

50376
1987
153

N° d'Ordre : 81

50376
1987
153

THESE DE DOCTORAT DE BIOCHIMIE

par

Thierry MAGALLON

soutenu le 3 Mars 1987



ETUDE COMPAREE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES
DES FIBRONECTINES PLASMATIQUES DE SUJETS SAINS ET CANCEREUX

Mise en évidence de modifications
dans les cas de cancers des voies digestives

JURY : - Professeur J. MONTREUIL : Président du jury
- Professeur M. MONSIGNY : Rapporteur
- Professeur G. STRECKER : Rapporteur
- Docteur C. MAZURIER : Examineur
- Professeur G. SPIK : Examineur

Je remercie tous ceux qui m'ont accueilli dans ce laboratoire
et m'ont permis de réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe du Professeur Jean Montreuil, au laboratoire de Chimie Biologique, (Directeur Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au C.N.R.S. N° 217 : Relation structure-fonction des constituants membranaires). Il a bénéficié d'une aide du Ministère de la Recherche et de la Technologie :

- Allocation de recherche N° 472

ABREVIATIONS

α -M.Glc	: α -Méthyl-D-Glucoside
B.S.T.F.A.	: Bisilyl-trifluoroacétamide
Con A	: Lectine de <i>Concanavalia ensiformis</i>
D.O.	: Densité optique
dpm	: désintégration par minute
D.T.T.	: Di-Thio-Thréitol
E.D.T.A.	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
Fuc	: L-Fucose
Gal	: D-Galactose
GlcNAc	: N-Acétyl-D-Glucosamine
H.P.L.C.	: Chromatographie liquide de haute performance
KD	: Kilo Dalton
Kd	: Constante de dissociation
Man	: D-Mannose
NeuAc	: Acide N-Acétylneuraminique
P.B.S.	: Tampon Phosphate 10 mM pH 7,4 , NaCl 0,15 M
P.M.S.F.	: Phényl-méthylsulfonyl fluoride
R.M.N.	: Résonance Magnétique Nucléaire
S.D.S.	: Dodécyl sulfate de sodium
T.M.S.	: Triméthyl-silyl

ABREVIATIONS DES ACIDES AMINES

A	: Alanine	(Ala)
C	: Cystéine	(Cys)
D	: Acide Aspartique	(Asp)
E	: Acide Glutamique	(Glu)
F	: Phényl Alanine	(Phe)
G	: Glycocolle	(Gly)
H	: Histidine	(His)
I	: Isoleucine	(Ileu)
K	: Lysine	(Lys)
L	: Leucine	(Leu)
M	: Methionine	(Meth)
N	: Asparagine	(Asn)
P	: Proline	(Pro)
Q	: Glutamine	(Gln)
R	: Arginine	(Arg)
S	: Sérine	(Ser)
T	: Thréonine	(Thr)
V	: Valine	(Val)
W	: Tryptophane	(Try)
Y	: Tyrosine	(Tyr)

TABLE DES MATIÈRES

I N T R O D U C T I O N

1

G E N E R A L I T E SH I S T O R I Q U E

3

C A R A C T E R I S T I Q U E S D E L A F I B R O N E C T I N E

4

<u>I</u>	-	<u>LOCALISATION ET BIOSYNTHESE</u>	4
<u>A</u>	-	<u>LOCALISATION DANS LE REGNE ANIMAL</u>	4
<u>B</u>	-	<u>BIOSYNTHESE CELLULAIRE</u>	6
		1 - La fibronectine plasmatique	6
		2 - La fibronectine cellulaire	6
<u>II</u>	-	<u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	7
<u>A</u>	-	<u>CONFORMATION DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE</u>	7
<u>B</u>	-	<u>CONFORMATION DE LA FIBRONECTINE CELLULAIRE</u>	7
<u>C</u>	-	<u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	11
<u>D</u>	-	<u>GROUPEMENTS THIOLS</u>	11
<u>III</u>	-	<u>STRUCTURE DES DIFFERENTES FIBRONECTINES</u>	11
<u>A</u>	-	<u>HETEROGENEITE DES FIBRONECTINES</u>	11
		1 - La phosphorylation	13
		2 - La glycosylation	13

<u>B</u>	-	<u>ETUDE COMPAREE DES DEUX SOUS-UNITES</u>	13
		1 - Réduction	13
		2 - Cathepsine D	13
		3 - Trypsine	15
		4 - S - Cyanylation	15
		5 - Thermolysine	15
		6 - Partie N- terminale	15
<u>C</u>	-	<u>ETUDE COMPAREE DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE ET CELLULAIRE</u>	15
		1 - Cathepsine D	15
		2 - Trypsine	17
		3 - S - Cyanylation	17
		4 - Etude des différences d'activité biologique	17
<u>IV</u>	-	<u>LES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE</u>	19
<u>A</u>	-	<u>STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES</u>	19
		1 - La fibronectine plasmatique	19
		2 - La fibronectine placentaire	19
		3 - La fibronectine amniotique	21
		4 - Discussion	21
<u>B</u>	-	<u>ROLE DES GLYCANNES DES FIBRONECTINES</u>	21
		1 - Protection vis-à-vis de la protéolyse	23
		2 - Intervention dans l'affinité des fibronectines pour leur substrat	23
		3 - Discussion	23
<u>V</u>	-	<u>LE GENE DE LA FIBRONECTINE</u>	24
<u>A</u>	-	<u>HYPOTHESE D'UN OU DEUX GENES</u>	24
<u>B</u>	-	<u>ISOLEMENT DES GENES DE LA FIBRONECTINE</u>	25
<u>C</u>	-	<u>DISCUSSION</u>	27

<u>ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA FIBRONECTINE</u>	27
<u>I</u> - <u>ADHESION INTERCELLULAIRE</u>	29
<u>A</u> - <u>LES INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA MATRICE</u>	29
<u>B</u> - <u>LES SITES D'ADHESION A LA CELLULE</u>	29
<u>II</u> - <u>ADHESION CELLULAIRE A UN SUBSTRAT</u>	30
<u>A</u> - <u>ASSOCIATION AVEC LE COLLAGENE</u>	30
<u>B</u> - <u>ASSOCIATION AVEC LES MATERIAUX PLASTIQUES</u>	31
<u>III</u> - <u>L'OPSONISATION PAR LES FIBRONECTINES</u>	32
<u>IV</u> - <u>ROLE DE LA FIBRONECTINE DANS LE CHIMIOTACTISME ET LA</u> <u>MOBILITE CELLULAIRE</u>	32
<u>A</u> - <u>IN VITRO</u>	32
<u>B</u> - <u>LA CICATRISATION</u>	33
1 - La lésion vasculaire	33
2 - "L'assainissement" de la plaie	34
3 - La reconstitution du tissu	34
<u>C</u> - <u>LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</u>	35
<u>V</u> - <u>ROLE DE LA FIBRONECTINE DANS LA DIFFERENCIATION</u> <u>CELLULAIRE</u>	35
<u>LES DOMAINES FONCTIONNELS DE LA FIBRONECTINE</u>	36
<u>I</u> - <u>COUPURES PROTEOLYTIQUES ET ISOLEMENT DES DOMAINES</u>	36
<u>A</u> - <u>PREMIERE METHODE D'ISOLEMENT</u>	36
<u>B</u> - <u>DEUXIEME METHODE D'ISOLEMENT</u>	38
<u>C</u> - <u>ETUDE IMMUNOLOGIQUE DES DOMAINES</u>	38

<u>II</u>	-	<u>DOMAINE N- TERMINAL</u>	40
<u>A</u>	-	<u>ASSOCIATION AVEC L'ACTINE</u>	40
<u>B</u>	-	<u>ASSOCIATION FIBRONECTINE-FIBRONECTINE</u>	40
<u>C</u>	-	<u>ASSOCIATION AVEC DES BACTERIES</u>	41
<u>III</u>	-	<u>DOMAINE DE FIXATION AU COLLAGENE</u>	41
<u>A</u>	-	<u>LA GLYCOSYLATION DU DOMAINE</u>	41
<u>B</u>	-	<u>STRUCTURE DU COLLAGENE</u>	42
<u>IV</u>	-	<u>DOMAINE DE L'ADHESION CELLULAIRE</u>	42
<u>V</u>	-	<u>DOMAINE DE FIXATION DES PROTEOGLYCANNES</u>	44
<u>A</u>	-	<u>ASSOCIATION AVEC L'HEPARINE</u>	44
		1 - Premier site d'affinité	44
		2 - Deuxième site d'affinité	44
		3 - Troisième site d'affinité	45
		4 - Cinétique d'affinité	45
<u>B</u>	-	<u>ASSOCIATION AVEC L'ACIDE HYALURONIQUE</u>	45
<u>C</u>	-	<u>ASSOCIATION AVEC LES CHONDROÏTINES SULFATES</u>	45
<u>VI</u>	-	<u>DOMAINE D'ADHESION DE LA FIBRINE</u>	45

LA FIBRONECTINE DANS LA PATHOLOGIE 48

<u>I</u>	-	<u>PATHOLOGIE NON CANCEREUSE</u>	48
<u>A</u>	-	<u>ETUDE CLINIQUE <i>IN SITU</i></u>	49
<u>B</u>	-	<u>ETUDE CLINIQUE DU PLASMA</u>	50
<u>C</u>	-	<u>CORRELATION PAR ETUDES <i>IN VITRO</i></u>	51
<u>D</u>	-	<u>CONCLUSION</u>	51

<u>II</u> - <u>PATHOLOGIE CANCEREUSE</u>	52
<u>A</u> - <u>ETUDE CLINIQUE <i>IN SITU</i></u>	52
1 - Cancer du sein	52
2 - Tumeur d'ascite	53
3 - Carcinome	53
4 - Sarcome	54
<u>B</u> - <u>ETUDE CLINIQUE DU PLASMA</u>	54
<u>C</u> - <u>CORRELATION PAR ETUDES <i>IN VITRO</i></u>	55
1 - Types cellulaires concernés	56
2 - Causes de la diminution de la fibronectine cellulaire	56
a - Synthèse	56
b - Dégradation protéolytique	57
c - Modifications structurales	58
d - Modifications de charge	58
e - Modifications glycaniques	58
f - Récepteurs	59
<u>D</u> - <u>CONCLUSION</u>	59

TRAVAUX PERSONNELS

	<u>MATERIEL ET METHODES</u>	60
<u>I</u> - <u>MATERIEL</u>		60
<u>II</u> - <u>METHODES</u>		61

<u>A</u>	-	<u>ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DE LA FIBRONECTINE</u>	61
		1 - Préparation de l'immunsérum anti-fibronectine	61
		2 - Immunodiffusion radiale	61
		3 - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle	61
		4 - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle dite en "rockets"	62
		5 - Immunoélectrophorèse d'affinité bidimensionnelle	62
		a - première dimension	62
		b - deuxième dimension	62
		c - analyse des profils obtenus	63
<u>B</u>	-	<u>PURIFICATION DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE HUMAINE</u>	63
		1 - Chromatographie d'affinité sur gélatine immobilisée	63
		2 - Tamisage moléculaire	64
		3 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S.	64
<u>C</u>	-	<u>OBTENTION ET FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE</u>	65
		1 - Libération des N- et O- glycanes par hydrolyse alcaline	65
		2 - Libération des N- glycanes par hydrazinolyse	65
		3 - Chromatographie d'affinité sur colonne de lectine immobilisée	66
		4 - Fractionnement des glycanes par chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions	67
		5 - Fractionnement des glycanes sur AcA 202.	68

<u>D</u>	-	<u>ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE</u>	68
		1 - Détermination de la composition molaire des monosaccharides	68
		a - méthanolyse par trifluoroacétylation	68
		b - microméthanolyse par triméthylsilylation	68
		2 - Détermination de la structure primaire des glycanes par microméthylation	69
		3 - Analyse structurale des glycanes par R.M.N.	70

RESULTATS 71

<u>I</u>	-	<u>ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE</u>	72
<u>A</u>	-	<u>OBTENTION D'ANTI-CORPS ANTI-FIBRONECTINE SPECIFIQUES</u>	72
<u>B</u>	-	<u>ANALYSE COMPARATIVE DE PLASMAS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES</u>	72
<u>C</u>	-	<u>ANALYSE DE LA CHARGE ELECTRIQUE DES FIBRONECTINES NORMALES ET PATHOLOGIQUES</u>	76
<u>II</u>	-	<u>PURIFICATION DE LA FIBRONECTINE</u>	78
<u>A</u>	-	<u>PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</u>	78
<u>B</u>	-	<u>PURIFICATION PAR TAMISAGE MOLECULAIRE</u>	78
<u>C</u>	-	<u>ETUDE DE LA PURETE DE LA FIBRONECTINE</u>	82
		1 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S.	82
		2 - Analyse par immunoélectrophorèse bidimensionnelle	82

<u>III-</u>	<u>FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES OBTENUS PAR</u>	82
	<u>HYDRAZINOLYSE</u>	
<u>A</u>	<u>- FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR</u>	82
	<u>CON A</u>	
<u>B</u>	<u>- FRACTIONNEMENT PAR H.P.L.C. D'ECHANGE D'IONS</u>	91
<u>IV</u>	<u>- DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES</u>	97
	<u>DE LA FIBRONECTINE</u>	
<u>A</u>	<u>- DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA</u>	97
	<u>FRACTION FEC 10mM</u>	
<u>B</u>	<u>- DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA</u>	104
	<u>FRACTION FNRC</u>	
	<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	108

I N T R O D U C T I O N

La fibronectine est une glycoprotéine de haute masse moléculaire (440-480 KD). Elle a pu être identifiée dans l'ensemble du règne animal sous deux formes : une forme soluble dans les liquides biologiques et une forme insoluble à la surface des cellules, intégrée dans la matrice extracellulaire où elle joue un rôle primordial dans les phénomènes d'adhésion cellulaire et de cohésion tissulaire (17,117,122,293,319,324).

Lors de la transformation maligne, il a été montré sur des cellules en culture, une diminution de la fibronectine présente à la surface des cellules viro-transformées. Parallèlement, la transformation maligne provoque des remaniements importants de la structure et du métabolisme de la cellule. Elle induit des modifications des structures glycaniques, une simplification de la partie oligosaccharidique des glycolipides (99) et une "polyantennarisation" des N - glycannes des glycoprotéines (34, 42, 75,205,257,270,284, 304,306).

La fibronectine n'échappe pas à cette règle, et l'on observe une augmentation de l'antennarisation des glycannes de cette glycoprotéine. D'où l'hypothèse d'un rôle important de la fibronectine lors de la cancérisation et du processus de métastase.

Au début de notre étude, les travaux effectués *in vivo*, portaient essentiellement sur l'immunolocalisation de la fibronectine cellulaire au niveau des tissus cancérisés et adjacents et sur le dosage et l'étude des variations de la concentration de la fibronectine plasmatique dans le sang des malades.

Nous avons donc entrepris l'étude de la partie glycanique de la fibronectine plasmatique afin de caractériser d'éventuelles modifications des glycanes de cette glycoprotéine de plasmas de patients atteints de différents types de cancers.

Dans cette optique, nous avons dans un premier temps étudié cette glycoprotéine par immunoélectrophorèse croisée, puis poursuivi cette recherche par une analyse structurale des glycanes de la fibronectine plasmatique normale et isolée du plasma d'individus cancéreux.

GENERALITES

HISTORIQUE

La découverte de la fibronectine remonte à 1948, année où elle fut mise en évidence par Morisson *et al.* (191) au niveau des cryoprécipités plasmatiques humains (fractions protéiniques du plasma enrichies en fibronectine et fibrinogène et précipitant à froid) ce qui lui valut le nom de "Cold Insoluble Globulin" ou C.I.G.

Toutefois, ce n'est qu'en 1973 que cette glycoprotéine fut étudiée de manière intensive, date à laquelle Hynes (116) mit en évidence la diminution, à la surface de fibroblastes viro-transformés, d'une glycoprotéine s'apparentant à la fibronectine et qu'il désigna sous le nom de "Large External Transformation Sensitive" protéine ou L.E.T.S. protéine. Elle fut également identifiée par plusieurs autres équipes dans les mois et les années qui suivirent, où elle prit les noms de Protéine Zeta (236), galactoprotéine a (79) et bande I (215).

En 1975, il devint clair que ces glycoprotéines cellulaires et la C.I.G. plasmatique étaient des formes différentes d'une même protéine (251). De ce fait, en 1976, le groupe de Ruoslahti proposa de les rassembler sous le nom de fibronectine - du latin *fibra* (fibre) et *nectere* (lier) (156).

La fibronectine plasmatique correspond donc également au facteur anti-gélatine (317) et à l' α_2 -opsonic-glycoprotéine.(35).

La fibronectine est probablement la molécule d'adhésion cellulaire la mieux connue à l'heure actuelle. Des analyses biochimiques des mécanismes par lesquels la fibronectine agit, combinées avec des analyses immunologiques et de recombinaison de D.N.A. des différentes formes de la fibronectine, ont permis de comprendre son action au cours de nombreux événements cellulaires.

Un nombre très élevé de publications récentes a permis de décrire la structure et la fonction de la fibronectine aussi bien *in vitro* que *in vivo* (17, 77, 88,111,118,145,192,213,241,255,307,320,321). L'abondance des publications portant sur la fibronectine indique à quel point l'attention des chercheurs est retenue par cette glycoprotéine complexe.

CARACTERISTIQUES DE LA FIBRONECTINE

I - LOCALISATION ET BIOSYNTHESE

A - LOCALISATION DANS LE REGNE ANIMAL

La fibronectine a été découverte dans des cultures cellulaires, le sang et les tissus d'une grande variété d'animaux. Une recherche systématique réalisée à l'aide d'anti-corps anti-fibronectine plasmatique humaine a permis de démontrer sa présence chez tous les vertébrés ainsi que chez beaucoup d'espèces d'invertébrés (3) (Figure 1). La présence de la fibronectine dans les organismes pluricellulaires à travers le règne animal suggère que cette glycoprotéine présente d'une manière générale, une grande importance, son rôle le plus probable étant celui d'une protéine de structure. Le fait que la fibronectine soit reconnue par un anti-corps anti-fibronectine

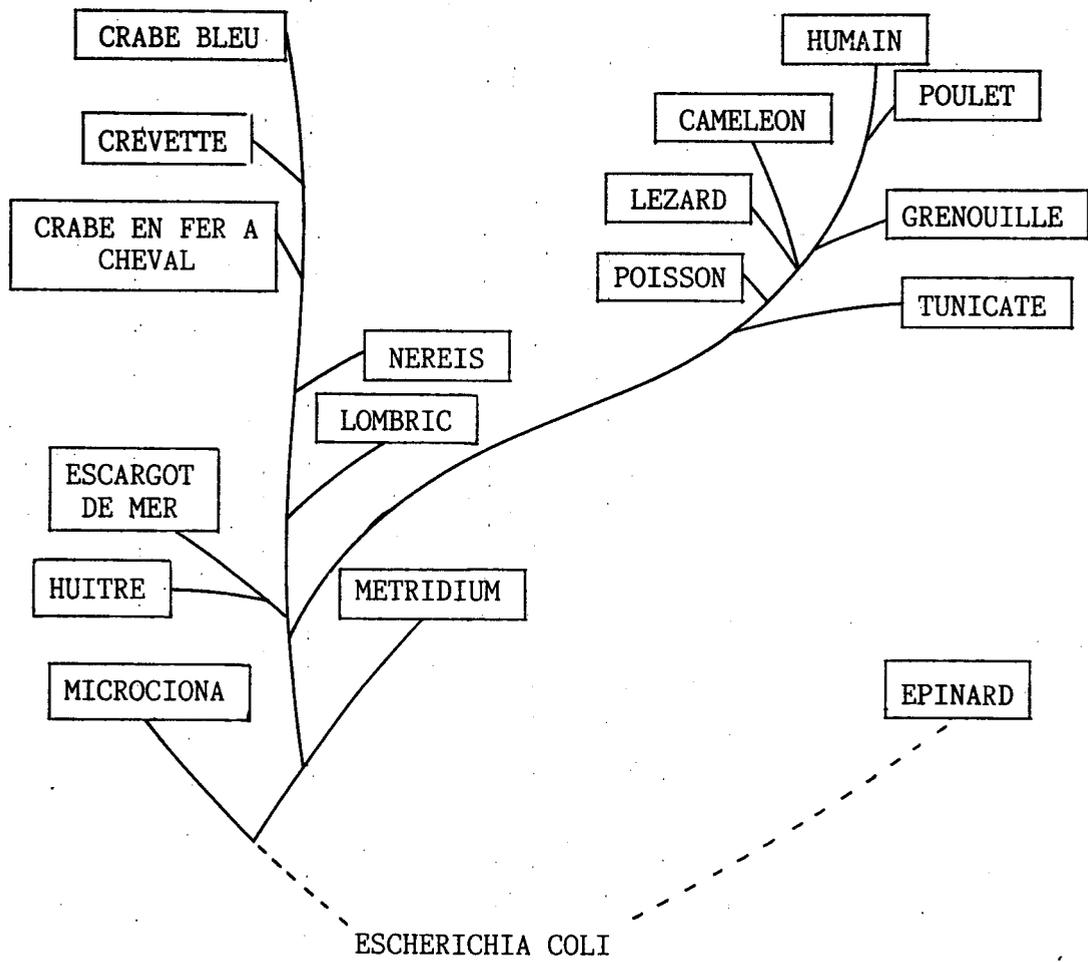


Figure 1 - Localisation de la fibronectine dans le monde vivant (3)

743 30
humaine suggère qu'au travers de l'évolution, cette protéine a conservé l'essentiel de sa structure.

