'échange d'ions (0-4, neutre, mono, di, tri et tétrasialysés respectivement).

nombre de résidus d'acide sialique	0	1	2	3	4
Normale %	50,8	37,9	10,0	0,9	0,4
Transformée %	12,0	24,9	33,0	23,0	6,0



Dans le cas de la fibronectine normale, les glycanes sont essentiellement divisés en trois fractions (neutre, mono et disialysées) et la fraction neutre représente plus de la moitié de la radioactivité totale. Les fractions 3 et 4, correspondant à des glycanes tri et tétrasialysés, sont négligeables.

Par contre, dans le cas de la fibronectine transformée la fraction neutre ne représente que 12 % de la radioactivité totale alors que les fractions 2 à 4 qui correspondent à des glycanes contenant au moins 2 résidus d'acide N-acétylneuraminique représentent plus de 60 % de la radioactivité totale.

Ces résultats nous montrent que, parallèlement à une augmentation du degré de branchement, il existe une augmentation de la sialylation des glycanes de la fibronectine transformée.

#### **B - Fractionnement des glycanes obtenus par chromatographie d'affinité sur lectines insolubilisées**

Les quatre fractions glycopeptidiques majeures obtenues par chromatographie d'affinité sur lectines insolubilisées (FNRCNRL, FNRCFEL,  $FEC_{10mM}^{NRL}$  et  $FEC_{10mM}^{FEL}$ ) ont été soumises à l'action de l'hydrazine et après N-réacétylation, les N-glycanes libérés ont été co-fractionnés par HPLC d'échange d'ions dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau X qui nous donne le pourcentage de chacune des fractions en fonction de la radioactivité totale.

Ce tableau nous montre que l'augmentation de la sialylation se retrouve dans chacune des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines. L'analyse des fractions glycaniques biantennées ( $FEC_{10mM}^{NRL}$  et  $FEC_{10mM}^{FEL}$ ) nous montre qu'au sein d'une même classe de glycanes biantennés, le rapport entre fractions neutre,

Tableau X - Pourcentage de la radioactivité totale des 4 fonctions majeures obtenues par chromatographie d'affinité sur lectines, fractionnées en fonction de leur charge par H.P.L.C. d'échange d'ions.

Nombre de résidus d'acide sialique		0	1	2	3	4
FNRCNRL	: Normale %	4,3	14,1	1,8	1,7	0,8
	: Transformée %	1,6	14,7	17,5	20,1	7,2
FNRCFEL	: Normale %	7,4	0,6	-	-	-
	: Transformée %	3,3	1	0,5	-	-
FEC <sub>10mM</sub> NRL	: Normale %	8,5	3,3	-	-	-
	: Transformée %	2,4	2,6	1	-	-
FEC <sub>10mM</sub> FEL	: Normale %	23,4	21,2	6,4	-	-
	: Transformée %	1,4	7,3	13,3	-	-



mono et disialylées est complètement inversé entre fibronectine normale et transformée (tableau X).

En effet, si nous regardons la fraction majeure de la fibronectine normale obtenue par chromatographie sur colonnes de lectines ( $FEC_{10mM}^{FEL}$ ) cette fraction contient principalement des glycanes neutres et monosialylés (23 % et 21 % de la radioactivité totale respectivement), la fraction disialylée ne représentant que 6 % de la radioactivité totale. Or, dans le cas de la fibronectine transformée cette fraction est essentiellement disialylée et représente 13 % de la radioactivité totale bien que le pourcentage de glycanes biantennés soit fortement diminué dans la fibronectine transformée (tableau VIII). Ceci montre que parallèlement à une augmentation du degré de branchement, il existe au niveau de la fibronectine transformée une augmentation de la sialylation des glycanes due à la fois à une augmentation du nombre des antennes et à un taux de sialylation plus important de ces antennes.

L'étude de la fraction la plus complexe (FNRCNRL), fraction renfermant des glycanes tri et tétraantennés nous montre que bien qu'il existe une certaine proportion de ces glycanes dans la fibronectine normale (23 %) le degré de sialylation de cette fraction demeure faible, les pourcentages des fractions tri et tétrasialylées étant négligeables. Par contre dans le cas des glycanes de la fibronectine transformée, cette fraction représente 63 % de la radioactivité totale et renferme principalement des glycanes di et tri-sialylés (17 % et 20 % de la radioactivité totale respectivement), les glycanes tétrasialylés représentant encore 7 % de la radioactivité totale.