B - BIOSYNTHESE CELLULAIRE

1 - La fibronectine plasmatique

La fibronectine existe sous une forme soluble dans le sang, désignée sous le nom de "fibronectine plasmatique" ou de "Cold Insoluble Globulin"(C.I.G. Le plasma humain en contient 300 mg par litre (192). Cette teneur augmente en fonction de l'âge des individus (160,167), ceci plus rapidement chez la femme que chez l'homme (167). Un certain nombre de types cellulaires peuvent être impliqués dans la synthèse de la fibronectine plasmatique et, à ce jour, son origine n'a pas encore été clairement définie. Les cellules endothéliales restent pour l'instant les meilleurs candidats à la synthèse et l'excrétion de fibronectine (32,129,173), avec les macrophages (13,296,300) et les hépatocytes. Les hépatocytes en culture synthétisent de la fibronectine (301), qu'ils incorporent dans la matrice extracellulaire (178,301). Plus récemment, il a été montré au niveau des cultures cellulaires d'hépatocytes de deux espèces différentes (le rat et le hamster) que la majeure partie de la fibronectine synthétisée et excrétée était de type plasmatique (288). On la retrouve aussi, mais en concentration plus faible dans d'autres liquides biologiques comme le liquide céphalo-rachidien (157) et le liquide amniotique.

2 - La fibronectine cellulaire

La fibronectine existe également sous une forme insoluble à la surface des cellules *in vivo* et *in vitro*, ainsi que dans la matrice extracellulaire. Elle prend alors le nom de "fibronectine cellulaire" et forme un réseau complexe de fibrilles qui interagissent avec les autres composants de la matrice extracellulaire comme le collagène et les protéoglycannes.

Cette forme de fibronectine est synthétisée essentiellement par les fibroblastes (75), mais aussi par d'autres cellules comme les cellules endothéliales et épithéliales, les kératinocytes (207) et les cellules de l'épiderme (168).

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les fibronectines de type plasmatique et cellulaire possèdent des caractéristiques physico-chimiques très proches (Tableau I) mais des conformations spatiales différentes.

A - CONFORMATION DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE

La fibronectine plasmatique est un dimère constitué de deux sous-unités très voisines d'une masse de 215 à 220 KD. Les sous-unités sont réunies par deux ponts disulfures situés à l'extrémité C - terminale de la molécule (80). La conformation de la fibronectine varie en fonction du milieu dans lequel elle se trouve. En concentration élevée en sels (CO_3HNNH_4 0,2 M) elle prend une forme en V, très dépliée, tandis qu'en présence de sels en concentration faible (PIPES 1 mM), elle prend une forme globulaire, compacte (67,237) (Figure 3). Un pH élevé tend également à donner une conformation étalée à la fibronectine plasmatique (67,237).

Une indication précieuse relative aux structures primaire et secondaire de la fibronectine plasmatique bovine a été apportée par Petersen *et al* (218) (Figure 2). En effet, un certain nombre d'homologies internes apparaissent, suggérant que la molécule pourrait être la conséquence de multiples duplications d'un gène originel.

B - CONFORMATION DE LA FIBRONECTINE CELLULAIRE

La fibronectine cellulaire existe sous forme de dimères, mais aussi sous forme d'oligomères liés par des ponts disulfures (6 ,120,325). Des

Tableau I - Propriétés physico-chimiques des fibronectines plasmatique et cellulaire (319).

Les résultats rassemblés dans ce tableau proviennent des travaux de Mosesson et Umfleet (194), Mosesson *et al.* (193), Yamada *et al.* (325), Vuento *et al.* (302 et Alexander *et al.* (7,6), Rocco *et al.* (238)

	Fibronectine cellulaire	Fibronectine plasmatique
Masse moléculaire	220-240 KD	215-220 KD
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)	96 à 145 Å
Volume spécifique partiel	0,72	0,72
Coefficient de friction	2,8-2,9 (pH 11)	2,8 (pH 11) 1,7 (pH 7)
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



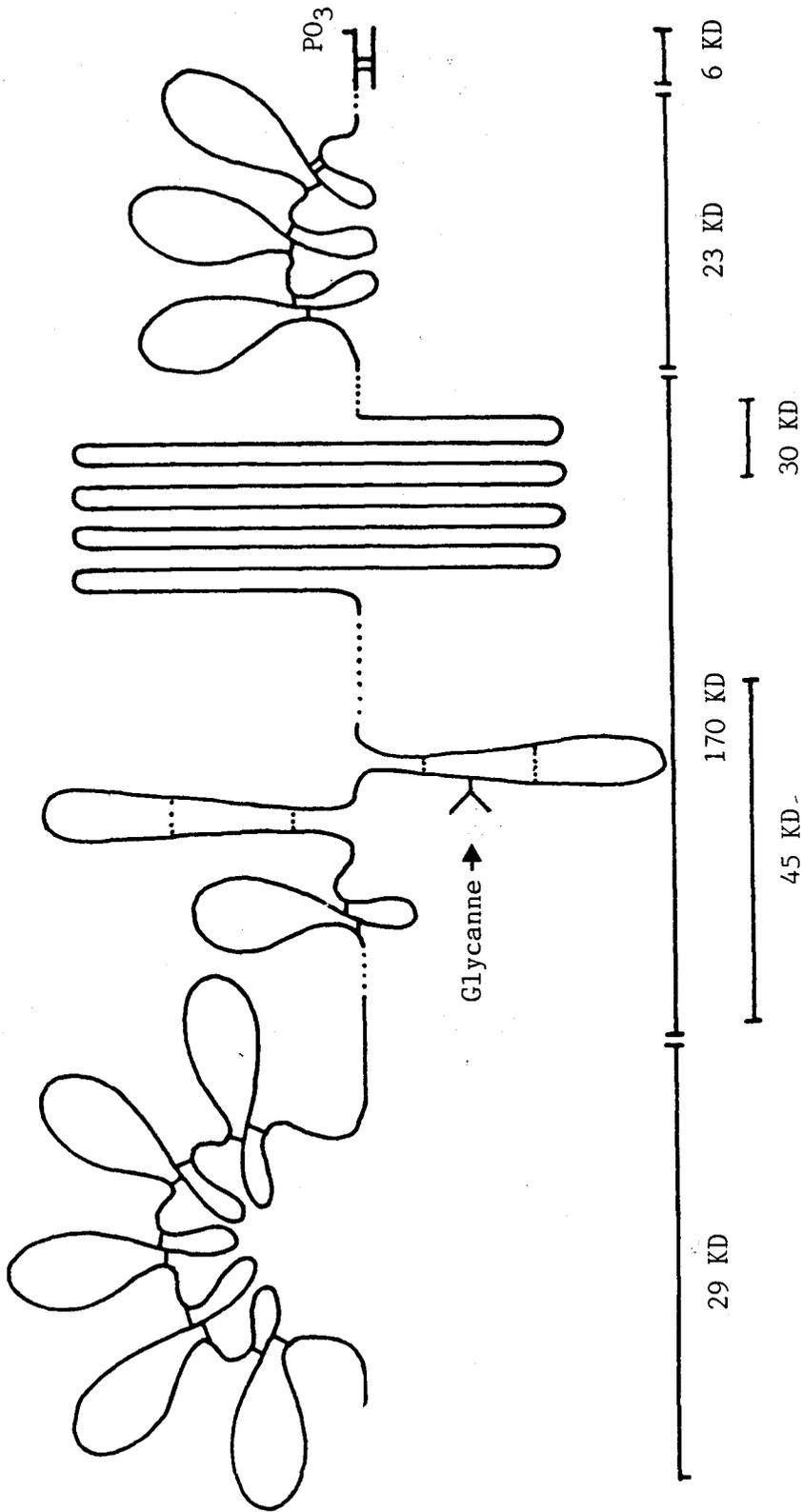


Figure 2 - Modèle de l'une des chaînes de la fibronectine plasmatique bovine. La ligne continue représente les 911 résidus d'acides aminés connus et les pointillés les autres acides aminés (environ 970 résidus) (218).

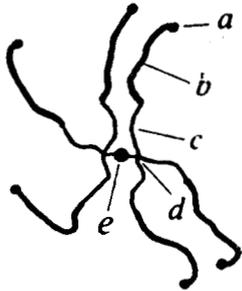
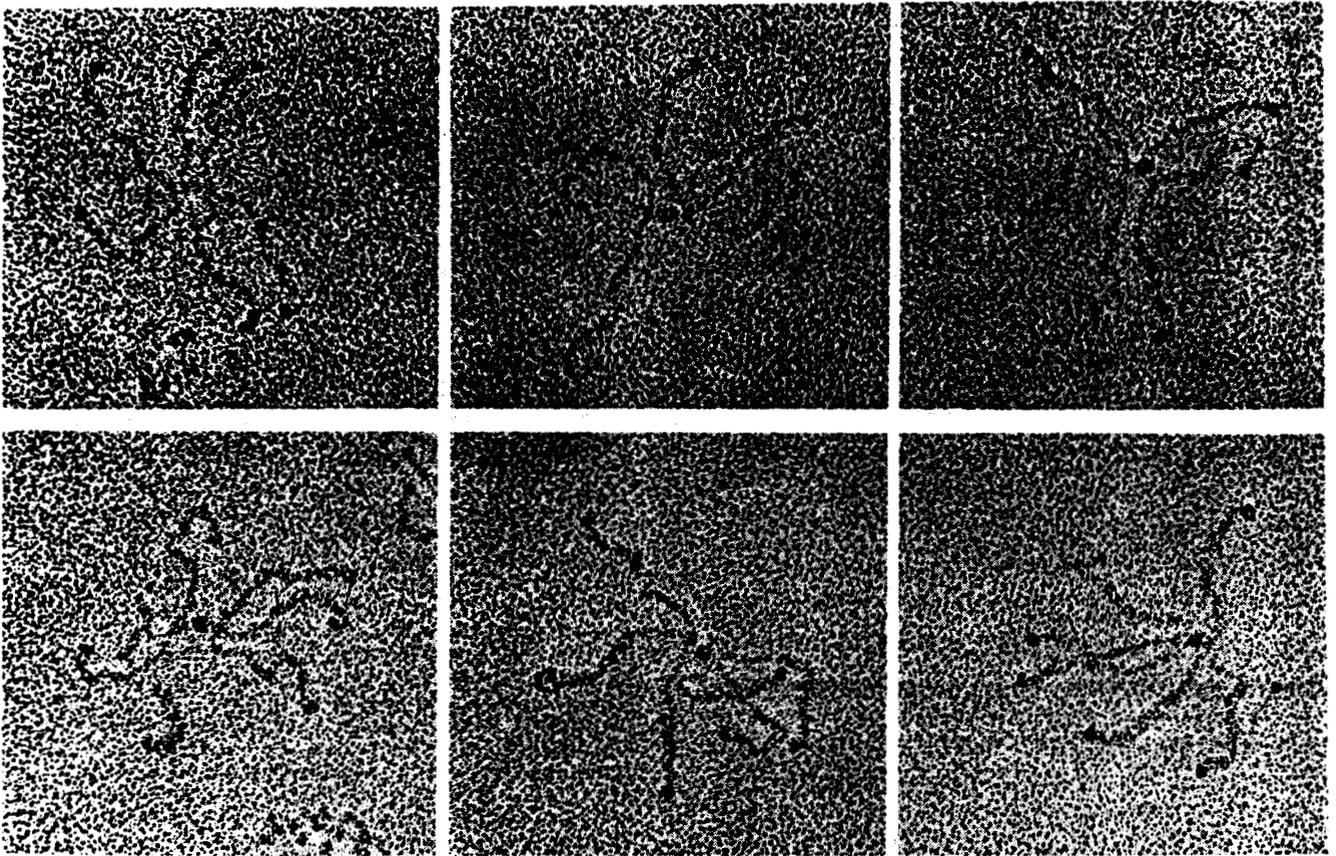
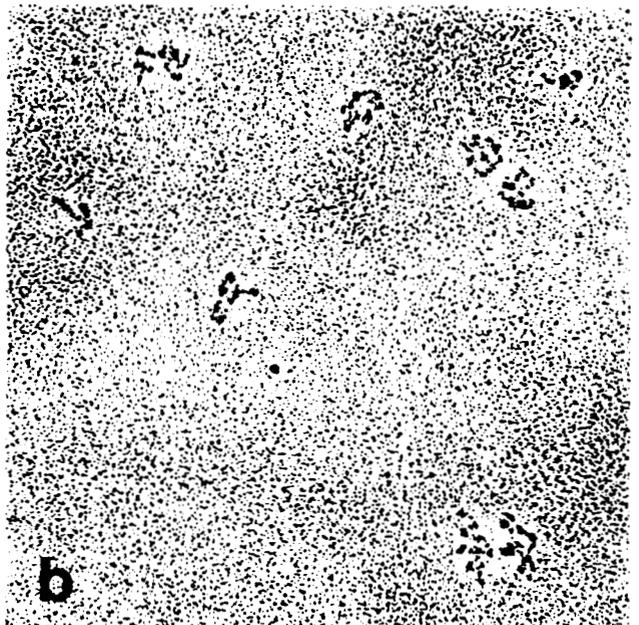


Figure 3 - Photographies (ci-dessus) en microscopie électronique d'un oligomère à 6 bras de la fibronectine cellulaire (68).

Photographies (ci-dessous) en microscopie électronique de la fibronectine plasmatique en tampon concentré (a) et en tampon peu concentré (b) (67).

Schéma (ci-contre) d'un oligomère de la fibronectine cellulaire (68).



oligomères à 6 bras ont été isolés et observés en microscopie électronique (68)(Figure 3). Ils possèdent une structure très particulière avec une protubérance terminale sur chaque bras (a), un segment distal épais (b), un segment interne mince (c), une jonction en T avec trois bras (d) et un glomérule central (e). Une telle structure, différente de celle de la fibronectine plasmatique, correspond certainement à des fonctions biologiques spécifiques ou particulières au niveau de la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire.

C - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les compositions très voisines en acides aminés des fibronectines plasmatique, cellulaire et amniotique (Tableau II) n'expliquent pas de telles différences de structure.

D - GROUPEMENTS THIOLS

Il existerait deux groupements thiols libres dans la structure primaire de la fibronectine, l'un localisé à 170 KD de l'extrémité N - terminale de la molécule (303), le second près de l'extrémité C - terminale (273,303). Ces groupements libres seraient impliqués dans la formation des structures oligomériques observées. Ils pourraient également interagir avec les autres constituants de la matrice extracellulaire, formant ainsi un réseau dense.

III - STRUCTURE DES DIFFERENTES FIBRONECTINES

A - HETEROGENEITE DES FIBRONECTINES

La fibronectine n'est pas une protéine homogène et stable dans sa conformation et sa composition. La fibronectine plasmatique humaine montre en électrophorèse d'isofocalisation cinq bandes de pH_i variant de 5,6 à 6,1. Cette microhétérogénéité peut avoir plusieurs causes.

Tableau II - Composition en acides aminés des fibronectines humaines plasmatique, amniotique et cellulaire (23)

Résidus/1000 Résidus			
	Fibronectine plasmatique (CIG)	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 ^a	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 : Déterminée par oxydation performique

ND : non déterminé



1 - La phosphorylation

La fibronectine plasmatique humaine posséderait au moins deux sites de phosphorylation (9), l'un, près de l'extrémité C - terminale et probablement dans le fragment contenant les deux ponts disulfures, l'autre, près du groupement thiol libre localisé dans le domaine d'association au fibrinogène. Le taux de phosphorylation est variable et augmente dans les fibronectines de cellules transformées en croissance rapide (8 , 10).

2 - La glycosylation

La fibronectine est une glycoprotéine et les glycanes qu'elle porte peuvent être différemment sialylés (60,201). La fibronectine provenant du liquide synovial est totalement asialylée (44). Cette modification des charges portées par les glycanes peut également influencer sur le pH_i de la protéine.

B - ETUDE COMPAREE DES DEUX SOUS-UNITES

Une étude systématique a été entreprise en vue de déterminer les différences de structure entre les deux monomères de la fibronectine plasmatique humaine (266). Cette étude a été étendue à la structure de la fibronectine cellulaire provenant de surnageants de cultures de fibroblastes normaux et transformés. Une comparaison entre les domaines des différentes fibronectines a pu être réalisée et a mis en évidence d'importantes différences sur la base des résultats suivants (Figure 4 et 5) :

1 - Réduction

Les deux monomères de la fibronectine plasmatique humaine ont une taille légèrement différente après réduction.