Ces résultats nous permettent donc de confirmer et de compléter les données de la chromatographie sur lectines insolubilisées. Ils montrent que la fibronectine normale renferme essentiellement des glycanes biantennés, fucosylés, principalement neutres et monosialylés alors que

la fibronectine des cellules transformées est fortement enrichie en glycanes plus branchés et plus sialylés ; structures tri et tétraantennées contenant en moyenne 3 résidus d'acide N-acétylneuraminique. Cette augmentation du nombre de résidus d'acides sialiques est due à la fois à une augmentation du nombre des antennes mais également à une plus grande sialylation de ces antennes dans les cellules transformées.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude que nous avons réalisée sur la fibronectine de cellules BHK normales et transformées par virus oncogène (HSV) nous a permis de confirmer et d'étendre à une glycoprotéine extracellulaire les observations effectuées dans notre laboratoire (36) et dans des laboratoires étrangers à propos des modifications que connaissent les glycanes des glycoprotéines des cellules transformées elles mêmes.

Le glycanne majeur isolé de la fibronectine de fibroblastes de hamsters normaux est une structure de type N-acétyl-lactosaminique biantenné, fucosylée, essentiellement neutre et monosialylée (Figure 2), telle que l'ont décrite Carter et Hakomori (24,48). La fibronectine secrétée dans le milieu de culture des fibroblastes transformés présente des structures glycaniques modifiées : la proportion de structures biantennées est fortement diminuée et passe de 62 % dans la fibronectine normale à 28 % dans la fibronectine transformée. Inversement, on observe une forte augmentation des structures tri- et tétra-antennées dont le pourcentage est faible dans la fibronectine normale (30 %) et passe à 69 % dans la fibronectine transformée. En outre, le taux de sialylation de ces structures est significativement accru dans la cellule transformée : la fibronectine "transformée" est très enrichie en structures di-, tri- et tétrasialylées, structures qui n'existent qu'en quantité négligeable dans la fibronectine normale. L'enrichissement en acide sialique de la fibronectine transformée est donc lié à la fois à une augmentation de la sialylation des structures glycaniques et aussi à l'existence d'un pourcentage important de structures

tri- et tétra-antennées sialylées.

D'autre part, chaque famille de glycanes que nous avons obtenus est présente dans les deux types de fibronectines et, à priori, seules les proportions relatives de ces fractions semblent modifiées. Toutefois, seule la détermination, dans le futur, de la structure des glycanes nous dira si les modifications quantitatives que nous observons s'accompagnent ou non de transformations profondes et spécifiques de la structure des glycanes.

Bien que la fibronectine transformée soit substituée par des glycanes plus branchés, la transformation maligne semble induire une augmentation de la sensibilité de cette glycoprotéine à la dégradation protéolytique. Ceci n'est pas en contradiction avec le fait que les glycanes puissent protéger une partie de la chaîne peptidique de l'action des protéases. En effet, les glycanes de la fibronectine sont regroupés au niveau du site de fixation du collagène, ce qui lui confère une très grande stabilité.

Les modifications de cette glycoprotéine induites par la transformation et, en particulier, l'augmentation du degré de branchement et de la sialylation des glycanes pourraient à elles seules expliquer, par une modification de la charge globale de la molécule, une augmentation de l'électronégativité de cette dernière. Ces modifications pourraient avoir aussi comme conséquence un changement de conformation de la molécule, la rendant plus sensible à l'action des enzymes de dégradation.

Les transformations moléculaires observées pourraient expliquer sa diminution de la surface de la cellule ainsi que l'élévation de la vitesse de renouvellement de la fibronectine dans les milieux de culture des cellules transformées. Cette diminution pourrait être aussi provoquée par une perte d'affinité de la glycoprotéine vis-à-vis des

constituants de la matrice extracellulaire ou vis-à-vis de la membrane plasmique elle-même, l'augmentation de l'encombrement stérique des glycanes due à l'existence d'un nombre d'antennes plus important, disposées en "parasol" et recouvrant une partie importante de la chaîne peptidique, pouvant induire un masquage des sites de fixation de la fibronectine transformée.

L'augmentation du degré de branchement des glycanes de la fibronectine - et d'autres glycoprotéines membranaires - semblerait donc être l'une des causes de la perte d'adhésivité des cellules cancéreuses. Cette diminution de l'adhésion cellulaire pourrait avoir comme conséquence de faciliter la dissociation des cellules normales, phénomène conduisant à l'apparition des métastases in vivo. Il devient donc important d'étudier la copule glucidique de la fibronectine sécrétée par des cellules tumorales ayant des pouvoirs métastasants différents.

Enfin, les modifications des structures N-acétyl-lactosaminiques de la fibronectine sont très vraisemblablement liées à un dérèglement de la biosynthèse des glycoprotéines associé à la transformation maligne et affectant les N-acétylglucosaminyltransférases de branchement. La fibronectine étant très sensible à la transformation, l'augmentation du degré de branchement est fortement marquée au niveau de cette glycoprotéine, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude de la régulation de la biosynthèse des N-glycosylprotéines des cellules transformées et/ou cancéreuses.