2 - Cathepsine D

Une protéolyse limitée par la cathepsine D conduit à l'obtention d'un fragment de 130 KD formé de deux fragments C terminaux de 70 KD et 60 KD et

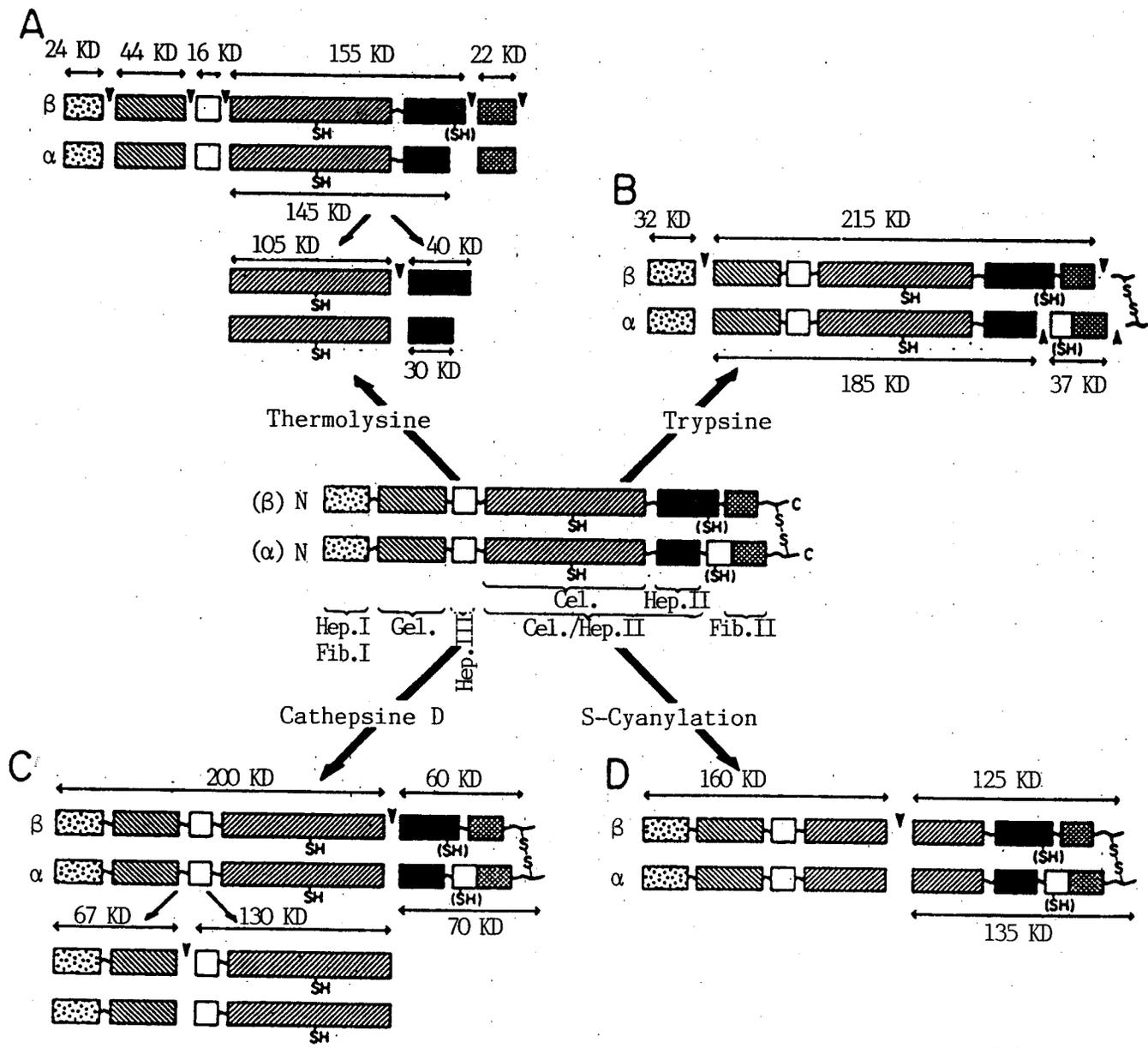


Figure 4 - Modèle de la fragmentation protéolytique et chimique de la fibronectine plasmatique. Protéolyse limitée par la thermolysine (A), la trypsin (B) et la cathepsine D (C); coupure par S-cyanylation (D) (266).

contenant chacun un site de fixation de l'héparine et un site de fixation de la fibrine.

3 - Trypsine

Le monomère de plus haute masse moléculaire possède un site sensible à la trypsine puisqu'il libère deux fragments de 185 KD et 37 KD, tandis que le monomère de faible masse moléculaire libère un seul peptide de 215 KD.

4 - S - Cyanylation

La S - cyanylation libère un peptide de 260 KD composé de deux peptides C - terminaux, l'un de 125 KD, l'autre de 135 KD.

5 - Thermolysine

La thermolysine libère deux peptides C - terminaux de taille identique (22 KD) ainsi que deux autres peptides internes, l'un de 155 KD, l'autre de 145 KD. Une action plus prolongée de cette protéolyse sur ces deux peptides libère un peptide de 105 KD et surtout deux autres peptides contenant le site de reconnaissance de l'héparine, l'un de 40 KD, l'autre de 30 KD.

6 - Partie N - terminale

L'auteur ne montre pas de différence structurale dans la partie N - terminale de la molécule. Une telle hétérogénéité a pourtant été montrée par Vartio (297) qui a mis en évidence un site de protéolyse préférentiel sur l'une des deux sous-unités de la fibronectine plasmatique humaine.

C - ETUDE COMPAREE DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE ET CELLULAIRE

L'étude comparative de la structure de la fibronectine plasmatique (pFN), d'une part, et de la fibronectine cellulaire normale (N-cFN) et transformée (T-cFN), d'autre part, montre des différences évidentes dans les masses moléculaires des peptides formés par protéolyse ou S-cyanylation.

1 - Cathepsine D

Deux fragments (70 et 60 KD) sont libérés de la région C- terminale

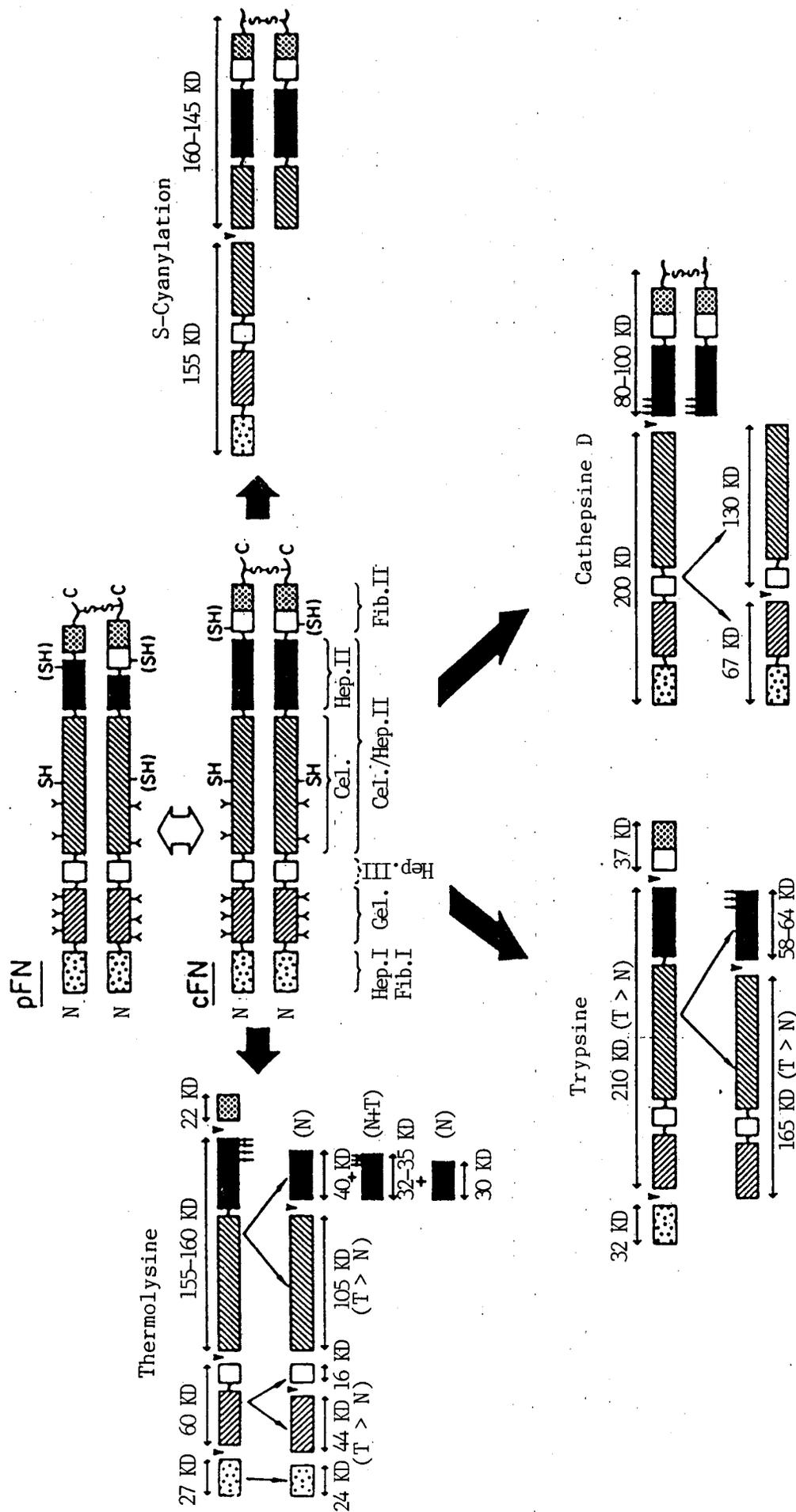


Figure 5 - Modèle de la structure des domaines de la fibronectine cellulaire. La fragmentation a été effectuée par thermolysine, trypsine, cathepsine D et S-cyanylation. Les (Y) représentent les unités glycaniques attachées à la chaîne polypeptidique (266).

de la pFN par la cathepsine D. Les fragments correspondants provenant à la fois, de la N-cFN et de la T-cFN par la cathepsine - D possèdent une masse moléculaire plus importante (100 KD et 83-74 KD). Les fragments provenant du second site de fixation de la fibrine, se retrouvent dans les 3 types de fibronectine.

2 - Trypsine

La région interne comprenant les sites de fixation de la gélatine, de la cellule et de l'héparine libère par action ménagée de la trypsine un peptide de 210 KD, aussi bien chez N-cFN que chez T-cFN. Le peptide correspondant, provenant de la pFN, a une masse moléculaire de 185 KD.

3 - S-Cyanylation

La moitié C- terminale comprenant le second domaine de fixation à l'héparine donne après S-cyanylation un fragment de 160-145 KD qui est de 20 à 25 KD plus important que le peptide correspondant de la pFN. Ces résultats montrent clairement que le second domaine de fixation de l'héparine de la N-cFN et de la T-cFN est plus lourd de 20 à 30 KD que le même domaine de la pFN. Nous verrons plus loin que des différences, bien que mineures, existent entre la N-cFN et la T-cFN.

4 - Etude des différences d'activité biologique

Les différents rôles biologiques connus des fibronectines plasmatique et cellulaire ont été comparés (Tableau III). On voit qu'elles agissent de manière différente sur la morphologie, l'alignement des cellules transformées cultivées *in vitro* et sur l'hémagglutination (322). La fibronectine cellulaire est dans chaque cas plus active que son homologue plasmatique; ce phénomène pourrait être partiellement expliqué par une différence d'affinité entre fibronectine plasmatique et cellulaire vis à vis de l'acide hyaluronique (164). Elles possèdent, par contre, les mêmes propriétés dans

Tableau III - Comparaison des activités biologiques des fibronectines plasmatique et cellulaire (319);

Activité biologique	Activité spécifique relative de la fibronectine cellulaire par rapport à une activité théorique de la fibronectine plasmatique = 1
Fixation des cellules au collagène (322).	1
Etalement des cellules au plastique (216,322).	1
Activité opsonisante vis à vis des macrophages (181).	1
Hémagglutination (322).	150 - 200
Restauration de l'organisation des cellules transformées (322).	50
Attachement des cellules transformées aux matériaux plastiques (119).	2 - 3



(25, 71, 124, 154, 201, 244, 286, 318, 333)
(154, 333)

la fixation de cellules sur les matériaux plastiques et dans la phagocytose (181).

Ces observations montrent qu'il s'agit bien de deux molécules distinctes, même si elles présentent des analogies marquées au plan physico-chimique et au plan biologique. Toutefois, le problème de l'origine génétique de ces deux macromolécules n'est pas résolu et la question de savoir si le génome possède deux gènes distincts codant chacun pour une protéine, ou un gène unique codant pour les deux protéines par le biais d'une maturation spécifique des m RNA ou de la protéine, reste sans réponse.

IV - LES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE

A - STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES

Si la composition en acides aminés présente peu de différences d'une fibronectine à l'autre, les structures des glycanes de la fibronectine varient, au contraire, de manière significative avec le type de fibronectine (45, 49, 75, 76, 154, 285, 334). Les fibronectines humaines sont des N-glycoprotéines qui diffèrent par la structure primaire de leurs glycanes.

1 - La fibronectine plasmatique

La fibronectine plasmatique possède essentiellement des glycanes biantennés de type N-acétyl-lactosaminique (23, 71, 124, 154, 201, 244, 286, 318, 333). (Figure 6). Fisher et Laine (71) ont montré l'existence d'une fraction glycanique non retenue sur colonne d'affinité de Concanavalline A. Les rapports molaires de cette fraction ont été donnés ultérieurement (154, 333), mais sans précision complémentaire. La présence de glycanes de type O-glycosidique est soupçonnée (154) mais ils n'ont pas encore été caractérisés en raison, vraisemblablement, de leur existence en très faible quantité.

2 - La fibronectine placentaire

La fibronectine placentaire humaine possède des glycanes d'un type

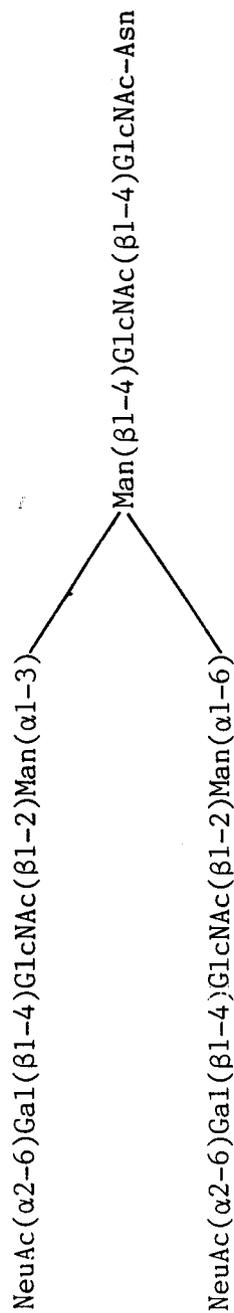


Figure 6a - Structure des glycanes de la fibronectine plasmatique humaine (201).

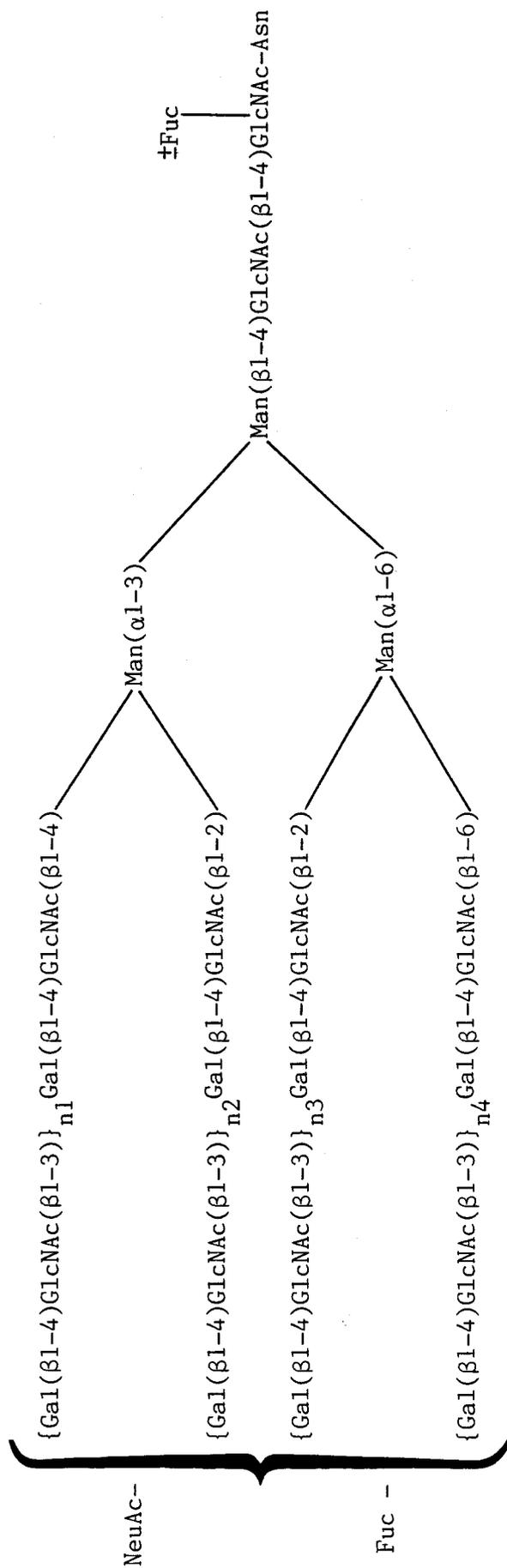


Figure 6b - Structure des glycanes de la fibronectine placentaire humaine (333).



plus complexe. Ils sont en effet, de structure tétraantennée et poly-N-acétyl-lactosaminique. En outre, cette structure est fucosylée, mais les résidus de fucose ne sont pas encore tous localisés avec précision (Figure 6).

3 - La fibronectine amniotique

La fibronectine amniotique présente une plus grande diversité de structures glycaniques (154) (Figure 7), avec des glycanes biantennés et des glycanes triantennés "isomères". Ces derniers peuvent posséder une N-acétyl-glucosamine intercalaire. En outre, toutes ces structures peuvent être fucosylées dans la proportion de 50% à 60% pour l'ensemble des glycanes et de 40% pour les glycanes biantennés.

4 - Discussion

Nous observons donc que les fibronectines placentaire ou amniotique possèdent des structures glycaniques beaucoup plus complexes que celles de la fibronectine plasmatique d'individus adultes. Cette microhétérogénéité des fibronectines, liée à leur origine, pose la question de savoir si les glycanes ne pourraient pas être des marqueurs de l'origine cellulaire des fibronectines et des témoins de leur transformation virale et/ou cancéreuse, tant est grande leur sensibilité aux variations de l'activité des glycosyltransférases. Il est parfaitement possible, en effet, qu'un programme génétique d'enzymes de glycosylation s'exprime différemment suivant le type de différenciation de la cellule où il se déroule.

B - ROLE DES GLYCANNES DES FIBRONECTINES

L'utilisation de la tunicamycine, inhibiteur de la première étape de glycosylation des dolichols et, en conséquence, de la formation des dolichols-pyrophosphate N-acétyl-glucosamine et de la biosynthèse elle-même des glycanes de N-glycosylprotéines, bloque totalement la glycosylation de la fibronectine. L'obtention de fibronectine non glycosylée a permis d'explorer

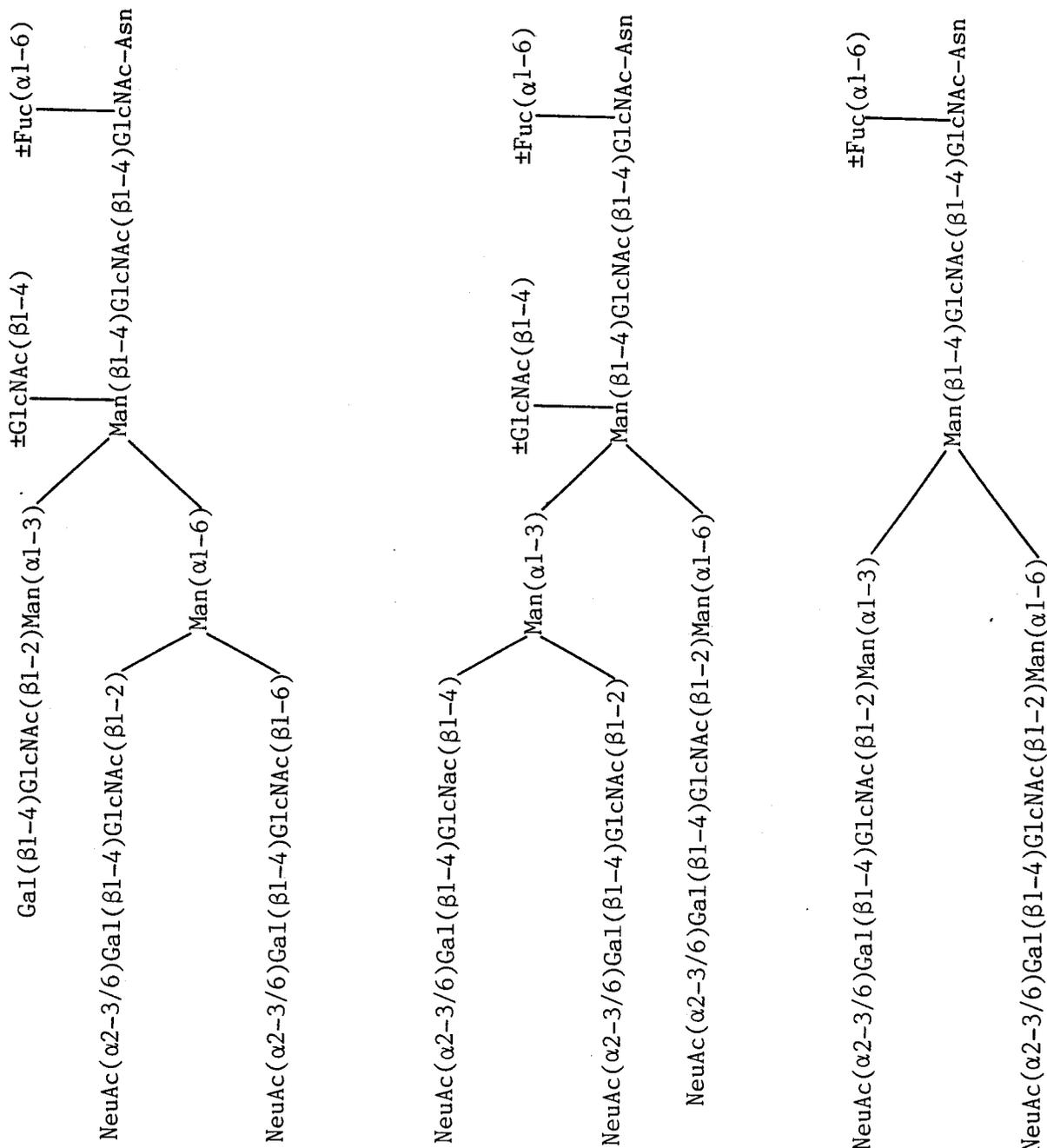


Figure 7 - Structure des glycanes de la fibronectine du liquide amniotique (154).

le rôle que joue la partie glycanique (29).

1 - Protection vis-à-vis de la protéolyse

En faisant agir sur les deux types de fibronectine (glycosylée et non glycosylée) plusieurs protéases (pronase, thermolysine, trypsine et chymotrypsine), Bernard (29) a montré que les glycanes jouaient un rôle protecteur et retardaient l'action protéolytique. Les peptides obtenus sont toutefois identiques.

Un fait semblable a été montré chez la fibronectine placentaire qui possède une structure glycanique plus complexe que la fibronectine plasmatique (333). En effet, un fragment chymotrypsique commun de 43 KD et glycosylé de façon différente, est plus difficile à dégrader par la trypsine chez la fibronectine placentaire que chez la fibronectine plasmatique. Dans ce cas, même après action complète de la trypsine les cartes peptidiques sont différentes.

2 - Intervention dans l'affinité des fibronectines pour leur substrat

L'effet de la glycosylation a été étudié sur un peptide contenant le domaine d'affinité pour la gélatine, et donc glycosylé (334). Si ce peptide porte des glycanes de type biantenné, il est élué plus difficilement d'une colonne de Sépharose-gélatine que s'il porte des glycanes de type poly-N-acétyllactosaminique. L'affinité des fragments portant des glycanes biantennés est 3 fois plus forte vis-à-vis de la gélatine que les fragments portant les glycanes de type poly-N-acétyllactosaminique.

3 - Discussion

Nous pouvons donc déduire de ces résultats, que plus la structure glycanique portée par une protéine est importante, plus la probabilité de masquage de sites antigéniques ou de sites de reconnaissance sera elle aussi importante. Une telle constatation doit nous faire réfléchir quant au rôle (passif ou actif) que peuvent jouer les glycanes dans les cas de polyantenna-

risation, en particulier chez la femme enceinte et dans certains cas pathologiques (Néoplasmes, notamment).

V - LE GENE DE LA FIBRONECTINE

De même qu'en 1970, la C.I.G. et la fibronectine cellulaire passaient pour être deux protéines différentes, ainsi, ces dernières années, la question de l'origine génétique de la fibronectine a été posée. Les fibronectines cellulaires et plasmatiques sont voisines mais hétérogènes, or cette hétérogénéité ne porte pas sur une partie terminale de la molécule, donc ne provient pas d'une protéolyse spécifique de l'une des deux protéines.

A - HYPOTHESE D'UN OU DEUX GENES

Toutefois, s'il existait deux gènes, l'un codant pour la fibronectine plasmatique, l'autre pour la fibronectine cellulaire, l'évolution parmi les différentes espèces aurait conduit à une ressemblance importante de chacun des gènes à travers l'ensemble des espèces.

Or, Yamada (321) a montré, à l'aide d'une carte peptidique, que la fibronectine cellulaire humaine était beaucoup plus proche de la fibronectine plasmatique humaine que des fibronectines cellulaires du Poulet et de la Souris. De même, des études de précipitation par anti-corps montrent qu'un anti-corps dirigé contre la fibronectine cellulaire de Poulet précipite facilement la fibronectine de Poulet (cellulaire et plasmatique), tandis qu'une réaction contre la fibronectine humaine (cellulaire et plasmatique) nécessite beaucoup plus d'anti-corps (109).

Ces études tendent à montrer que l'existence de deux gènes est fort improbable, l'hétérogénéité entre les fibronectines résultant plutôt, soit d'une maturation différente des m RNA, soit de modifications post-traductionnelles.

Une macromolécule comme la fibronectine nécessite un gène de taille

très importante, trop importante même pour qu'il ne soit pas la résultante d'une évolution complexe. Deux hypothèses existent, à cet égard :

- Le gène peut avoir pour origine plusieurs gènes, chacun codant pour un domaine et se rassemblant ensuite pour donner un gène unique (82).

- L'autre hypothèse concerne la multiplication, un grand nombre de fois, d'une petite unité constituant ainsi un très grand gène. Chaque groupe d'unités évolue ensuite pour donner un domaine de spécificité. L'albumine (41), le plasminogène (163) et l'ovomucoïde (275) ont subi probablement une telle évolution. Cette deuxième hypothèse est d'ailleurs en accord avec les études structurales de Petersen(218) sur la fibronectine plasmatique bovine qui montrent qu'il existe des homologies internes ne pouvant provenir que d'une multiplication d'une partie du gène.

B - ISOLEMENT DU GENE DE LA FIBRONECTINE

Le gène de la fibronectine du Poulet a été isolé par Hirano (109). Un m RNA partiellement purifié codant pour la fibronectine a été isolé (69) et utilisé pour obtenir une sonde cDNA; cette sonde a été dirigée contre une bibliothèque de clones de DNA génomique du Poulet portés par un bactériophage Charon 4 A. L'un de ces clones fut choisi parce qu'il s'étendrait le plus loin en direction de l'extrémité 5' du gène. Un fragment de l'extrémité 5' de ce clone fut obtenu par digestion par des enzymes de restriction, marqué radioactivement et utilisé pour effectuer des hybridations avec d'autres clones s'étendant plus loin en direction de l'extrémité 5' du gène. Cette stratégie fut continuée jusqu'à l'obtention d'une série de clones correspondant à l'ensemble du gène de la fibronectine. Le gène décrit sur la figure 8 est fait de 48 Kilobases et est l'un des gènes les plus grands connu à l'heure actuelle (109). Ce gène possède un très grand nombre d'unités codantes (exons). En effet, il en existe au moins 48 dans ce gène. A l'exception de ceux situés à

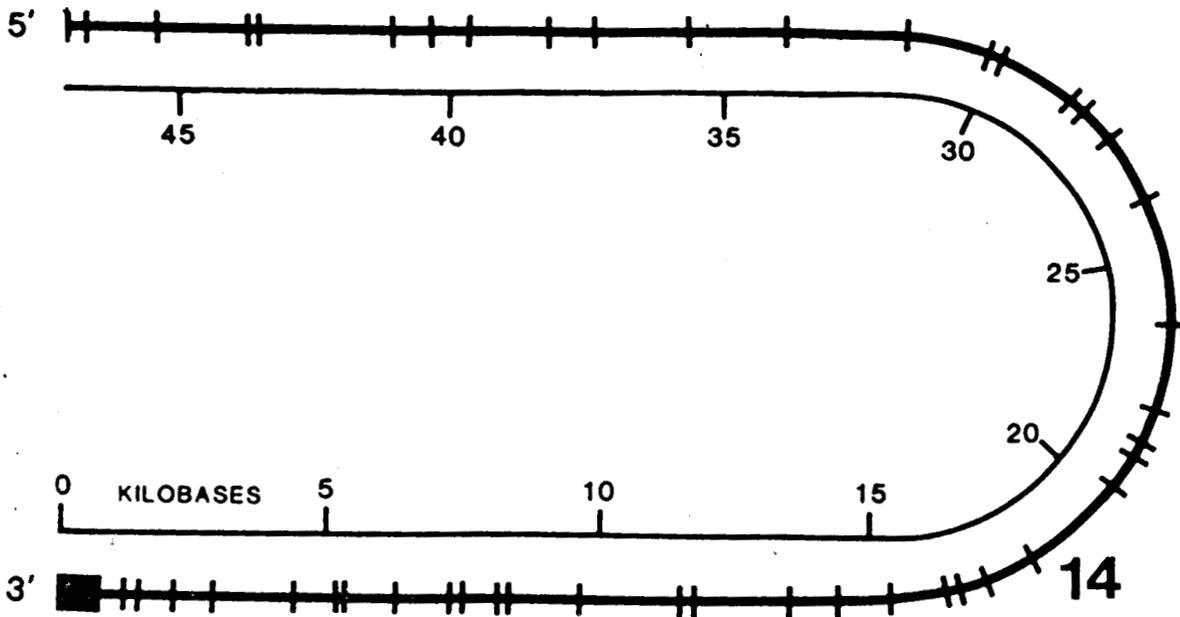


Figure 8 - Gène de la fibronectine cellulaire de poulet. Les barres verticales représentent les exons, qui sont séparés par les introns (régions non codantes) de longueur variable. Le gène contient 48 exons, sa longueur est de 48 kilobases (143).

l'extrémité du gène, les exons sont très petits et de tailles très voisines. Il convient de noter qu'au cours de l'isolement des clones génomiques, il n'a pas été trouvé de second gène homologue à celui-ci, confortant l'hypothèse de l'existence d'un seul gène pour les différents types de fibronectine.

C - DISCUSSION

Il est très intéressant de comparer la structure du gène de Poulet (109) avec la séquence protéique déterminée pour la fibronectine plasmatique bovine (218) et de constater qu'il a été trouvé une série de polypeptides répétitifs de taille identique à ceux déduits de la structure des exons du gène.

Les études de séquençage protéique montrent l'existence d'au moins trois types de structures répétitives (218), il faut noter que deux de ces unités sont de même taille et que l'autre est d'une taille double. A la suite des expériences de "cloning" du gène et du séquençage protéique, il apparaît clairement que la fibronectine provient de la multiplication massive d'une ou plusieurs séquences initiales, suivie par une différenciation donnant les domaines fonctionnels connus à l'heure actuelle.

ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA FIBRONECTINE

Les rôles biologiques des fibronectines ont été particulièrement bien étudiés au niveau de la fibronectine purifiée à partir de la surface cellulaire et de la fibronectine plasmatique. L'étude des différentes fonctions a été réalisée à la fois sur du matériel d'origine animale et humaine. Le tableau IV résume la plupart des activités biologiques des fibronectines, ainsi que leur affinité vis-à-vis d'un certain nombre de composés.

Tableau IV - Activités biologiques et affinités de la fibronectine (321).

Activités biologiques	
I	: Adhésion cellule-cellule
II	: Adhésion cellule-substrat
	: A - Attachement et étalement des cellules sur le plastique et le verre
	: B - Attachement cellulaire au collagène ou à la fibrine
III	: Morphologie cellulaire
	: A - Maintien de la forme des fibroblastes et d'un nombre minimum de microvillosités à la surface cellulaire
	: B - Alignement des fibroblastes en arrangements parallèles
	: C - Promotion de l'arrangement des microfilaments d'actine
IV	: Migration cellulaire
	: A - Stimulation de la mobilité cellulaire
	: B - Chimiotactisme
V	: Stimulation ou inhibition de la différenciation cellulaire
VI	: Activité opsonisante pour la phagocytose par les macrophages
Activités d'attachement de la fibronectine	
I	: Collagène et gélatine
II	: Fibrine et fibrinogène
III	: Héparine et héparane sulfate
IV	: Acide hyaluronique
V	: Actine, D.N.A. et composé Clq du complément
VI	: Surface cellulaire des cellules eucaryotes et des bactéries



I - ADHESION INTERCELLULAIRE

A - LES INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA MATRICE

La fibronectine joue un rôle majeur dans l'adhésion de nombreux types cellulaires. La cellule peut d'ailleurs interagir avec plusieurs molécules extracellulaires. Les fibroblastes peuvent se lier à la fibronectine, à la laminine (55,139), au collagène de type I (93,261), à une protéine de 70 KD appelée aussi facteur Holmes ou vitronectine (25,108,147), et le facteur 4 plaquettaire (165). De même, les hépatocytes peuvent s'attacher à la fibronectine, la laminine, ou le collagène de différents types (133,241).

In vitro, l'adhésion cellulaire peut se définir comme la capacité des cellules à interagir avec la fibronectine, elle-même intégrée dans la matrice extracellulaire lorsque celle-ci est présente. L'adhésion cellulaire est, de ce fait, associée à la synthèse ou à l'absence de synthèse de la fibronectine par ces cellules. La fibronectine peut également ne pas se lier à la matrice entourant les cellules qui la synthétisent. A ce sujet, il a été montré à de nombreuses reprises que les cellules malignes voient la fibronectine diminuer, voire disparaître totalement de la matrice extracellulaire qui les entoure. Parallèlement, ce phénomène s'accompagne généralement de la diminution d'autres composants de cette matrice comme le collagène, la laminine et les protéoglycannes. Les cellules ne présentant plus de fibronectine à leur surface peuvent pourtant se lier à d'autres cellules en possédant. Ces observations peuvent être associées à la migration cellulaire pendant l'embryogenèse (voir IV, C) et pourraient également expliquer le phénomène de métastase des cellules malignes.

B - LES SITES D'ADHESION A LA CELLULE

L'interaction fibronectine-membrane cellulaire nécessite la présence, sur la fibronectine, d'un site d'ancrage à la cellule et, au niveau

de la membrane plasmique, d'un récepteur spécifique de la fibronectine. L'interaction de la fibronectine plasmatique tritiée a été étudiée sur des cultures de cellules fibroblastiques en suspension. Une analyse des résultats selon Scatchard (258) a mis en évidence la présence d'un seul type de récepteur membranaire dont il existe approximativement $5 \pm 1 \times 10^5$ exemplaires par cellule avec une constante de dissociation apparente (K_d) de $8,0 \pm 0,5 \times 10^{-7} M$. L'association fibroblaste-fibronectine tritiée (à une concentration de 0,1 mg/ml) est inhibée à 70% par une concentration de 8 mg/ml en fibronectine non marquée, et à 95% par une concentration de 1 mg/ml du fragment peptidique de 75 KD incluant le domaine de fixation à la cellule (5).

Un autre fragment peptidique de 85 KD inhibe l'adhésion des hépatocytes de rat à de la fibronectine immobilisée. Une analyse selon Scatchard montre un type unique de récepteurs avec un K_d de $1,7 \times 10^{-8} M$. Le nombre de sites d'attachement est d'environ $2,8 \times 10^5$ par cellule (131). Ce peptide de 85 KD non marqué possède une capacité d'inhibition de l'adhésion cellulaire vis-à-vis de ce même peptide marqué, 30 fois supérieure à celle de la fibronectine native.

II - ADHESION CELLULAIRE A UN SUBSTRAT

La fibronectine permet aux cellules d'adhérer à divers substrats. On peut distinguer l'adhésion des cellules au collagène et l'attachement et l'étalement des cellules sur les polymères synthétiques tels que les plastiques des boîtes de culture. Il est clair qu'il se crée de multiples liaisons entre les différents constituants de la matrice extracellulaire.

A - ASSOCIATION AVEC LE COLLAGENE

La fibronectine s'associe aux différents isomères du collagène natif (types I à V) avec des affinités différentes. *In vitro*, la fibronectine permet la fixation des cellules à un film de collagène déposé au fond

des flacons de culture. L'acide hyaluronique semble augmenter l'affinité de la fibronectine pour le collagène (135,245).

Toutefois, la fibronectine n'intervient pas dans la fixation de toutes les cellules. Elle n'a, par exemple, aucun effet sur l'attachement au collagène des chondrocytes et de certaines souches de cellules épithéliales, ces dernières utilisant respectivement la chondronectine et la laminine (319).

Il a été montré que le complexe fibronectine-collagène inhibait en partie (78%) l'attachement d'hépatocytes de Rat à des billes recouvertes de fibronectine (132). Une combinaison de fibronectine, de collagène et d'héparine sulfate a un plus grand effet inhibiteur (94%) que la fibronectine associée au collagène ou à l'héparane sulfate (68%). Ces résultats peuvent être dus à un changement conformationnel dans la molécule de fibronectine induit par la liaison avec l'héparine sulfate et le collagène ou à la formation d'agrégats moléculaires de fibronectine agissant comme un ligand multivalent. Des expériences montrant que le collagène (313) et l'héparine (74) induisaient des changements de conformation de la fibronectine, confortent la première hypothèse.

B - ASSOCIATION AVEC LES MATERIAUX PLASTIQUES

L'attachement et l'étalement des cellules aux matériaux plastiques des boîtes de culture nécessitent la présence de fibronectine. Certaines cellules utilisent la fibronectine du sérum ajouté dans le milieu de culture. Höök *et al.* (110) ont montré que la présence de fibronectine était nécessaire afin que des hépatocytes de Rat puissent adhérer aux boîtes de Petri.

Dans une deuxième phase, la fibronectine permet également l'étalement de ces cellules qui se traduit par un changement de morphologie : les cellules initialement sphériques reprennent une forme polyédrique. Les cellules fibroblastiques, synthétisant leur propre fibronectine en quantité suffisante, ne

nécessitent pas l'addition de fibronectine plasmatique dans le milieu pour s'étaler normalement (90). Il est estimé que 45000 molécules de fibronectine sont nécessaires à l'étalement d'une seule cellule fibroblastique (115).

III - L'OPSONISATION PAR LES FIBRONECTINES

De nombreux auteurs ont décrit les interactions qui existent entre certaines bactéries gram⁺ et la fibronectine plasmatique (20,155,199,229,252, 295,296,298) ou tissulaire (1, 228,230,299). Le site de fixation sur *Staphylococcus aureus* (199), par exemple, est nettement différencié du site d'attachement cellulaire (197). Ainsi la fibronectine peut théoriquement jouer le rôle d'une "opsonine" bactérienne en permettant la liaison entre la bactérie et les cellules phagocytiques (231). Cette hypothèse est confortée par les études montrant une activité opsonisante de la fibronectine vis-à-vis des cellules lysées et des tissus lésés (95,181,255,296). Par exemple, les monocytes possèdent un récepteur de la fibronectine qui augmente la phagocytose des érythrocytes (54, 56, 57, 58,226). Simpson et Boughton (268) ont également montré récemment que la fibronectine pourrait présenter les mêmes propriétés vis-à-vis des levures. En utilisant des monocytes humains, ces auteurs ont observé que la fibronectine augmentait, à la fois, l'adhésion et l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae* par ces cellules.