## BIBLIOGRAPHIE

Référence :	: Page
1 ADAMS, S.L., SOBEL, M.E., HOWARD, B.M., OLDEN, K., YAMADA, K.M., DE CROWBRUGGHE, B., et PASTAN, I. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. <u>74</u> , 3399-3403	40
2 ALEXANDER, S.S., COLONNA, G. et EDELHOCH, M. (1979) J. Biol. Chem. <u>254</u> , 1501-1505	8, 9, 16
3 ALEXANDER, S.S., COLONNA, G., YAMADA, K.M., PASTAN, I. et EDELHOCH, M. (1978) J. Biol. Chem. <u>253</u> , 5820-5824	8, 9, 16
4 ALI, I.U. et HUNTER, T. (1981) J. Biol. Chem. <u>256</u> , 7671-7677	41
5 ALI, I.U. et HYNES, R.O. (1979) Cell. <u>14</u> , 439-446	33
6 ALI, I.U., MAUTNER, V.M., LANZA, R.P. et HYNES, R.O. (1977) Cell <u>11</u> ; 115-126	39
7 ALITALO, K., KURKINEN, M., VAHERI, A., KRIEG, T. et TIMPL, R. (1980) Cell <u>19</u> , 1053-1062	5
8 APLIN, J.D. et HUGHES, R.C. (1982) Biochim. Biophys. Acta <u>694</u> , 375-418	1, 26, 28, 42
9 ATHERTON, B.T. et HYNES, R.O. (1981) Cell <u>25</u> , 133-141	17
10 BAENZIGER, J.U. et NATOWICZ, M. (1981) Anal. Biochem. <u>112</u> , 357-361	50
11 BALIAN, G., CROUCH, E., CLICK, E.M., CARTER, W.G. et BORNSTEIN, P. (1979) J. Supramol. Struct. <u>12</u> , 505-516	11, 12, 15

- 12 BALIAN, G., CLICK, E.M. et BORNSTEIN, P. (1980) 20,22  
J. Biol. Chem. 255, 3234-3236
- 13 BALIAN, G., CLICK, E.M., CROUCH, E., DAVIDSON, 17, 20, 22  
J.M. et BORNSTEIN, P. (1979) J. Biol. Chem.  
254, 1429-1432
- 14 BAYARD, D. et MONTREUIL, J. (1974) in "J. 49  
Montreuil, Actes du Colloque International  
n° 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués."  
Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Ed. du C.N.R.S.,  
Paris, P.P. 209-218
- 15 BERNARD, B.A., YAMADA, K.M. et OLDEN, K. (1982) 16  
J. Biol. Chem. 257, 8549-8554
- 16 BING, D.H., ALINEDA, S., ISLIKER, H., LAHAV, J. 20  
et HYNES, R.O. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. 79,  
4198-4201
- 17 BIRDWELL, C.R., BRASIER, A.R. et TAYLOR, L.A. 9  
(1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 574-  
581
- 18 BLITHE, D.L., BUCK, C.A. et WARREN, L. (1980) 1  
Biochemistry 19, 3386-3395
- 19 BLUMENSTOCK, F.A., SABA, T.M., WEBER, P. et 31  
LAFFIN, R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4287-4291
- 20 BLUMENSTOCK, F.A., WEBER, P. et SABA, T.M. (1977) 5, 31  
J. Biol. Chem. 252, 7156-7162
- 21 BUCK, C.A., GLICK, M.C. et WARREN, L. (1970) 1  
Biochemistry 9, 4567-4576
- 22 BURRIDGE, K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 36, 37  
4457-4461
- 23 BUTTERS, T.D., DEVALIA, V., APLIN, J.D. et 15  
HUGHES, R.C. (1980) J. Cell Sci. 44, 33-58

- 24 CARTER, W.G. et HAKOMORI, S.I. (1979) Biochemistry 18, 730-738 13, 14, 63, 67, 7
- 25 CHEN, A.B., AMRANI, D.L. et MOSESSON, M.W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 493, 310-322 33, 34
- 26 CHEN, A.B., GALLIMORE, P.H. et McDougall, J.K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 3570-3574 36
- 27 CHEN, W.T. et SINGER, S.J. (1981) J. Cell Biol. 91, 258-262 26
- 28 CHEN, L.B., SUMMERHAYES, I., HSIEH, P. et GALLIMORE, P.H. (1979) J. Supramol. Struct. 12, 139-150 37
- 29 CHIQUET, M., PURI, E.C. et TURNER, D.C. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5475-5482 34
- 30 CHOI, M.G. et HYNES, R.O. (1979) J. Biol. Chem. 254, 12050-12055 15, 34
- 31 CRITCHLEY, D.R. (1974) Cell 3, 121-125 39, 36
- 32 CRITCHLEY, D.R., ENGLAND, M.A., WAKELY, J. et HYNES, R.O. (1979) Nature 280, 498-500 33
- 33 CRITCHLEY, D.R., WYKE, J.A. et HYNES, R.O. (1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 335-352 3
- 34 CROUCH, E., BALIAN, G., HOLBROOK, K., DUKSIN, D. et BORNSTEIN, P. (1978) J. Cell Biol. 78, 701-715 5, 6
- 35 DEBRAY, H. (1979) Bull. Cancer 66, 353-372 1, 37
- 36 DEBRAY, H., DELANNOY, P., DEBEIRE, P. et MONTREUIL, J. (1983) Eur. J. Biochem. (mémoire en préparation) 1, 2, 44, 56, 74