IV - ROLE DE LA FIBRONECTINE DANS LE CHIMIOTACTISME ET LA MOBILITE CELLULAIRE

A - IN VITRO

Il a été montré que la fibronectine pouvait augmenter l'importance et le caractère directionnel de la migration des cellules fibroblastiques *in vitro* (292). Elle permettrait, en particulier, la migration des cellules isolées ainsi que la dispersion d'agrégats cellulaires (11,227). Elle induit l'adhésion des polynucléaires neutrophiles sur des surfaces de plastique (180). La fibronectine, ainsi que la laminine, stimulent la migration dirigée

de cellules tumorales, même si ces cellules ont été préincubées avec de la fibronectine. En outre, cette stimulation cesse si l'expérience est réalisée en présence d'anti-corps anti-fibronectine (ou anti-laminine) (175).

Mensing *et al.* ont montré que des fibroblastes embryonnaires humains transformés présentaient une augmentation du chimiotactisme par rapport aux cellules non transformées (183). Ces expériences nous indiquent le rôle que pourrait jouer la fibronectine dans le cas de l'invasion de tissus sains par des cellules cancéreuses lors des phénomènes de métastase. Ces observations effectuées *in vitro* peuvent être corrélées avec un certain nombre de phénomènes physiologiques qui nécessitent le déplacement de cellules au niveau d'un tissu. En particulier, la fibronectine semble jouer un rôle important dans la cicatrisation des plaies et dans certaines phases du développement embryonnaire.

B - LA CICATRISATION

1 - La lésion vasculaire

La lésion d'un tissu s'accompagne de la rupture des parois vasculaires situées dans la région. Dans un premier temps, les plaquettes sanguines adhèrent rapidement au collagène du tissu conjonctif mis à nu, leur agrégation produisant le "thrombus blanc", réseau de plaquettes reliées par des filaments de fibrine. Les plaquettes ainsi fixées aux fibres de collagène voient rapidement leur surface cellulaire se recouvrir de fibronectine (119). En effet, il semble qu'il apparaisse à la surface des plaquettes, après l'activation plaquettaire induite par la fixation de ces dernières au collagène - activation suivie de modifications morphologiques des plaquettes et des phénomènes de dégranulation ou "release" - des récepteurs spécifiques et saturables de la fibronectine (84,100,224,335). Ces récepteurs sont apparemment absents ou en nombre très restreint au niveau des plaquettes circulantes.

A ce propos, des expériences *in vitro* ont pu montrer que la fibronect-

tine pouvait promouvoir la fixation et l'étalement des plaquettes sur le polystyrène (92,153, 94) et sur des films de collagène (94). *In vivo*, la fibronectine pourrait donc avoir un rôle similaire en augmentant l'adhésion et l'étalement des plaquettes sur les fibres du collagène conjonctif. En outre, la dégranulation plaquettaire entraîne, entre autres composés, la libération au niveau de la lésion, de fibronectine contenue dans les granules α .

2 - "L'assainissement" de la plaie

Après la formation du caillot sanguin, la région blessée est envahie par des polynucléaires neutrophiles. Plusieurs études ont montré que la fibronectine facilitait la mobilité de ces cellules ainsi que leur chimiotactisme (130) et leur adhésion aux cellules endothéliales(305). Les débris cellulaires sont ensuite phagocytés par les monocytes. Or, la fibronectine (328) ou certains de ses fragments peptidiques (204) semblent être en mesure d'augmenter sensiblement le pouvoir chimiotactique des monocytes vis-à-vis de ces débris cellulaires.

3 - La reconstitution du tissu

Puis, lors de la cicatrisation proprement dite, des cellules fibroblastiques migrent en direction de la zone endommagée. La fibronectine peut également jouer un rôle à ce niveau, car il s'agit d'un facteur important de la migration des fibroblastes. Elle permet en particulier l'adhésion des fibroblastes à la surface de différents matériaux (87) et sur du collagène dénaturé (145, 89).

Nous avons vu que lors de la coagulation plasmatique, il se forme un important réseau de plaquettes reliées par des molécules de fibrine. Or, l'adhésion des fibroblastes à la fibrine nécessite de la fibronectine et une adhésion maximale exige que la fibronectine soit liée de manière covalente à la fibrine par l'intermédiaire du facteur XIII_a transglutaminase.(91). Les fibroblastes forment alors un tissu granuleux, vascularisé par des cellu-

les endothéliales. Ce tissu est ensuite recouvert par un nouvel épiderme formé par la migration de Kératinocytes depuis les bords de la plaie. Dans ce cas également, la fibronectine facilite l'adhésion et la migration des cellules épithéliales (40, 83,172,174,282,287).

C - LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Thiery et d'autres auteurs ont montré que la fibronectine jouait un rôle important dans la migration des cellules au cours du développement embryonnaire (182,290,310). Boucaut a démontré que des anti-corps dirigés contre la fibronectine inhibaient la migration de cellules de la crête neurale (38) ainsi que la gastrulation chez les embryons d'amphibiens (37, 38). La présence de fibronectine a été prouvée dès le début du stade blastula chez *Pleurodeles waltii*. Toutefois, elle ne semble pas avoir d'influence sur la neurulation (37).

V - ROLE DE LA FIBRONECTINE DANS LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

La fibronectine cellulaire peut agir de façon très différente sur la différenciation de divers types de cellules *in vitro*. Les mécanismes biochimiques de ces effets ne sont toutefois pas encore connus. La fibronectine cellulaire permet la différenciation des cellules de la crête neurale (171,267), ainsi que la migration *in vitro* de ces mêmes cellules (240). Les myoblastes cultivés sur surface collagénisée ont besoin de fibronectine pour leur attachement (51), cette phase d'attachement étant nécessaire pour leur fusion en myotubes. Toutefois, l'addition ultérieure de fibronectine cellulaire inhibe le processus de fusion, les cellules demeurant au stade myoblastique (225).

La fibronectine a plusieurs effets sur l'expression phénotypique des chondrocytes. Ceux-ci passent de la synthèse de collagène de type II à la synthèse de collagène de type I, tandis que la production de protéoglycane

décroît (217,309). Les chondrocytes prennent alors l'aspect de cellules mésenchymateuses (cellules indifférenciées) d'où ils sont issus.

LES DOMAINES FONCTIONNELS DE LA FIBRONECTINE

I- COUPURES PROTEOLYTIQUES ET ISOLEMENT DES DOMAINES

L'étude d'une protéine multifonctionnelle telle que la fibronectine est souvent difficilement réalisable sur la protéine native. Cependant, dans la plupart des cas, et notamment dans celui de la fibronectine, la glycoprotéine est constituée de plusieurs domaines fonctionnels. Il devient donc possible d'isoler ces domaines par chromatographie d'affinité après une dégradation protéolytique ménagée effectuée dans des conditions parfaitement contrôlées afin de ne pas léser ou modifier l'activité biologique du domaine désiré. En effet, ces domaines possèdent une structure secondaire et tertiaire fortement stabilisée par de nombreuses liaisons ioniques et par des ponts disulfures intracaténaux, ce qui leur confère une certaine résistance vis-à-vis des protéases.

Deux méthodes d'isolement peuvent être utilisées pour séparer ces domaines : dans les deux cas, on immobilise un ligand sur un support inerte et on l'utilise comme support de chromatographie d'affinité (voir Figure 9).

A - PREMIERE METHODE D'ISOLEMENT

Dans le premier cas, la molécule est soumise à une dégradation protéolytique préalable, dans des conditions douces afin d'obtenir en mélange les différents domaines protéases-résistants. Le choix de l'enzyme (trypsine, thermolysine, cathepsine D) est, bien entendu, fonction du domaine désiré. Le mélange de fragments protéolytiques, après inhibition de l'enzyme, est soumis à une chromatographie d'affinité. Seul le domaine

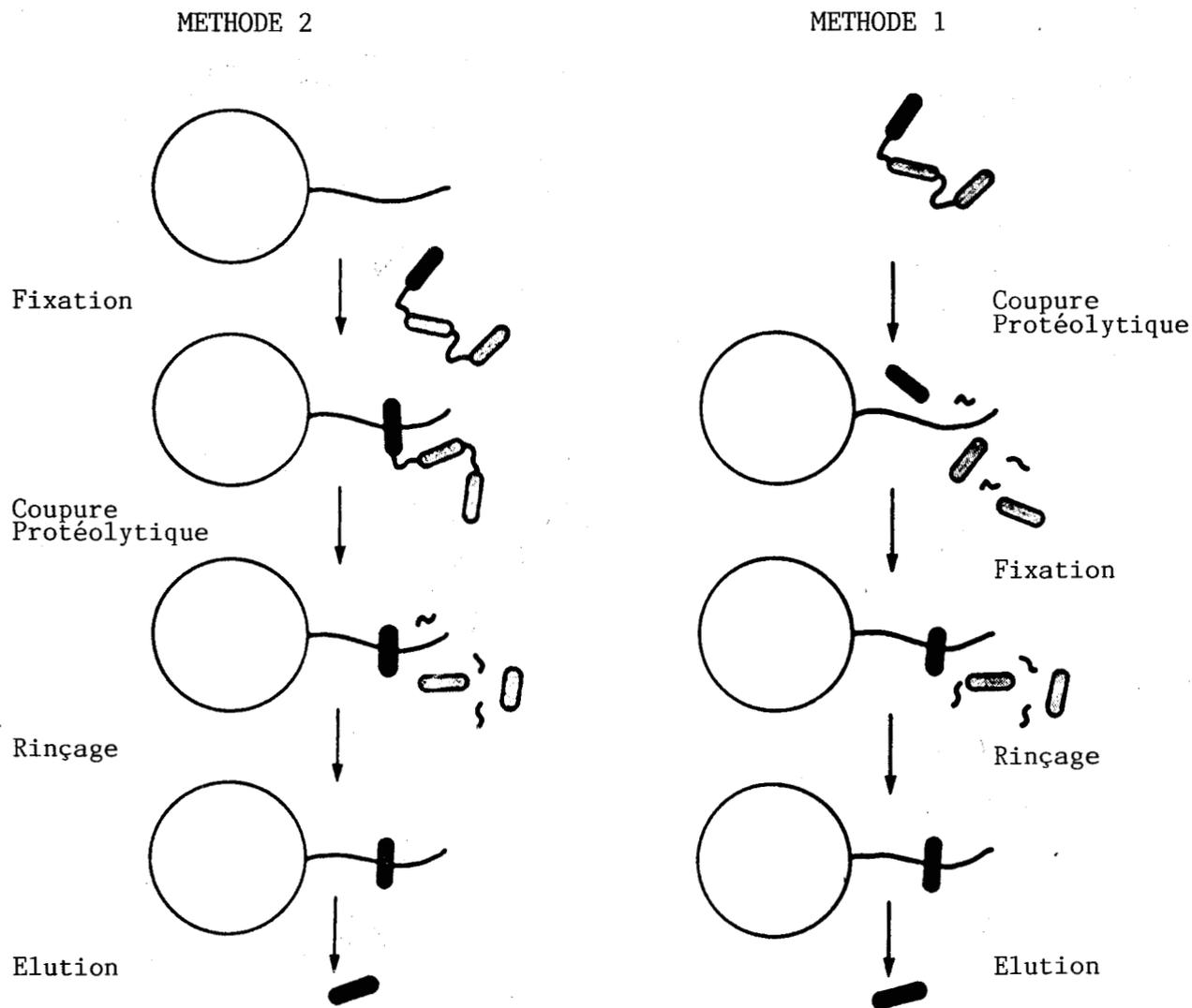


Figure 9 - Méthodes principales d'isolement des différents domaines d'affinité de la fibronectine. Les cercles représentent les billes d'agarose sur lesquelles est fixé le ligand.

spécifique du ligand est retenu sur le support, les autres fragments de la molécule étant éliminés par rinçage en veillant à éviter toute fixation non-spécifique. Le domaine fixé est ensuite élué par une élévation de la force ionique ou par des agents chaotropiques tels que l'urée.

B - DEUXIEME METHODE D'ISOLEMENT

Dans le deuxième cas, la molécule native est préalablement fixée sur le support d'affinité et soumise ensuite à l'action des protéases. Après rinçage, l'éluion est effectuée de la même manière que précédemment. Cette méthode a pour avantage de mieux préserver l'activité biologique du domaine considéré, ce dernier étant "protégé" de la protéolyse par l'association avec son ligand.

Il existe cependant deux conditions restrictives à l'emploi de cette méthode :

Les conditions de pH et de force ionique nécessaires à la fixation au ligand doivent être compatibles avec celles de l'enzyme.

Le ligand ne doit pas être de nature protidique, car il serait alors rapidement dégradé.

Ces deux méthodes conduisent à l'isolement de fragments de fibronectine biologiquement actifs dont l'étude sera plus aisée en comparaison de la molécule native. La Figure 10 résume l'ensemble des affinités possibles de chacun des domaines ainsi que quelques-unes de leurs caractéristiques.

C- ETUDE IMMUNOLOGIQUE DES DOMAINES

Une autre approche de l'étude des différents domaines de la fibronectine peut être réalisée par l'utilisation d'anti-corps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre un domaine précis de la molécule (266). Après protéolyse contrôlée de la fibronectine purifiée, les fragments sont déposés en électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. Après électrophorèse et

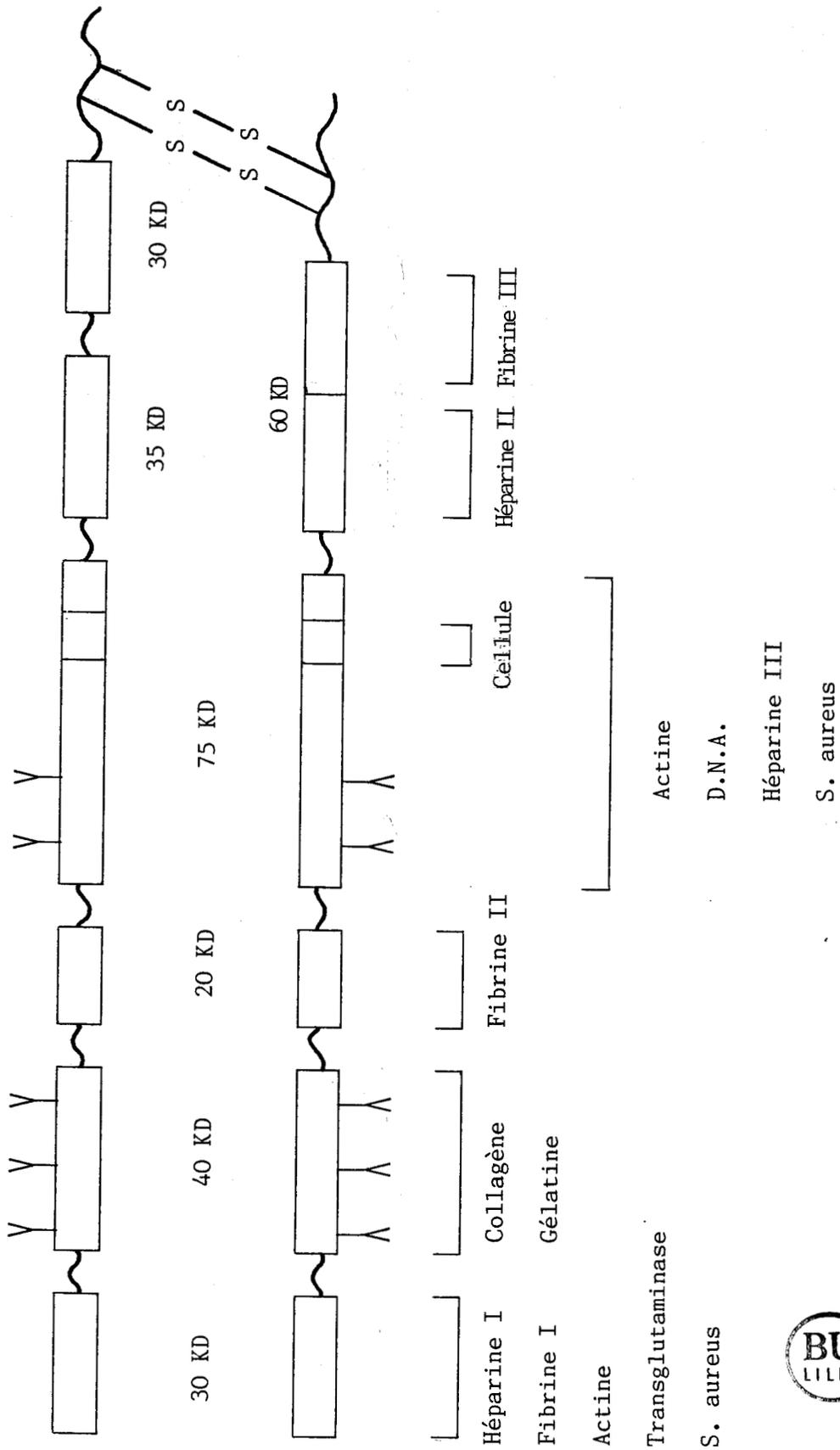


Figure 10 - Description des domaines d'affinité de la fibronectine. Les (Y) représentent les unités glycaniques liées à la chaîne polypeptidique.

transfert sur acétate de cellulose, les domaines sont révélés par coloration au Bleu de Coomassie (non spécifique) ou après incubation avec des anti-corps spécifiques. Cette méthode a permis de montrer avec précision la microhétérogénéité existant entre les divers types de fibronectine.

II - DOMAINE N - TERMINAL

Le domaine situé à la partie N - terminale de la molécule peut s'associer à un grand nombre de ligands. L'héparine, l'actine, la fibrine, le facteur XIII_a transglutaminase, la paroi des bactéries *Staphylococcus* et *Streptococcus* interagissent avec ce fragment et les interactions entre la fibronectine, l'héparine et la fibrine seront développées dans les chapitres ultérieurs (voir V et VI).

A - ASSOCIATION AVEC L'ACTINE

Les fibronectines cellulaires et plasmatiques se lient toutes deux à l'actine (142,143,151). Ces interactions se déroulent au niveau du domaine N - terminal, mais également d'autres sites en conditions non physiologiques (103,143). La tropomyosine, la myosine, l'actinine et la vinculine peuvent avoir également une affinité. Celle-ci est toutefois beaucoup plus faible envers ces protéines du cytosquelette que pour la gélatine, par exemple (152).

Le rôle physiologique de toutes ces interactions n'est pas encore très clair. L'actine demande, en effet, à être dénaturée pour avoir une interaction et elle peut être phagocytée par des macrophages en présence de fibronectine (151,184). Ces études suggèrent que de telles interactions permettraient d'éliminer du sang des débris de protéines du cytosquelette, comme dans le cas de fragments de collagène (185,255).

B - ASSOCIATION FIBRONECTINE - FIBRONECTINE

La fibronectine présente à la surface cellulaire un arrangement en fibrilles par des associations fibronectine-fibronectine (111,118,122,

192,197,213,243,255,293). Il semble que ces fibrilles puissent interagir avec des microfilaments intracellulaires, mais la nature de ces relations fibronectine-actine n'est pas connue. Toutefois, l'hypothèse de connections à travers la membrane plasmique a été émise (50,118,122). La fibronectine a probablement un autre site d'affinité pour elle-même, notamment dans un peptide de 60 KD situé dans le domaine d'affinité avec la gélatine. La fibronectine peut également former des réseaux à la surface cellulaire à l'aide de ponts disulfures ou du facteur XIII_a transglutaminase (120,140,141,325).