- 37 DEBRAY, H. et MONTREUIL, J. (1981) in T.C. Bøgg- 59, 64  
Hansen, Lectins-Biology and Biochemistry, Clinical  
Biochemistry, De Gruyter, Berlin, 1, 221-230
- 38 DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., DELANNOY, P. et 59, 64  
MONTREUIL, J. (1983) Eur. J. Biochem.  
(soumis à publication)
- 39 DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., SPIK, G. et MONTREUIL, 59, 64  
J. (1983) in T.C. Bøgg-Hansen and G.A. Spengler,  
Lectins, De Gruyter, Berlin, 335-350
- 40 DER, C.J. et STANBRIDGE, E.J. (1978) Cell 15, 36, 37  
1241-1251
- 41 DUKSIN, D. et BORNSTEIN, P. (1977) Proc. Natl. 15  
Acad. Sci. 74, 3433-3437
- 42 DUKSIN, D., HOLBROOK, K. et BORNSTEIN, P. (1978) 15  
Exp. Cell Res. 116, 153-165
- 43 EMMERLING, M.R., JOHNSON, C.D., MOSHER, D.F., 20  
LIPTON, B.H. et LILIEN, J.E. (1981) Biochemistry  
20, 3242-3247
- 44 ENGWALL, E. et RUOSLAHTI, E. (1977) Int. J. Cancer 20, 29, 47  
20, 1-5
- 45 ERICKSON, H.P., CARRELL, N. et DONAGH, J. (1981) 9  
J. Cell Biol. 91, 673-678
- 46 FAGAN, J.B., SOBEL, M.E., YAMADA, K.M., DE 34  
CROWBRUGGHE, B. et PASTAN, I. (1981) J. Biol.  
Chem. 256, 520-525
- 47 FISHER, S.J. et LAINE, R.A. (1979) J. Supramol. 13  
Struct. 11, 391-399

- 48 FUKUDA, M. et HAKOMORI, S.I. (1979) J. Biol. Chem. 13, 14, 63, 67, 74  
254, 5451-5457
- 49 FUKUDA, M., LEVERY, S.B. et HAKOMORI, S.I. (1982) 13, 14  
J. Biol. Chem. 257, 6856-6860
- 50 FURIE, M.B., FREY, A.B. et RIFKIN, D.B. (1980) 20, 22  
J. Biol. Chem. 255, 4391
- 51 GAHMBERG, C.G. et HAKOMORI, S.I. (1973) Proc. 3, 36  
Natl. Acad. Sci. 70, 3329-3333
- 52 GAHMBERG, C.G. et HAKOMORI, S.I. (1975) J. Biol. 36  
Chem. 250, 2447-2451
- 53 GAHMBERG, C.G., KIEHN, D. et HAKOMORI, S.I. (1974) 3, 4, 5, 9, 36  
Nature 248, 413-415
- 54 GOLD, L.I., FRANGIONE, B. et PEARLSTEIN, E. (1983) 12, 23, 24  
Biochemistry 22, 4113-4119
- 55 GOLD, L.I., GARCIA-PARDO, A., FRANGIONE, B., 20, 22  
FRANKLIN, E.C. et PEARLSTEIN, E. (1979) Proc. Natl.  
Acad. Sci. 76, 4803-4807
- 56 GRINNELL, F. (1980) J. Cell Biol. 86, 104-112 26, 31
- 57 GRINNELL, F. et FELD, M.K. (1979) Cell 17, 31  
117-129
- 58 GRINNELL, F., FELD, M.K. et MINTER, D. (1980) 20, 25  
Cell 19, 517-525
- 59 GUDEWICZ, P.W., MOLNAR, J., LAI, M.Z., BEEZHOLD, 20, 31  
D.W., SIEFRING, G.E., CREDO, R.B. et LORAND, L.  
(1980) J. Cell Biol. 87, 427-433
- 60 HAHN, L.H.E. et YAMADA, K.M. (1979) Cell 18, 20, 23  
1043-1051