C - ASSOCIATION AVEC LES BACTERIES

Le fragment N-terminal se lie aux *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Cette interaction pourrait se faire par liaison covalente avec la fibronectine à l'aide de la transglutaminase (27,155,199,230). Les interactions de la fibronectine avec les bactéries permettraient la phagocytose de celles-ci par les macrophages (230,255), mais aussi la fixation de bactéries sur les membranes des cellules, première étape de l'agression bactérienne.

III - DOMAINE DE FIXATION AU COLLAGÈNE

Le domaine d'affinité pour le collagène est fait de 340 A.A. (40KD) chez la fibronectine bovine. Il est de forme globulaire et résiste à la protéolyse (22, 86, 97,248). Il possède un nombre élevé de ponts disulfures intra-caténaux, nécessaires au maintien de l'activité biologique (314).

A - LA GLYCOSYLATION DU DOMAINE

Ce domaine possède en outre 60% des glycanes totaux de la fibronectine et la glycosylation importante de ce fragment joue un rôle dans son affinité avec la gélatine comme l'ont montré Zhu *et al.* (334). Dans la fibronectine bovine, les glycanes sont portés par les Asn-399, Asn-497 et Asn-511 (269).

B - STRUCTURE AU COLLAGENE

La fibronectine se lie au collagène de type I, II, III, IV et V (62, 65, 66,113,134,144,146) et nous avons vu le rôle qu'elle joue dans l'attachement des cellules au collagène. L'affinité est beaucoup plus grande pour le collagène dénaturé (non hélicoïdal) que pour le collagène natif (sous forme de triple-hélice). La région du collagène se liant à la fibronectine a été située et déterminée comme étant la moins stable de la triple-hélice du collagène. Elle contient le seul site de la molécule sensible à la collagénase des Vertébrés (146). Le collagène lié à la fibronectine de par son domaine d'affinité peut se fixer de manière covalente au domaine N - terminal adjacent par l'intermédiaire du facteur XIII_a transglutaminase (200).

Un site de faible affinité pour la fibrine a été localisé dans le domaine d'affinité pour le collagène. Il est très fragile, de par sa sensibilité particulière aux protéases (262), liée probablement au fait qu'il ne serait pas hautement structuré.

IV - DOMAINE DE L'ADHESION CELLULAIRE

Une région biologiquement très importante est située au centre de la molécule, il s'agit du domaine d'adhésion cellulaire (98,246). Un premier fragment de 75 KD a été obtenu par chromatographie d'affinité (106). D'autre part, en utilisant des anti-corps, Pierschbacher *et al.* (221,223) ont pu isoler une région fonctionnelle de 11,5 KD résistante aux protéases.

Il existe un très grand degré d'homologie entre les séquences d'acides aminés de cette région des fibronectines plasmatiques humaine et bovine (218,223). Un fragment synthétique de quatre acides aminés possède une importante activité biologique (220,222) (voir Figure 11). S'il n'est pas possible d'inhiber l'attachement des cellules sur une surface recouverte de fibronectine, par de la fibronectine, il est possible de l'inhiber par

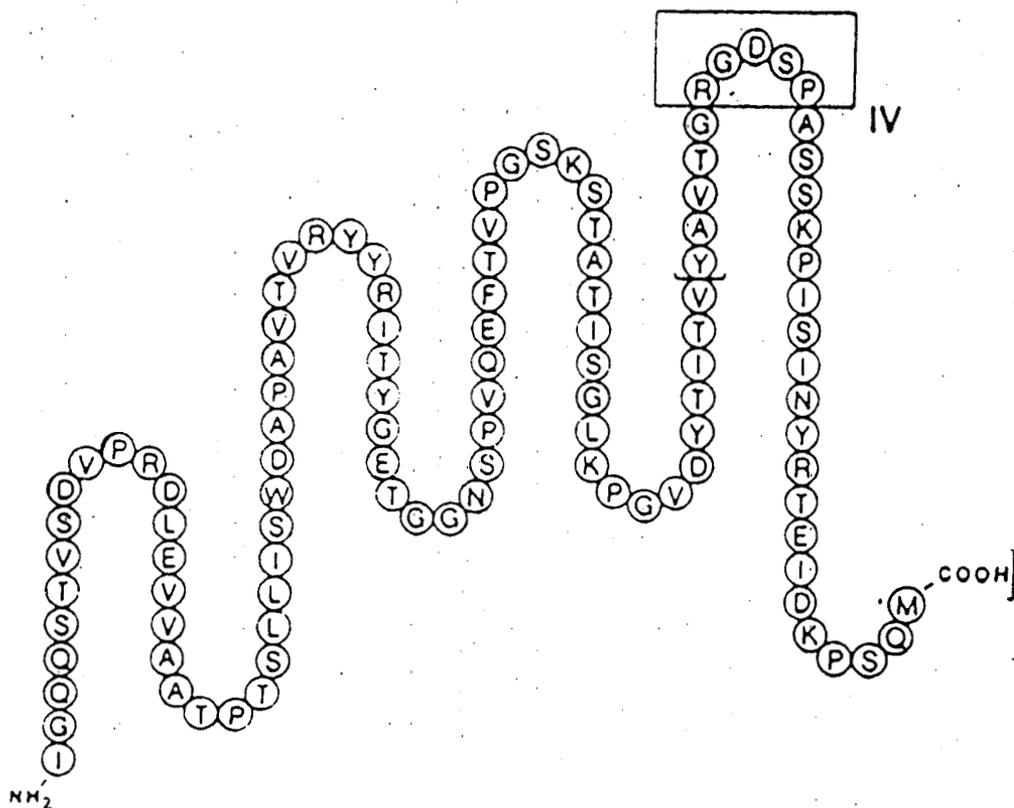


Figure 11 - Séquence d'un peptide de 11,5 KD inhibant l'adhésion de la fibronectine aux cellules. Le fragment peptidique R G D S (Arginine-Glycolle-Acide Aspartique-Sérine) suivi de P (Proline) possède une importante activité biologique (220).

un fragment de 30 acides aminés. D'autres peptides plus petits ont une certaine efficacité, à condition de posséder la séquence Arg - Gly - Asp - Ser. Il faut noter que l'acide aminé suivant cette séquence est un résidu de Proline, avec des conséquences prévisibles sur la structure secondaire de ce peptide (β -turn).

V - DOMAINE DE FIXATION DES PROTEOGLYCANES

La fibronectine s'associe à divers protéoglycannes, et cette interaction joue vraisemblablement un rôle important dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans la phagocytose.

A - ASSOCIATION AVEC L'HEPARINE

La protéolyse ménagée de la fibronectine a permis de mettre en évidence trois sites distincts d'affinité pour l'héparine (85,102,103,105, 234,247,263,264).

1 - Premier site d'affinité

Le premier site est localisé dans la partie N - terminale de la molécule (85,103,234,263,264). L'activité de ce domaine est modulée par une concentration physiologique en ions calcium, mais pas par les autres ions divalents (104). L'affinité de l'héparine pour ce site est plus faible que pour celui qui est inclus dans le domaine C- terminal de la molécule. La fixation est inhibée par une concentration de 0,25 M NaCl (234).

2 - Deuxième site d'affinité

Le deuxième site est situé près de l'extrémité C- terminale de la molécule (85,103,105,234,247,263,264). Il s'agit d'un peptide de 29-36 KD (85) qui apparaît comme un domaine globulaire, compact, mais qui contrairement à celui du collagène, ne possède pas de ponts disulfures intra-moléculaires (102). L'association de ce domaine avec l'héparine est peu sensible à la force ionique (234) et indépendante de la concentration en ions

divalents (102,104,234). Ce site est inhibé par une concentration de 0,5 M NaCl (102,104,234).

3 - Troisième site d'affinité

Le dernier site de fixation de l'héparine a été caractérisé dans la région centrale de la molécule (85) : il présente une très faible affinité pour l'héparine (85) et est inhibé par une concentration physiologique en cations divalents (103,104).

4 - Cinétique d'affinité

Des études *in vitro* des liaisons de l'héparine sur la fibronectine ont montré, par analyse selon Scatchard, la présence de deux sites avec une faible et une forte affinité (28). Les Kd respectifs étant de 10^6 M et $3,5 \times 10^8$ M (28).

B - ASSOCIATION AVEC L'ACIDE HYALURONIQUE

La fibronectine se lie à l'acide hyaluronique (112,136,242,323), influençant ainsi les interactions de l'acide hyaluronique avec les cellules ou avec d'autres constituants de la matrice extra-cellulaire.

Les sites d'affinité de l'héparine et de l'acide hyaluronique sont distincts les uns des autres, la saturation de l'un des sites n'influencent pas l'activité de l'autre. La liaison avec l'acide hyaluronique peut s'effectuer même en présence de 2 M NaCl (125,323).

C - ASSOCIATION AVEC LES CHONDROITINES SULFATES

La fibronectine fixe les chondroprotéines (chondroïtines sulfates conjugués sous forme de protéoglycannes (148,149,208,233), mais non les chondroïtines sulfates "libres" (208,323). Les chondroprotéoglycannes peuvent inhiber les phénomènes d'adhésion dus à la fibronectine (148,150,233).

VI - DOMAINE D'ADHESION DE LA FIBRINE

La fibronectine s'associe à la fibrine et, avec une plus faible

affinité, au fibrinogène.

La fibronectine comme nous l'avons vu plus haut, joue un rôle lors de la formation du caillot sanguin. Elle peut se lier covalentiellement à la fibrine ou au fibrinogène par l'intermédiaire du facteur XIII_a transglutaminase (195,196). La réaction s'effectue probablement entre un résidu de glutamine de la région N- terminale de la fibronectine et un résidu de lysine de la région C- terminale des chaînes α de la fibrine (127,195,198). Les liaisons covalentes ainsi contractées rigidifient le caillot de fibrine *in vitro* (138).

La fibronectine se lie probablement à la fibrine par trois domaines :

- La liaison par le domaine N- terminal possède la plus forte affinité (263,114).

- Un autre site d'affinité a été situé à l'intérieur du domaine d'affinité envers la gélatine (66,114).

- La liaison avec la fibrine par le domaine C- terminal présente une faible affinité. En outre, ce domaine possède l'un des deux groupements thiols libres de la fibronectine (106,263). Toutefois si la fibronectine plasmatique humaine possède ce site d'affinité sur chacun de ses monomères, la fibronectine plasmatique de hamster ne possède ce site d'affinité que sur l'un de ses monomères (106,263,265).

L'incorporation de fibronectine dans les gels de fibrine durant leur formation conduit à une augmentation de la turbidité et à une faible diminution du coefficient de perméabilité. Ce résultat suggère que la largeur des fibres du gel augmente au fur et à mesure de l'incorporation de la fibronectine (206) (voir Figure 12). La fibronectine peut, en outre, s'incorporer dans des gels de fibrine déjà formés dans lesquels les chaînes

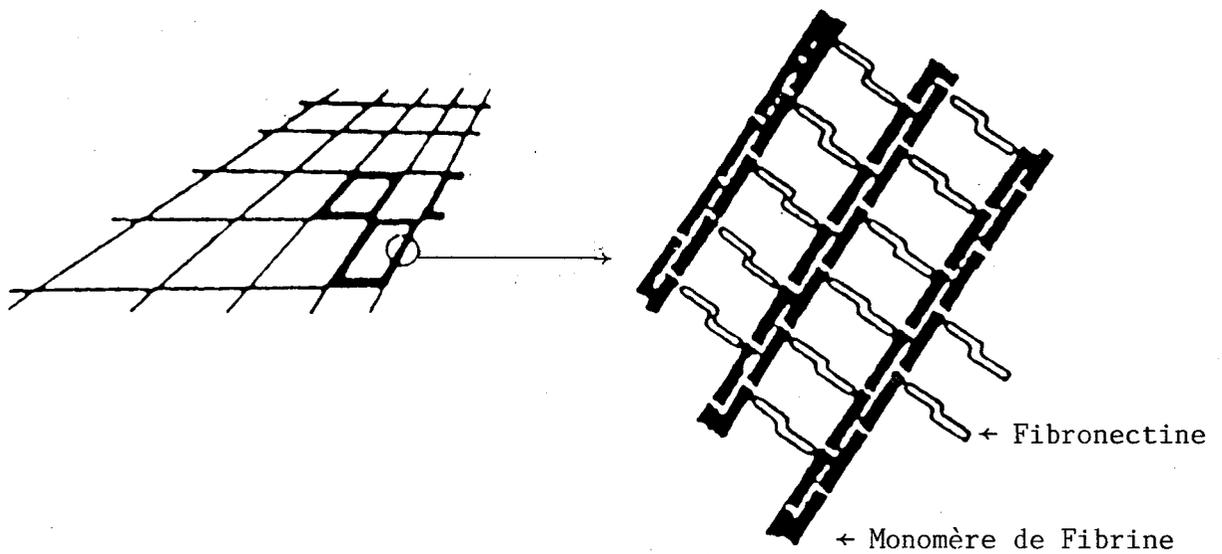


Figure 12 - Schéma d'un arrangement de la fibronectine dans des brins de fibrine. Sur la gauche est représenté un réseau de fibrine; Sur la droite, dans l'un des brins de ce réseau, des molécules de fibronectine lient des polymères de fibrine (206).

α et γ sont totalement liées, ce qui implique que les sites de la fibrine permettant l'attachement avec la fibronectine sont sans doute différents de ceux qui interviennent dans l'association fibrine-fibrine (206).

LA FIBRONECTINE DANS LA PATHOLOGIE

Avant d'étudier les rapports existant entre la fibronectine et divers types de pathologie, il convient de préciser les critères influant sur la localisation cellulaire et tissulaire et la concentration en fibronectine.

Les études effectuées *in vivo* sur un grand nombre d'individus sains ont permis d'établir des "matrices". Celles-ci constituent des bases d'étude afin de comparer l'influence que peut avoir la pathologie sur la fibronectine et inversement. En effet, il a été établi une corrélation entre la teneur en fibronectine plasmatique et l'âge et le sexe des individus (271, 278). Le taux de fibronectine plasmatique augmente à la fois chez les hommes et les femmes en fonction de l'âge (78,167,278). Ce taux augmente plus vite chez les femmes que chez les hommes (167).

En outre, nous avons déjà décrit l'intervention de la fibronectine lors d'une blessure ou d'une infection bactérienne.

I - PATHOLOGIE NON CANCEREUSE

De nombreux auteurs ont cherché à savoir si la fibronectine pouvait être un critère spécifique d'une pathologie précise (voir pour revue générale Akiyama et Yamada (4), Birembaut *et al.* (33), Zerlauth *et al.* (331)). Les études ont porté essentiellement sur les variations de concentration de la fibronectine au niveau des tissus, ou sur l'apparition ou la disparition de cette glycoprotéine au niveau d'un site cellulaire ou tissulaire

Dans certains cas, une étude simultanée de la teneur en fibronectine plasmatique a été réalisée. Par ailleurs, afin d'appuyer les résultats obtenus *in vivo*, un certain nombre d'expériences *in vitro* ont été effectuées sur des cellules en culture.

L'étude détaillée de ces résultats montre une influence de la fibronectine dans un certain nombre de cas. Toutefois, la fibronectine n'est pas encore apparue comme étant le facteur spécifique d'une pathologie précise. Les études les plus nombreuses se rapportent au phénomène fibrotique. Dans la plupart des maladies présentant un processus fibreux, la fibronectine semble impliquée au niveau du tissu atteint. Un ensemble de signes cliniques possèdent, en effet, une base commune : des processus fibreux plus ou moins rétractiles, témoins d'un trouble du tissu conjonctif.

Bien que ces phénomènes impliquent également d'autres protéines de structure comme la laminine et le collagène, l'influence de la fibronectine semble prépondérante dans l'évolution de ces maladies. C'est pourquoi, nous avons passé en revue les principaux organes sujets à des processus fibrotiques impliquant un rôle de la fibronectine. L'une des questions à résoudre est de savoir si l'accumulation de fibronectine contribue à d'autres phénomènes que la simple altération structurale des tissus atteints.

A - ETUDE CLINIQUE *IN SITU*

Le processus fibreux peut apparaître au niveau du foie (hépatite, foie gras, cirrhose).

Elle est alors plus concentrée dans l'espace intercellulaire. Dans ces cas pathologiques, la fibronectine a été localisée par immunofluorescence dans les membranes basales des vaisseaux sanguins et lymphoïdes, les conduits biliaires, autour des axones nerveux et dans l'espace intercellulaire (96,279).

Ces dépôts apparaissent au niveau des tissus du rein (néphropathie à IgA, glomérulo-néphropathie mésangienne, néphropathie membranaire, néphrite mésangiocapillaire et glomérulonéphrite proliférative diffuse (64,219,260,308)), du système cardio-vasculaire (syndrome d'Ehlers-Danlos, athérosclérose (18,202,281)), du poumon (sarcoïdose, alvéolite, pneumoconiose (30)), et des tissus musculaires et dermiques.

Dans l'ensemble de ces maladies, la fibronectine participe à l'amplification de dépôts dans les tissus, mais également, dans différents conduits. Lors de lésions vasculaires la fibronectine peut envahir une partie de la matrice du vaisseau. Chez une artère non lésée, la fibronectine ne se retrouve que dans la couche cellulaire médiane et le sous-endothélium (202,281).

Les phénomènes de micro- et de macroangiopathie sont très étudiés dans le diabète (14). En effet, le micro-réseau artériel peut être obstrué par les dépôts fibreux et, dans les cas plus graves, des vaisseaux sanguins de plus grande taille peuvent être atteints. Dans tous les cas, il apparaît un durcissement progressif des artères, néfaste à une circulation sanguine correcte.

Ces dépôts peuvent se retrouver au niveau des articulations entraînant une arthrite douloureuse. Les taux de fibronectine sont alors très importants dans le liquide synovial, jusqu'à 898 mg/l (123).

B - ETUDE CLINIQUE DU PLASMA

Il est toutefois difficile d'observer une corrélation entre les effets au niveau tissulaire et une variation du taux de fibronectine plasmatique. Ce taux est alors inchangé (arthrite, maladies du foie ou du poumon, infarctus du myocarde, syndrome d'Ehlers-Danlos). Les cas les

plus nets de corrélation sont observés dans les chocs traumatiques, les blessures et les chocs opératoires. Le taux de fibronectine plasmatique décroît alors significativement.

C - CORRELATION PAR ETUDES *IN VITRO*

Les études *in vitro* nous ont permis d'approfondir celles qui ont été réalisées *in vivo*. Les cultures de cellules produisent généralement plus de fibronectine si elles proviennent de malades. Ce taux de production est 10 à 12 fois plus important dans les fibroblastes de sclérodermes par rapport aux fibroblastes normaux (73). Toutefois, le taux de synthèse varie suivant la couche de peau d'origine, les individus et la maladie.

La culture de macrophages alvéolaires provenant de patients atteints de maladie fibrotique du poumon montre une production 7 à 12 fois plus importante que chez les mêmes cellules provenant d'individus sains (232). Les plus fortes différences sont observées chez les macrophages obtenus à partir de patients atteints de fibrose idiopathique pulmonaire.

Des cultures de fibroblastes de peau humaine ont montré également l'apparition d'un désordre de la structure de la matrice extracellulaire en cas de diabète. Ces cultures montrent un rapport fibronectine-collagène inférieur chez les cellules pathologiques en raison d'une plus grande synthèse cellulaire de collagène. De même, des cellules artérielles cultivées sur du milieu contenant des sérums d'humains diabétiques produisent plus de fibronectine que les cellules cultivées en présence de sérums normaux.