- 61 HAHN, L.H.E. et YAMADA, K.M. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1160-1163 20, 22
- 62 HAKOMORI, S.I. (1975) Biochim. Biophys. Acta 417, 55-89 37, 42
- 63 HAYASHI, M., SCHLESINGER, D.H., KENNEDY, D.W. et YAMADA, K.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10017-10020 20, 23, 24
- 64 HAYASHI, M. et YAMADA, K.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11292-11300 17, 20, 23, 24, 25
- 65 HAYASHI, M. et YAMADA, K.M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5263-5267 20, 23, 24, 25
- 66 HAYASHI, M. et YAMADA, K.M. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3327-3331 20, 26
- 67 HAYASHI, M. et YAMADA, K.M. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3332-3340 20, 23, 24, 25
- 68 HAYMAN, E.G., ENGVALL, E. et RUOSLAHTI, E. (1981) J. Cell Biol. 88, 352-357 40
- 69 HEASMAN, J., HYNES, R.O., SWAN, A.P., THOMAS, V. et WYLIE, C.C. (1981) Cell 27, 437-447 33
- 70 HEDMAN, K., JOHANSSON, S., VARTIO, T., KJELLEN, L., VAHERI, A. et HÖÖK, M. (1982) Cell 28, 663-671 20
- 71 HOGG, N.M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 489-492 9, 36
- 72 HORMANN, H. et JELINIC, V. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 87-94 3, 20
- 73 HORMANN, H. et SEIDL, M. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1449-1452 20, 25

- 74 HUGHES, R.C., PENA, S.D.J., CLARK, J. et 31  
DOURMASHKIN, R.R. (1979) *Exp. Cell Res.* 121,  
307-314
- 75 HYNES, R.O.(1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 1, 3, 35, 36  
3170-3174
- 76 HYNES, R.O. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 458, 1  
73-107
- 77 HYNES, R.O., ALI, I.U., DESTREE, A.T., MAUTNER, 18, 40  
V., PERKINS, M.E., SINGER, D.R., WAGNER, D.D. et  
SMITH, K.K. (1978) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312,  
317-342
- 78 HYNES, R.O. et BYE, J.M. (1974) *Cell* 3, 113-120 4, 5
- 79 HYNES, R.O. et DESTREE, A.T. (1978) *Cell* 15, 20, 25  
875-886
- 80 HYNES, R.O. et WYKE, J.A. (1975) *Virology* 64, 34, 36, 39  
492-504
- 81 HYNES, R.O. et YAMADA, K.M. (1982) *J. Cell Biol.* 1, 7, 20, 32  
95, 369-377
- 82 ITAYA, K. et HAKOMORI, S.I. (1976) *F.E.B.S. Lett.* 36, 37  
66, 65-69
- 83 JILEK, F. et HORMANN, H. (1977) *Hoppe-Seyler's* 20, 25  
*Z. physiol. Chem.* 358, 1165-1168
- 84 JILEK, F. et HORMANN, H. (1979) *Hoppe Seyler's* 20, 29  
*Z. physiol. Chem.* 360, 597-603
- 85 JOHANSSON, S. et HÖÖK, H. (1980) *Biochem. J.* 20  
187, 521-524

- 86 JONE, C. et HAGER, L.P. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 16-20 3, 36
- 87 KERKAERT, J.P. (1978) *Anal. Biochem.* 80, 781-799 47
- 88 KESKI-OJA, J. et YAMADA, K.M. (1981) *Biochem. J.* 193, 615-620 20, 25
- 89 KLEINMAN, H.K., MARTIN, G.R. et FISHMAN, P.H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 3367-3371 26, 42
- 90 KÖRNFELD, K., REITMAN, M.L. et KÖRNFELD, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6633-6640 64
- 91 KOTELIANSKY, V.E., GLUKHOVA, M.A., BEJANIAN, M.V., SMIRNOV, V.N., FILIMONOV, V.V., ZALITE, O.M. et VENYAMINOV, S.Y. (1981) *Eur. J. Biochem.* 119, 619-624 9
- 92 KURKINEN, M., VARTIO, T. et VAHERI, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 624, 490-498 9
- 93 KUUSELA, P., RUOSLAHTI, E., ENGVALL, E. et VAHERI, A. (1976) *Immunochemistry* 13, 639-642 4, 55
- 94 KUUSELA, P., VAHERI, A., PALO, J. et RUOSLAHTI, E. (1978) *Lad. Clin. Med.* 92, 595-601 5
- 95 LABAT-ROBERT, J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6261-6265 6
- 96 LAEMMLY, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685 47
- 97 LAEMMLY, U.K. et FAVRE, M. (1973) *J. Mol. Biol.* 80, 575-599 47
- 98 LAHAV, J., SCHWARTZ, M.A. et HYNES, R.O. (1982) *Cell* 31, 253-262 20

- 99 LATERRA, J. et CULP, L.A. (1982) J. Biol. Chem. 17  
257, 719-726
- 100 LEDGER, P.W., NISHIMOTO, S.K., HAYASHI, S. et 16  
TANZER, H.L. (1983) J. Biol. Chem. 258, 547-554
- 101 McDONALD, J.A. et KELLEY, D.G. (1980) J. Biol. 20, 23, 25  
Chem. 255, 8848-8858
- 102 MAHDAVI, V. et HYNES, R.O. (1979) Biochim. Bio- 41  
phys. Acta 583, 167-178
- 103 MARCH, S.G., PARIKH, I. et CUATRECASAS, P. (1974) 50  
Anal. Biochem. 60, 149-152
- 104 MARCIANI, D.J., LYONS, L.B. et THOMPSON, E.B. 36, 37  
(1976) Cancer Res. 36, 2937-2944
- 105 MARQUETTE, D., MOLNAR, J., YAMADA, K.M., 18, 20  
SCHLESINGER, D., DARBY, S. et VAN ALTEN, P.  
(1981) Mol. Cell Biochem. 36, 147-155
- 106 MOLNAR, J. GELDER, F.B., LAI, M.Z., SIEFRING, G.E. 31  
CREDO, R.B. et LORAND, L. (1979) Biochemistry 18,  
3909-3916
- 107 MONTREUIL, J.(1982) Comprehensive Biochemistry 13  
Vol. 19 B part II (Neuberger, A. et Van Deenen,  
L.L.M. ed.) Elsevier, Amsterdam, 1-188
- 108 MORISSON, P., EDSALL, R. et MILLER, S.G. (1948) 1, 3, 5, 9, 20  
J. Am. Chem. Soc. 70, 3103-3108
- 109 MOSESSON, M.W., CHEN, A.B. et HUSEBY, R.M. (1975) 6, 8  
Biochim. Biophys. Acta 386, 509-524
- 110 MOSESSON, M.W. et UMFLEET, R.A. (1970) J. Biol. 3, 5, 8  
Chem. 245, 5728-5736

- 111 MOSHER, D.F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 491, 205-210 3
- 112 MOSHER, D.F. et PROCTOR, R.A. (1980) *Science* 209, 927-929 20, 25, 32
- 113 MOSHER, D.F., SCHAD, P.E. et VANN, J.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1181-1188 20, 25, 32
- 114 MUIR, L.W., BORNSTEIN, P. et ROSS, R. (1976) *Eur. J. Biochem.* 64, 105-114 11
- 115 MURAMATSU, T., ATKINSON, P.M., NATHENSON, S.G. et CECCARINI, C. (1973) *J. Mol. Biol.* 80, 781-799 48
- 116 OGATA, S.I., MURAMATSU, T. et KOBATA, A. (1976) *Nature*, 259, 580-582 1
- 117 OLDEN, K., PRATT, R.M. et YAMADA, K.M. (1978) *Cell* 13, 461-473 34, 41
- 118 OLDEN, K., PRATT, R.M. et YAMADA, K.M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 3343-3347 15, 16, 34
- 119 OLDEN, K. et YAMADA, K.M. (1977) *Cell* 11, 957-969 16, 34, 36, 40,41
- 120 PANDE, H., CORKILL, J., SAILOR, R. et SHIVELY, J.E. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 265-272 15
- 121 PEARLSTEIN, E., HYNES, R.O., FRANKS, L.M. et HEMMING, V.L. (1976) *Cancer Res.* 36, 1475-1480 36, 37
- 122 PEARLSTEIN, E. et WATERFIELD, M.D. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 362, 1-12 4, 36
- 123 PENA, S.D.J. et HUGHES, R.C. (1978) *Cell Biol. Int. Rep.* 2, 339-344 18

- 124 PENNYPACKER, J.P., HASSEL, J.R., YAMADA, K.M. et 33  
PRATT, R.M. (1979) *Exp. Cell Res.* 121, 411-415
- 125 PIERSCHBACKER, M.D., HAYMAN, E.G. et RUOSLAHTI, E. 20, 23  
(1981) *Cell* 26, 259-267
- 126 POUYSSEGUR, J., WILLINGHAM, M. et PASTAN, I. 33  
(1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 243-247
- 127 RICHTER, M., SEIDL, M. et HORMANN, H. (1981) 20, 23, 24, 25  
*Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 362, 399-408
- 128 ROBBINS, P.M., WICKUS, G.G., BRANTON, P.E., 4, 5, 36  
GAFFNEY, B.J., HIRSCHBERG, C.B., FUCHS, P.  
et BLUMBERG, P.M. (1974) *Cold Spring Harb.*  
*Symp. Quant. Biol.* 39, 1173-1180
- 129 ROCH, A.M., QUASH, G., RIPOLL, M. et MARDON, M. 41  
(1983) *Biochem. J.* 210, 137-144
- 130 RUOSLAHTI, E., ENGVALL, E., HAYMAN, E.G. et 6, 15  
SPIRO, R.G. (1981) *Biochem. J.* 193, 295-299
- 131 RUOSLAHTI, E. et HAYMAN, E.G. (1980) *Biochim.* 20, 23, 29  
*Biophys. Acta* 631, 350-358
- 132 RUOSLAHTI, E., HAYMAN, E.G., ENGVALL, E. 20, 23, 24  
COTHRAN, W.C. et BUTLER, W.T. (1981) *J. Biol.*  
*Chem.* 256, 7277-7281
- 133 RUOSLAHTI, E., HAYMAN, E.G., KUUSELA, P., 20, 22  
SHIVELY, J.E. et ENGVALL, E. (1979) *J. Biol.*  
*Chem.* 254, 6054-6059
- 134 RUOSLAHTI, E., JALANKO, H., COMINGS, D.E., NEVILLE, 41  
A.M. et RAGHAVAN, D. (1981) *Int. J. Cancer* 27,  
763-767