D - CONCLUSION

Ces résultats obtenus *in vitro* permettent de confirmer qu'il semble exister, au niveau des tissus atteints de processus fibreux, une synthèse active de fibronectine, supérieure à la normale. Toutefois, en

l'absence d'anti-corps spécifiques de la fibronectine cellulaire ou plasmatique, il n'est pas possible d'exclure la possibilité du dépôt de la fibronectine plasmatique circulante.

II - PATHOLOGIE CANCEREUSE

Dès le début des années 1970, les travaux effectués sur des cellules en culture ont montré que la fibronectine était souvent absente ou significativement moins concentrée à la surface des cellules tumorales. Ces études laissaient donc entrevoir un rôle fondamental de la fibronectine lors du processus tumoral.

C'est pourquoi de nombreux auteurs ont étudié *in vivo* les relations cancer-fibronectine. Il importait de savoir notamment si l'absence de fibronectine était une caractéristique de toutes les cellules cancéreuses. Le désordre engendré au niveau de la matrice extracellulaire pouvait-il expliquer, au moins en partie, le phénomène de métastase ?

Le phénomène observé *in situ* au niveau des tumeurs pouvait-il être relié à la teneur en fibronectine plasmatique ? Toutes ces études ont été effectuées à la fois *in vivo* et *in vitro* afin de vérifier si les cellules cancéreuses présentaient toujours les mêmes caractéristiques. Pour cela, il nous faut préciser ce qu'est une cellule cancéreuse, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Une cellule cancéreuse, quelle que soit son origine, induit une tumeur maligne lorsqu'elle est injectée à un animal. Par opposition, une cellule en lignée établie est considérée comme "normale" si elle n'est pas tumorigène.

A - ETUDE CLINIQUE IN SITU

1 - Cancer du sein

Le type de cancer le plus étudié est probablement le cancer du sein. Toutes les études rapportent des altérations de quantité et de

localisation de la fibronectine dans les zones affectées par un carcinome invasif du sein. Dans les tissus normaux du sein la présence de fibronectine est observée dans la membrane basale, le stroma, à la surface des cellules myoépithéliales et des cellules épithéliales recouvrant les conduits et les alvéoles (19,158,159,276,280).

Si dans la région du carcinome, la fibronectine reste dans le stroma (19,158,159,170) dans les vaisseaux sanguins (158) et à la surface de quelques cellules (276), par contre elle disparaît de la surface des cellules du carcinome et de la membrane basale dans la zone d'infiltration. De plus, au fur et à mesure de l'invasion tumorale, la perte de fibronectine s'accroît à la surface des cellules cancéreuses et autour du groupe de cellules tumorales. La différence est significative vis-à-vis de la distribution de la fibronectine en cas de tumeurs bénignes. Dans le cas de fibroadénome, et de fibrocystite, la fibronectine ne subit pas d'altération.

2 - Tumeur d'ascite

La fibronectine peut être également un marqueur dans les cas de tumeur d'ascite. Sa concentration est alors significativement élevée vis-à-vis des autres protéines (63). Cette teneur permet notamment de différencier la tumeur d'ascite, d'une simple cirrhose.

3 - Carcinome

Dans les carcinomes infiltrants, la fibronectine est absente de la surface des cellules tumorales et de la membrane basale (159,272,280). Cette diminution de fibronectine peut être corrélée avec le degré d'invasion du stroma par la tumeur : la fibronectine est, en effet, présente lors des premiers stades et disparaît lors de l'évolution de la tumeur. Par opposition, dans les tumeurs bénignes, les cellules

possèdent de la fibronectine à leur surface en quantité normale (159) ou très légèrement inférieure à la normale (280).

4 - Sarcome

Au sujet des sarcomes, la situation semble moins claire. *In vivo*, la fibronectine a été observée dans la matrice extracellulaire ou le stroma (159,280). Les cellules individuelles provenant du Sarcome peuvent ne pas avoir de fibronectine (159) ou, au contraire, présenter un réseau dense de fibronectine (280).

B - ETUDE CLINIQUE DU PLASMA

De nombreux auteurs ont démontré une augmentation du taux de fibronectine plasmatique ou de fragments de fibronectine lors de tumeurs malignes (16, 52,211,212,253,254,271,291,330,332).

Quelques cas de diminution ont toutefois été observés (277). Stathakis *et al.* (277) obtiennent, en effet, des différences seulement en cas de cancer du pancréas (augmentation du taux de fibronectine) et en cas de cancer du foie (diminution du taux de fibronectine).

Choate *et al.* (52) ont montré une augmentation de la fibronectine plasmatique en cas de cancer du sein et du colon. Cette augmentation n'est toutefois pas proportionnelle au stade d'évolution de la tumeur.

Cette même étude portant sur des cas de Leucémie aïgue montre qu'il n'est pas possible de tirer de conclusions quant à la teneur en fibronectine plasmatique. Trop de facteurs (infection, lyse de cellules) influent, en effet, sur la concentration de la fibronectine plasmatique. Boughton et Simpson(39) ont toutefois montré que le taux de fibronectine diminuait dans les cas de Leucémie aïgue.

Les études ont jusqu'à présent essentiellement porté sur la teneur du plasma en fibronectine. Peu d'études ont porté sur la partie

glycannique de la fibronectine plasmatique et ses modifications. Yamaguchi *et al.* (327) ont étudié par immunoélectrophorèse croisée (en présence de Concanavalline A) les différences de migration de la fibronectine en fonction de son origine par rapport à un témoin sans lectine. A l'heure actuelle, aucune différence significative n'a encore été mise en évidence entre la fibronectine plasmatique normale et celle provenant de patients cancéreux.

C - CORRELATION PAR ETUDES *IN VITRO*

L'étude *in vitro* des relations entre la transformation cellulaire et la fibronectine a commencé dès l'observation par Hynes en 1973 de la perte de fibronectine de la surface de cellules viro-transformées (116). Ce phénomène a été mis 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. Ces cellules peuvent provenir soit de la transformation virale d'une cellule en culture, de tumeurs cancéreuses animales ou humaines établies en culture, ou de la transformation chimique ou spontanée de cultures cellulaires normales. Ces cellules transformées présentent des modifications des glycoconjugués, notamment une simplification des glycanes des glycolipides (99) et une polyantennarisation des glycanes des glycoprotéines. Cependant, ces critères ne sont pas spécifiques des cellules transformées. En effet, le phénomène de polyantennarisation semble se retrouver dans d'autres cas pathologiques.

En outre, la perte de fibronectine de la surface cellulaire n'est pas un marqueur absolu de tumorigénicité. En effet, il existe un certain nombre de contradictions à ce niveau. Une cellule ne possédant pas ou peu de fibronectine cellulaire n'est pas obligatoirement tumorigène. Inversement, il existe certaines cellules tumorales dont le taux de fibronectine associée

à la membrane reste normal (43, 61,126,179,214). En outre, l'addition de fibronectine à des cellules transformées en culture permet de rendre à ces cellules leur phénotype normal, mais ne leur enlève pas leur pouvoir tumorigène (12, 47,326).

1 - Types cellulaires concernés

Les types cellulaires affectés par ces modifications phénotypiques sont nombreux. Lors de la transformation maligne, la fibronectine disparaît de la surface cellulaire des cellules épithéliales du foie (235), des cellules de mésenchyme du rein (101), des cellules mammaires (19,272, 274), des myoblastes (121), des cellules gliales (294), des cellules de carcinome (214) et des fibroblastes (116,293,324). Certaines lignées cellulaires apportent des résultats contradictoires. Les cellules des glandes salivaires, de la vessie (312), certaines cellules épithéliales du foie (24,210) et des glandes mammaires (276,289) ont des taux de fibronectine semblables à ceux des cellules normales en culture. L'ensemble de ces résultats, ainsi que l'étude d'autres lignées cellulaires, permettent de penser qu'il existe une forte corrélation entre le taux de fibronectine présente à la surface cellulaire et le pouvoir tumorigène *in vivo*.

2 - Causes de la diminution de la fibronectine cellulaire

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. Les explications possibles sont multiples et nous examinerons les différentes hypothèses

a - Synthèse

Le taux de synthèse de la fibronectine peut 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 mRNA de la fibronectine (2). Cependant, certaines cellules transformées ne possédant pas ou peu de fibronectine associée à la membrane ont un taux de synthèse quasiment normal (107) et, bien que certaines études aient démontré l'existence d'une diminution de cette synthèse associée à la transformation (2 ,119,209), ce phénomène ne peut expliquer que partiellement la désorganisation totale de la matrice extracellulaire et d'autres altérations doivent être en cause.

b - Dégradation protéolytique

La possibilité d'une dégradation protéolytique de la fibronectine associée à la transformation maligne a été avancée (177,209,311). En particulier, lors de sa purification, la fibronectine transformée est très sensible à l'action des protéases (304).

Wen-Tien Chen *et al.* (48) ont étudié, sur des fibroblastes transformés par le virus du sarcome de Rous, l'influence des protéases sur la fibronectine. Ces fibroblastes montrent, en effet, une augmentation de la synthèse de protéases due à la transformation. Les résultats de cette étude permettent de conclure à une dégradation de la fibronectine aux zones de contact de la cellule avec le substrat. Récemment, le même auteur (46) a montré que le produit du gène viral : pp^{60src}, permettait une phosphorylation spécifique de la tyrosine, sur l'ensemble des composants de la membrane cytoplasmique où il est localisé (53,169,315). Cette activité pourrait induire une stimulation des protéases extracellulaires, entraînant une dégradation locale de la fibronectine cellulaire. Cette dégradation aux sites de liaison cellule-substrat entraînerait ainsi une diminution de l'activité d'adhésion de la cellule au substrat.

c - Modifications structurales

Des travaux récents ont tenté de caractériser au niveau de la fibronectine des modifications de structure qui pourraient expliquer sa disparition de la surface cellulaire. Il ne semble pas que la structure primaire de la fibronectine soit fondamentalement modifiée. Toutefois, des différences mineures ont été observées en la N-cFN et la T-cFN par Sekiguchi (266).

Après l'action de la thermolysine, les fragments dérivés du deuxième domaine d'affinité pour l'héparine de la N-cFN sont nettement distincts de ceux de la T-cFN. Trois groupes de fragments de masse moléculaire 40 KD, 35-20 KD et 30 KD sont relargués à partir de la N-cFN, tandis que, seul, un fragment de 35-32 KD est libéré chez la T-cFN. Les fragments après thermolysine de 44/60 KD représentant le domaine d'affinité avec la gélatine sont légèrement, mais significativement, plus grands chez la T-cFN que chez la N-cFN. La même observation fut effectuée sur les fragments de 210/165 KD obtenus après action de la trypsine.

d - Modifications de charge

En outre, la fibronectine transformée semble plus sulfatée (316) et / ou plus phosphorylée (10). Ces modifications des charges portées par la molécule peuvent induire des modifications de sa structure expliquant l'abaissement du point isoélectrique (250), l'augmentation de groupements aminés libres accessibles à l'action de la transglutaminase (239) et l'augmentation de la sensibilité aux protéases (304).

e - Modifications glycaniques

La modification des structures glycaniques et en particulier l'augmentation du nombre de résidus d'acide sialique pourrait également modifier la charge globale de la molécule. L'augmentation de la

taille des glycanes en cas de polyantennarisation pourrait donner une structure en "umbrella conformation" (186,187,188,189). Cette hypothèse permettrait d'expliquer la métastase des cellules cancéreuses sur la base d'un masquage de sites de reconnaissance et d'attachement cellulaire.

f - Récepteurs

La diminution de la fibronectine de la surface cellulaire pourrait également être due à une disparition ou à une diminution des récepteurs membranaires de la fibronectine.

D - CONCLUSION

La diminution de la teneur en fibronectine de la membrane cellulaire *in vitro* et dans les tumeurs *in vivo*, ainsi que la perte d'adhésivité cellulaire qui en découle, semblent donc résulter d'un processus complexe induit par la modification d'un certain nombre de facteurs cellulaires.

L'augmentation de la teneur du plasma en fibronectine pourrait ainsi résulter en partie de la "fuite" de la fibronectine par les tumeurs cancéreuses. Mais ce phénomène ne semble pas à lui seul convaincant et d'autres hypothèses doivent être avancées afin d'éclaircir ce processus métabolique.

TRAVAUX

PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

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

I - MATERIEL

Les supports d'affinité : gélatine-Sepharose 4-B, Con A-Sepharose 4-B ainsi que les matrices des colonnes Sepharose 4-B, AcA-34 proviennent de la firme, Pharmacia. Le ^{14}C anhydride acétique a été fourni par le C.E.A. (Saclay), le Bleu de Coomassie et l'agarose (type II, Médium EEO) par Sigma, le nitrate d'argent, le persulfate d'ammonium et le T.E.M.E.D. par Merck, le S.D.S., l'acrylamide et le N,N'-méthylènebisacrylamide par B.D.H. Laboratories, le P.M.S.F. par Eastman C° et l'hydrazine anhydre par la Société Pierce. La Con A provient de la firme I.B.F.

Les plasmas ont tous été recueillis sur citrate/E.D.T.A. pour éviter la coagulation du sang. Le sang a ensuite été centrifugé et le surnageant (plasma) conservé congelé à -20°C avant utilisation.

Les plasmas d'individus normaux (N) et leucémiques (L), ainsi que les cryoprécipités, nous ont été fournis par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille avec l'aimable autorisation de Monsieur le Professeur Goudemand.

Les plasmas pathologiques (cancéreux) (P1) et (P2) ont été prélevés sur des patients atteints de carcinome gastro-intestinaux. Ces différents lots de plasma nous ont été fournis par le Centre Oscar Lambret dans le service de gastro-entérologie du Docteur Corto.

II - METHODES

A - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DE LA FIBRONECTINE

1 - Préparation de l'immunsérum anti-fibronectine

L'immunsérum anti-fibronectine a été préparé au laboratoire par injection intra-musculaire, chez trois lapins (variété hybride de Nouvelle-Zélande) de fibronectine pure (1 mg/ml) en présence d'adjuvant de Freund (1 ml). Les injections ont été répétées 4 fois à 2 semaines d'intervalle. Le sang prélevé à l'oreille du lapin, a été centrifugé, puis laissé à 4°C une nuit. Le sérum obtenu est alors déposé sur une colonne de Sepharose 4-B sur laquelle est fixé l'ensemble des protéines du plasma humain sauf la fibronectine. Les anti-corps non retenus par la colonne sont alors fractionnés par aliquotes et conservés congelés à -20°C.

2 - Immunodiffusion radiale

La technique utilisée a été décrite par Mancini *et al.* (176). L'agarose (1%,P/V) est préparé dans un litre du tampon suivant : véronal acide 0,8 g, véronal sodé 4,28 g, pH 8,6. Le gel (0,15 ml/cm²) contenant de l'anti-sérum anti-fibronectine (2%,V/V) est coulé sur une plaque de verre. Les produits à analyser (2 à 8 µl) sont déposés dans des puits pratiqués à l'emporte-pièce dans l'agarose. Après diffusion en chambre humide pendant 48 heures, la plaque est lavée dans du sérum physiologique (NaCl 9%) séchée puis colorée par le Bleu de Coomassie.

3 - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle

La méthode a été décrite par Scheidegger en 1955 (259). Les solutions protéiques à analyser (2 à 8 µl) sont déposées dans des puits réalisés dans de l'agar (1 ml/cm de plaque standard). Le tampon d'électrophorèse utilisé est le suivant : véronal acide 5,3 g, Tris 11,08 g, lactate de Ca 0,133 g, azide de Na 0,14 g, complété à 1 litre avec de l'eau et

ajusté à pH 8,6 avec HCl. La migration s'effectue à 20 v/cm durant 45 minutes. L'anti-sérum est alors introduit dans des gouttières pratiquées dans le gel. Après diffusion durant 48 heures en chambre humide, la plaque est lavée, séchée, et colorée par le Bleu de Coomassie.

4 - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle dite "en rockets"

La technique est réalisée selon Svendsen et Carsten (283). Le tampon utilisé est identique à celui utilisé lors d'une immunoélectrophorèse monodimensionnelle. L'anti-sérum (2%,V/V) est introduit dans le gel d'agarose (15 ml) qui est coulé sur une plaque de verre (10x10 cm). Les solutions à analyser (2 à 8 µl) sont introduites dans des puits réalisés à l'emporte-pièce. La migration s'effectue à 20 v/cm durant 5 heures. La plaque est alors lavée, séchée et colorée par le Bleu de Coomassie.

5 - Immunoélectrophorèse d'affinité bidimensionnelle

La technique est réalisée selon Bøg-Hansen *et al.* (36) et Nicollet *et al.* (203).

a - Première dimension

La Con A (40 µg/cm²) est introduite dans le gel d'agarose à 1% dans le tampon Tris/HCl 72 mM, véronal sodé 24 mM, lactate de Ca 0,4 mM, pH 8,6 en présence de MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂ 1 mM. La plaque de verre (10x10 cm) est recouverte de 15 ml de gel contenant la lectine. Les solutions à analyser (2 à 8 µl) sont introduites dans 8 puits pratiqués à l'emporte-pièce. L'électrophorèse s'effectue durant 3 heures à 10 v/cm dans un appareil LKB 2117 Multiphor muni d'une plaque réfrigérante.

b - Deuxième dimension

L'agarose utilisé pour la seconde dimension contient l'anti-sérum anti-fibronectine monospécifique (1%,V/V) et de l' α -M.Glc (1%,P/V) (256). La migration est réalisée durant 18 heures à 2 v/cm. Les plaques

sont ensuite lavées, séchées et colorées par le Bleu de Coomassie.

c - Analyse des profils obtenus

La migration de la fibronectine est étudiée en présence et en absence de lectine. Un Rf peut-être calculé en fonction de la migration maximum, réalisée en absence de lectine.

B - PURIFICATION DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE HUMAINE

1 - Chromatographie d'affinité sur gélatine immobilisée

La fibronectine est isolée du plasma ou du cryoprécipité par chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Sepharose 4-B (65). Le plasma, conservé congelé à -20°C, est décongelé à 37°C jusqu'à absence totale de précipité. Le cryoprécipité lyophilisé est repris par du tampon P.B.S. et agité lentement à 37°C jusqu'à absence totale de floculation. L'un et l'autre sont additionnés d'E.D.T.A. (5 mM) et de P.M.S.F. (1 mM) préalablement dissous dans 1 ml d'éthanol. A ce stade, ils sont injectés sur la colonne d'affinité. En amont de la colonne de gélatine-Sepharose 4-B (50 ml), le plasma ou le cryoprécipité est passé sur une colonne de Sepharose 4-B (50 ml) afin d'éliminer d'éventuels contaminants non spécifiques. Ces deux colonnes sont montées en série et équilibrées dans du tampon P.B.S. additionné d'E.D.T.A. (5 mM) et de P.M.S.F. (1 mM), le débit étant d'environ 10 ml/h. Après un lavage prolongé par le même tampon (suivi par mesure de la D.O. à 280 nm), les colonnes sont séparées et la colonne de gélatine-Sepharose 4-B est rincée avec une solution de NaCl (4 M), urée (1 M), E.D.T.A. (5 mM) et P.M.S.F. (1 mM) dans du tampon P.B.S. La fibronectine est enfin éluée par une solution d'urée (4 M) dans du tampon P.B.S. Toutes les étapes de fractionnement sont effectuées à 4°C.