- 135 RUOSLAHTI, E. et VAHERI, A. (1974) *Nature* 248, 790-791 4
- 136 RUOSLAHTI, E., VAHERI, A., KUUSELA, P. et LINDER, E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 322, 352-358 4, 5
- 137 RYDEN, C., RUBIN, C., SPEZIALE, P., HÖÖK, M., LINDBERG, M. et WADSTRÖM, T. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3396-3401 20, 25, 32
- 138 SAUTER, U.V. et GLICK, M.C. (1979) *Biochemistry* 18, 2533-2540 1
- 139 SEKIGUCHI, K., FUKUDA, M. et HAKOMORI, S.I. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6452-6462 20, 22, 23, 24, 25
- 140 SEKIGUCHI, K. et HAKOMORI, S.I. (1980) *Proc. Natl. Acad. sci.* 77, 2661-2665 13, 20, 23, 24
- 141 SMITH, D.E., MOSHER, D.F., JOHNSON, R.B. et FUCHT, L.T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5831-5838 13
- 142 SMITH, H.S., RIGGS, J.L. et MOSESSON, M.W. (1979) *Cancer Res.* 39, 4138-4145 37
- 143 SPIEGEL, E., BURGER, M. et SPIEGEL, M. (1980) *J. Cell Biol.* 87, 309-313 33
- 144 STENMAN, S., WARTIOVAARA, J. et VAHERI, A. (1977) *J. Cell Biol.* 74, 453-467 34, 39
- 145 TAKASAKI, S., IKEHUTA, M. et KOBATA, A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 735-742 1
- 146 TAKASAKI, S., YAMASHITA, K., SUZUKI, K., IWANAGA, S. et KOBATA, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8548-8553 13, 14

- 147 TOYOSHIMA, S., OSAWA, T. et TONOMURA, A. (1970) 50  
Biochim. Biophys. Acta, 221, 514-521
- 148 VAHERI, A. et MOSHER, D.F. (1978) Biochim Biophys. 1, 36  
Acta 516, 1-25
- 149 VAHERI, A. et RUOSLAHTI, E. (1975) J. Exp. Med. 36  
142, 530-538
- 150 VAHERI, A., RUOSLAHTI, E., WESTERMARK, B. et 36  
POUTEN, J. (1976) J. Exp. Med. 143, 64-72
- 151 VAN DE WATER, L., SCHROEDER, S., CRENSHAW, E.B. et 20, 31  
HYNES, R.O. (1981) J. Cell Biol. 90, 32-39
- 152 VISHER, P. et HUGHES, R.C. (1981) Eur. J. Biochem. 16  
117, 275-284
- 153 VOSS, B., ALLAH, S., RAUTERBERG, J., ULLRICH, K. 5  
GIESELMANN, V. et VONFIGURA, K. (1979) Biochem.  
Biophys. Res. Commun. 90, 1348-1354
- 154 VUENTO, M. (1979) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 26  
360, 1327-1333
- 155 VUENTO, M., WRANN, M. et RUOSLAHTI, E. (1977) 8, 9, 11  
F.E.B.S. Lett. 82, 227-231
- 156 WAGNER, D.D. et HYNES, R.O. (1979) J. Biol. Chem. 13, 20  
254, 6746-6754
- 157 WAGNER, D.D. et HYNES, R.O. (1980) J. Biol. Chem. 11, 13, 20, 22  
255, 4304-4312
- 158 WAGNER, D.D., IVATT, R., DESTREE, A.T. et HYNES, 36, 41, 47, 53  
R.O. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11708-11715
- 159 WARREN, L., BUCK, C.A. et TUSZINSKY, G.P. (1978) 1, 56  
Biochim, Biophys. Acta 516 , 97-127

- 160 WARTIOVAARA, J., LINDER, E., RUOSLAHTI, E. et 36, 39  
VAHERI, A. (1974) J. Exp. Med. 140, 1522-1533
- 161 WEST, C.M., LANZA, R., ROSENBLUM, J., LOWE, M., 33  
HOLTZER, H. et AVDALONIC, N. (1979) Cell 17, 491-  
501
- 162 WICKUS, G.G. et ROBBINS, P.W. (1973) Nature 245, 41  
65-67
- 163 WILLIAMS, E.C., JANNEY, P.A., JOHNSON, R.B. et 20, 22  
MOSHER, D.F. (1983) J. Biol. Chem. 258, 5911-  
5914
- 164 WILLINGHAM, M.C., YAMADA, K.M., YAMADA, S.S., 39  
POUYSEGUR, J. et PASTAN, I. (1977) Cell 10 ,  
375-380
- 165 WILSON, B.S., RUBERTO, G. et FERRONE, S. (1981) 41  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 784-791
- 166 WOLFF, I., TIMPL, R., PECKER, I. et STEFFEN, C. 5  
(1967) Vox Sang. 12, 443-456
- 167 WRANN, M. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 14  
84, 269-274
- 168 YAMADA, K.M. (1982) in Glycoconjugates Vol. 3 1, 5, 8, 10, 11,  
(Horowitz, M.I. ed.) Acad. Press N.Y., 331-362 18, 21, 31
- 169 YAMADA, K.M., CRITCHLEY, D.R., FISHMAN, P.H. et 26  
MOSS, J. (1983) Exp. Cell Res. 143, 295-302
- 170 YAMADA, K.M. et KENNEDY, D.W. (1979) J. Cell Biol. 18, 26  
80, 492-498
- 171 YAMADA, K.M., KENNEDY, D.W., GROTENDORST, G.R. 20, 26  
et MOMOI, T. (1981) J. Cell Physiol. 109, 343-  
351

172. YAMADA, K.M., KENNEDY, D.W., KIMATA, K. et PRATT, R.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6055-6063 20
- 173 YAMADA, K.M. et OLDEN, K. (1978) Nature 275, 179-184 1
- 174 YAMADA, K.M., SCHLESINGER, D.H., KENNEDY, D.W. et PASTAN, I. (1977) Biochemistry 16, 5552-5559 8, 11, 16
- 175 YAMADA, R.K. et WESTON, J.A. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 3492-3496 4, 5, 9
- 176 ZARDI, L., SIRI, A., CARNEMOLLA, B., SANTI, L., GARDNER, W.D. et HOCH, S.O. (1979) Cell 18, 649-657 13, 20, 25



## RESUME

La fibronectine est une glycoprotéine de haute masse moléculaire, largement répandue dans le règne animal, présente dans le plasma et associée à d'autres macromolécules dans le réseau fibrillaire dense qui constitue la matrice extracellulaire et qui assure l'adhérence des cellules.

La transformation maligne induit de profondes perturbations de la structure et du métabolisme cellulaire se traduisant, au niveau des N-glycosylprotéines membranaires, par l'apparition de structures tri- et tétra-antennées de masse moléculaire élevée. En outre, la transformation s'accompagne généralement d'une perte de la fibronectine associée à la membrane.

Disposant d'une méthode de fractionnement des glycopeptides associant la chromatographie de tamisage moléculaire à la chromatographie d'affinité sur lectines (Con A, puis *Lens culinaris*), nous avons entrepris d'isoler et d'explorer les structures glycaniques de la fibronectine des cellules transformées. Cette étude a été effectuée sur les fibronectines sécrétées dans le milieu de culture de fibroblastes de Hamster, normaux et viro-transformés, cultivés en présence de précurseurs monosaccharidiques marqués au  $^3\text{H}$  (cellules normales) et au  $^{14}\text{C}$  (cellules transformées). Après marquage métabolique, purification et hydrolyse pronasique, les glycopeptides ont été cofractionnés en mélange : 1 - en fonction de leur masse moléculaire par gel filtration sur colonne d'Ultrogel AcA 202 ; 2 - en fonction de leur affinité vis-à-vis de la Concanavalline A et de la lectine de *Lens culinaris* insolubilisées sur Sepharose ; 3 - après libération des glycanes par hydrazinolyse/N-réacétylation, en fonction de leur charge, par H.P.L.C. d'échange d'ions.

Au vu des résultats obtenus, il apparaît que la fibronectine des cellules transformées présente, comme les glycoprotéines membranaires, des structures glycaniques de masse moléculaire plus élevée que la fibronectine normale : la fibronectine normale renferme essentiellement des glycanes N-acétyl-lactosaminiques biantennés, fucosylés, neutres et monosialylés, tandis que la fibronectine des cellules transformées est enrichie en glycanes plus branchés et plus sialylés, structures tri- et tétraantennées substituées par au moins deux résidus d'acide N-acétylneuraminique.

Ces résultats confirment et étendent à une glycoprotéine extracellulaire, les observations faites à propos des glycoprotéines des cellules elles-mêmes et témoignent du dérèglement de la biosynthèse des N-glycanes au niveau des glycosyltransférases de branchement des 3ème et 4ème antennes. En outre, ces modifications des structures glycaniques de la fibronectine pourrait apporter une explication à sa disparition de la surface des cellules transformées, la perte d'adhésivité cellulaire qui en découle pouvant faciliter la dissociation des cellules tumorales conduisant à la métastase.

Mots clefs: Fibronectine, glycanne, fibroblaste, transformation maligne, lectine.

---