2 - Tamisage moléculaire

La fraction éluée de la colonne de gélatine-Sepharose 4-B par la solution d'urée 4 M est déposée sur une colonne d'AcA-34 (800 ml) équilibrée dans du tampon P.B.S. additionné d'urée (8 M), d'E.D.T.A. (5 mM) de P.M.S.F. (1 mM) et de D.T.T. (5 mM). Cette opération est réalisée afin d'éliminer de la fraction des contaminants mineurs de masse moléculaire plus faible. La détection de la fibronectine purifiée est effectuée par mesure de la D.O. à 280 nm, et réaction immunologique en Ouchterlouny. Le débit de la colonne a été réglé à 10 ml/h.

3 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. du plasma et des fractions partiellement et totalement purifiées de fibronectine est effectuée selon la technique de Laemmly (161,162).

Nous avons utilisé comme gel de séparation, un gradient de polyacrylamide de 5 à 25%, le gel de concentration étant à 5%. La masse moléculaire est déterminée par rapport à un mélange de protéines témoins provenant de la firme Pharmacia "High and Low Molecular Weight Calibration Kit Proteins". Les échantillons sont repris par un tampon Tris/HCl 0,3 M pH 8,9, 5% S.D.S, 5% β -mercapto-éthanol, 20% glycérol, le Bleu de Bromophénol est ajouté comme témoin de migration.

Avant l'injection, les échantillons sont portés à ébullition (100°C) pendant deux minutes.

Après électrophorèse, les protéines sont colorées par le Bleu de Coomassie ou par la méthode au nitrate d'argent selon la technique de Morissey (190). Les gels d'électrophorèse sont ensuite séchés, ou conservés dans une pochette plastique scellée.

C - OBTENTION ET PURIFICATION DES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE

1 - Obtention des N- et O- glycanes par hydrolyse alcaline

La méthode de rupture des liaisons O-glycosidiques de la sérine et de la thréonine (β -élimination) est couramment appliquée pour libérer les glycanes des O-glycosylprotéines (15, 81,128,166).

200 mg de fibronectine pure sont ajoutés à 1 ml de NaOH 0,05 M, BH_4K 1 M en présence de quelques gouttes d'octanol. La réaction s'effectue dans un ballon sous reflux à 45°C pendant 18 heures. A ce moment, 1 ml de NaOH 2 M, BH_4K 1 M est additionné dans le ballon, la réaction s'effectuant durant 6 heures à 100°C.

La solution est neutralisée avec de l'acide acétique à 50%, concentrée sous pression réduite, puis dessalée sur colonne de Bio-Gel P-2 équilibrée en H_2O . Les glycanes sont concentrés sous pression réduite en présence de méthanol.

La N-réacétylation des glycanes est réalisée comme suit : Le résidu est repris par 2 ml de CO_3HNa saturé et 20 μl d'anhydride acétique sont ajoutés toutes les 10 minutes durant 1 heure. La solution est neutralisée par l'addition de Dowex 50x8. Les glycanes sont ensuite dessalés sur colonne de Bio-Gel P-2 équilibrée avec de l'eau.

2 - Libération des glycanes par hydrazinolyse

Les glycanes sont préparés par hydrazinolyse des fractions protéiques dialysées et lyophilisées, selon la méthode de Bayard et Montreuil (26). Les échantillons sont dissous dans 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_2SO_4 afin d'éliminer les traces d'hydrazine. Les glycanes libérés sont dessalés sur une colonne de Bio-Gel P-2 équilibrée

dans l'acide acétique à 1%.

Après neutralisation de la solution, les glycanes sont concentrés sous pression réduite et repris par 0,5 ml de CO_3HNa saturé. Ils sont alors réacétylés par du ^{14}C anhydride acétique, puis par de l'anhydride acétique froid à raison de 10 μl toutes les heures durant 5 heures. Les glycanes sont alors réduits par le borohydrure de sodium (BH_4Na). Pour ce faire, la solution est portée à pH 12 par NaOH, puis un excès de BH_4Na est ajouté. La réduction est effectuée une nuit à température ambiante. La solution est alors ajustée à pH 7 avec de l'acide acétique, concentrée sous pression réduite, rincée 3 fois avec du méthanol redistillé puis déposée sur papier Whatman N° 3. La chromatographie s'effectue en solvant pyridine / acétate d'éthyle / acide acétique / eau (5 / 5 / 1 / 3) (72).

Les glycanes sont repérés sur la chromatographie à l'aide d'un détecteur de radioactivité de type Numelec. La bande radioactive correspondant aux glycanes marqués (située à proximité du trait de dépôt de la chromatographie) est ensuite éluée avec de l'eau, concentrée sous pression réduite et dessalée sur colonne de Bio-Gel P-2 équilibrée en eau.

3 - Chromatographie d'affinité sur colonne de lectine immobilisée

Les échantillons glycaniques 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 ml, équilibrée dans du tampon acétate de sodium 5 mM pH 5,2, NaCl 0,1 M, CaCl_2 1 mM, MnCl_2 1 mM et MgCl_2 1 mM) (59). A ce pH, la Con A se trouve sous forme dimérique.

Les échantillons sont repris par 1 ml de tampon, injectés, et la colonne rincée par 50 ml de tampon (5 fois son volume), puis éluée par l' α -M.Glc; tout d'abord par 50 ml d' α -M.Glc 10 mM puis par 50 ml

d' α -M.Glc 0,3 M, en solution dans le même tampon.

Le débit d'élution de la colonne est de 9 ml/h et on recueille des fractions de 1,5 ml. Les différents pics d'élution obtenus sont dessalés sur Bio-Gel P-2 équilibré dans l'eau.

4 - Fractionnement des glycanes par chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions

Les glycanes libérés par hydrazinolyse et réacétylés ont été fractionnés, en fonction du nombre de résidus d'acide sialique, par H.P.L.C d'échange d'ions sur une colonne Micropak AX-10 (Varian Associates) selon la méthode de Baenziger et Natowicz (21).

Les conditions expérimentales sont les suivantes : phase mobile : H₂O; élution par un gradient discontinu de KH₂PO₄ pH 5,2; débit 1 ml/min; fractions de 0,64 ml comptées directement en scintillation liquide ou collectées en fonction de la sialylation. Après lyophilisation les échantillons préalablement filtrés sont repris par de l'eau (500 μ l) et injectés, la colonne étant équilibrée dans l'eau. Après 10 minutes de rinçage, la concentration en KH₂PO₄ 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 est éluee directement par l'eau, les glycanes acides étant élues par des concentrations croissantes de KH₂PO₄.

Pour étalonner la colonne, nous avons utilisé les glycanes de l'orosomucoïde libérés par hydrazinolyse et N-réacétylés par le ¹⁴C anhydride acétique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale. Les quantités injectées varient de 10 000 à 600 000 dpm.

5 - Fractionnement des glycanes sur AcA-202

Il est possible de séparer les glycanes en fonction de leur masse moléculaire par gel filtration sur colonne d'AcA-202 (1,0x100 cm) équilibrée dans l'acide acétique 0,5% afin de diminuer les interactions des glycanes avec le support. Le débit est fixé à 7 ml/h.

Le repérage des glycanes est effectué par mesure de la densité optique à 206 nm.

D - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANES DE LA FIBRONECTINE

1 - Détermination de la composition molaire des monosaccharides

a - Méthanolyse par trifluoroacétylation

La méthode a été décrite par Zanetta *et al.* (329).

A 1 mg de glycoprotéine ou 50 µg de glycanes sont ajoutés 10 µg de mésoinositol (étalon interne) à 100 µg/ml. Après lyophilisation, le produit est recouvert par 1 ml de CH₃OH/HCl 0,5 N (méthanol anhydre) pendant 24 heures à 80°C. S'il s'agit d'une glycoprotéine, il est nécessaire de centrifuger (ou filtrer) et de délipider à l'heptane avant d'évaporer à chaud CH₃OH/HCl sous azote.

Le résidu sec est repris par 50 µl de CH₂Cl₂ et 50 µl d'anhydride trifluoroacétique, chauffé 5 minutes à 150°C dans un bain de sable, refroidi, puis réchauffé 5 minutes à 150°C. Les monosaccharides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse (colonne de verre (0,3x300 cm) remplie de Silicone OV 210 à 5% sur Varaport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100 à 220°C à raison de 2°C/min.; débit de gaz vecteur (hélium) 10 ml/min.).

b - Microméthanolyse par triméthylsilylation

Pour de très faibles quantités de glycanes (0,1 µg à 10 µg) une méthode d'analyse plus fine a été mise au point dans le

laboratoire. Cette technique est dérivée de celle de Kamerling *et al.* (137).

Les glycannes lyophilisés sont repris par 200 μ l de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 0,5N pendant 24 heures à 80°C. Le milieu est ensuite tamponné avec du carbonate d'argent (Ag_2CO_3), puis 10 μ l d'anhydride acétique sont ajoutés, la réacétylation s'effectuant durant une nuit à l'obscurité à température ambiante. Le surnageant est alors repris, délipidé deux fois à l'heptane, puis séché sous azote. Le produit est alors repris par 50 μ l de pyridine et 50 μ l de B.S.T.F.A.

Les monosaccharides sont alors analysés en chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire imprégnée de silicone OV 101 (0,3 mm x 25 m); température programmée de 120°C à 240°C à raison de 2°C par minute; pression du gaz vecteur (hélium) à 0,05 bar).

2 - Microméthylation

La microméthylation est réalisée selon un protocole décrit par Finne *et al.* (70).

Le produit à méthyler (20 à 50 μ g de glycannes) est lyophilisé dans une pipette introduite dans un tube à méthanolyse. 100 μ l de D.M.S.O. (diméthylsulfoxyde) sont ajoutés sous azote. La base de méthylation (lithium méthyl sulfinyl carbanion) est ajoutée (100 μ l) sous azote. Le tube est bouché hermétiquement, mis à soniquer 1 heure 30 minutes puis congelé. 200 μ l d'iodure de méthyle sont ajoutés avant une deuxième sonication d'une heure.

Les extractions sont réalisées par l'addition dans un premier temps de 500 μ l d'eau Milli-Q froide, de 1 à 2 cristaux de thiosulfate et de 300 μ l de chloroforme. La phase chloroformique inférieure est prélevée tandis que la phase aqueuse est conservée pour deux extractions

supplémentaires avec 500 µl de chloroforme. Les phases chloroformiques sont lavées 5 fois par 1 ml d'eau Milli-Q. L'excès d'eau restante est absorbé par du sulfate de sodium. La solution est filtrée sur laine de verre. Le filtrat est ensuite évaporé sous azote puis lyophilisé pour éliminer toute trace de D.M.S.O.

La méthanolyse du produit méthylé est réalisée par l'addition de 100 µl de CH₃OH/HCl 0,5 N, 24 heures à 80°C. Après évaporation à sec, 20 µl de pyridine et 50 µl d'anhydride acétique sont ajoutés. Le tube est placé à 100°C, 15 minutes, agité puis replacé à 100°C, 30 minutes. IL est enfin évaporé pour être repris par une quantité déterminée de CH₃OH.

Les glycanes méthylés et méthanolysés sont analysés sur colonne capillaire imprégnée de Silicole OV 101 (0,3mm x 25 m) couplée au spectromètre de masse Rieber-Mag-10-10 (énergie d'ionisation : 70 : ev). Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- température du détecteur et de l'injecteur : 220°C.
- gradient de température 100 à 240°C à 5°C/min.
- gaz vecteur hélium à 0,05 bar.

3 - Analyse structurale des glycanes par R.M.N.

Les oligosaccharides-alditols (de 200 µg à 1,4 mg) ont été échangés plusieurs fois dans ²H₂O (99,95 atomes % ²H, C.E.A.,FRANCE) à pD 7 puis lyophilisés. L'analyse en Résonance Magnétique Nucléaire du proton à 400 Mhz a été réalisée*sur un spectromètre BRUKER AM-400 WB (Centre Commun de mesure, Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois) opérant en mode pulsé et transformée de Fourier, à une température

**Les mesures et le dépouillement des diagrammes obtenus ont été réalisés par Jean-Michel Wieruszkeski et Gérard Strecker à qui nous adressons nos très vifs remerciements.*

de sonde de 300°K ($27^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) et piloté par un calculateur BRUKER aspect 3000. Une amélioration de la résolution est obtenue en utilisant les fonctions de LORENTZ et de GAUSS.

Les glissements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au 4,4 -diméthyl-4-silapentane - 1 - sulfonate de sodium, mais sont actuellement mesurés indirectement par rapport à l'acétone utilisée comme référence interne ($\delta = 2,225$ ppm).

RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'analyse immunologique des différentes fibronectines plasmatiques provenant : d'individus normaux (N), leucémiques (L) et cancéreux (P1) et (P2) en fonction du profil obtenu en électrophorèse d'immuno-affinité.

Cette étude a été poursuivie, après purification de la fibronectine plasmatique, par le fractionnement des glycanes des fibronectines normales et pathologiques.

Enfin, la structure des fractions glycaniques majeures a été déterminée par des méthodes physico-chimiques (chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, R.M.N.).

I - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE

L'électrophorèse d'immuno affinité de la fibronectine plasmatic humaine nous a permis d'analyser l'affinité de cette glycoprotéine vis-à-vis de la Con A.

Cette méthode permet une étude préliminaire des glycanes des glycoprotéines, sans purification préalable, à partir du plasma total.

Cette technique nous a donc servi de base dans l'analyse de plasmas normaux et pathologiques, l'antisérum monospécifique révélant uniquement le profil de migration électrophorétique de la fibronectine.

A - OBTENTION D'ANTI-CORPS ANTI-FIBRONECTINE SPECIFIQUES

La pureté des anti-corps anti-fibronectine humaine a été vérifiée par immunoélectrophorèse monodimensionnelle, afin d'éviter toute réaction non spécifique avec une autre protéine plasmatic.

La Figure 13 montre que le plasma total donne un seul arc de précipitation, ce qui démontre la spécificité stricte des anti-corps obtenus. Ceux-ci ont été utilisés dans l'ensemble des manipulations suivantes. Leur conservation est effectuée par congélation à -20°C .

B - ANALYSE COMPARATIVE DE PLASMAS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES

Nous avons réalisé des analyses préliminaires de différents plasmas - normaux et pathologiques - en particulier, des plasmas de patients atteints soit de leucémies (L), soit de carcinomes gastro-intestinaux (P1 et P2).

Ces analyses ont été effectuées en utilisant la technique d'électrophorèse d'immuno affinité . L'introduction de l' α -M.Glc dans le gel coulé pour la migration dans la seconde dimension, nous a permis d'éliminer toutes les interactions spécifiques dues à la présence des autres glycoprotéines présentes dans le plasma (256).



Figure 13 - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle réalisée à l'aide de l'immunsérum spécifique préparé au laboratoire. Cette Figure montre un seul arc de précipité de l'immunsérum contre le plasma total, identique à celui obtenu contre la fibronectine pure.

La Con A se lie aux glycanes de type N-acétyl-lactosaminique de structure biantennée, mais pas aux glycanes de type N-acétyl-lactosaminique de structure tri- et tétraantennée.

Bien que les conditions expérimentales et, en particulier, les concentrations en Con A se soient pas les mêmes, Yamaguchi *et al.* (327) ont montré que la fibronectine plasmatique humaine était fortement retenue ($R_f = 0,67$: migration du pic de fibronectine en présence de Con A par rapport à la migration de ce pic en absence de lectine), confirmant nos propres résultats ($R_f = 0,50$: rapport obtenu lorsque la Con A est présente dans le gel d'agarose à une concentration de $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

En étudiant des fibronectines provenant de diverses origines (liquide amniotique, liquide de tumeur d'ascite et plasma de la corde fœtale) Yamaguchi *et al.* (327) ont montré que dans le cas de la fibronectine du liquide amniotique possédant essentiellement des glycanes de type lourd, de structure triantennée (154), la migration observée en présence de Con A était égale à celle obtenue en absence de lectine ($R_f = 1,02$). Ces résultats prouvent la validité de la technique employée tout au moins, lorsque les différences de glycosylation sont très marquées. Nous avons donc adapté cette méthode à l'étude de la fibronectine plasmatique provenant de plasmas normaux et pathologiques.

Pour tous les plasmas normaux analysés (25 échantillons), nous avons obtenu un profil en électrophorèse bidimensionnelle identique (voir Fig. 14). En l'absence de Con A la fibronectine plasmatique présente alors un comportement de β_1 globuline. De plus, elle possède une très forte affinité vis-à-vis de la Con A comme le prouve sa très faible migration lorsque l'on ajoute de la Con A dans la première dimension.

Parallèlement, nous avons analysé un certain nombre de plasmas

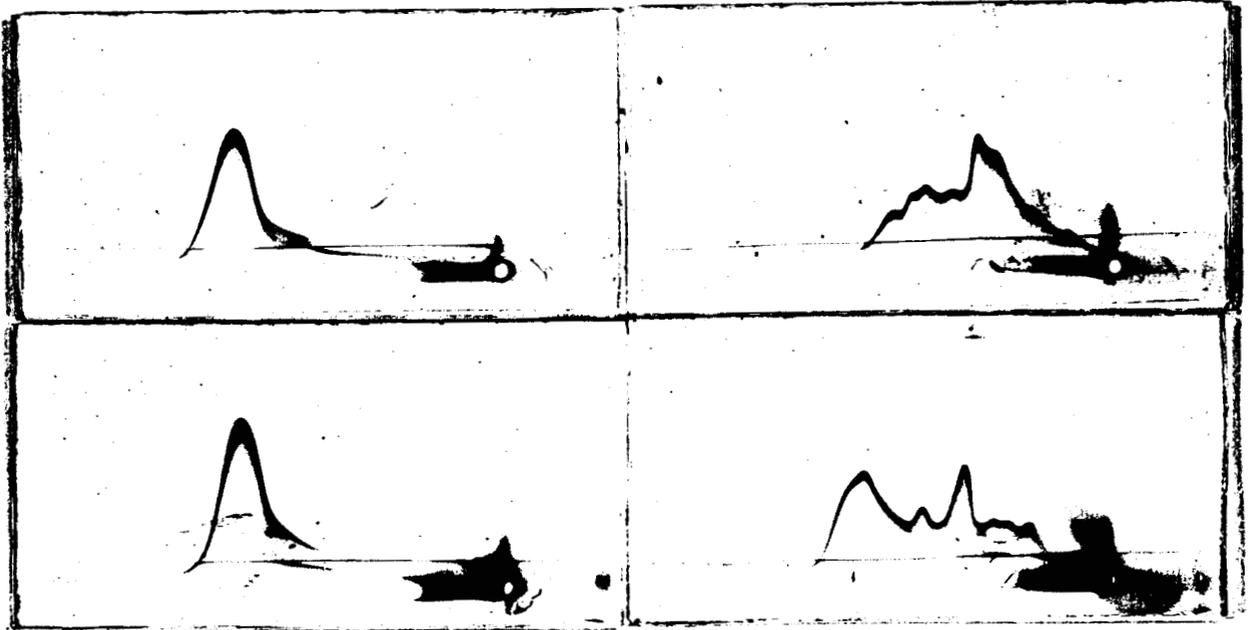


Figure 14 - Immunoélectrophorèses d'affinité bidimensionnelles réalisées en présence (à droite) et en absence (à gauche) de Con A, sur du plasma normal (N) (en haut) et sur du plasma de cancéreux (P2) (en bas).

provenant d'individus leucémiques (10 échantillons provenant de leucémies myéloïdes de chroniques et leucémies lymphoïdes chroniques). Le profil obtenu par électrophorèse bidimensionnelle, que ce soit en l'absence ou en présence de Con A est pratiquement identique à ceux de fibronectines plasmatiques normales.

Enfin, nous avons étudié 128 plasmas provenant d'individus atteints de néoplasmes gastro-intestinaux. Dans 53% des cas (68 plasmas) les migrations électrophorétiques en présence de Con A étaient supérieures à celles obtenues avec les plasmas normaux, ce qui était en faveur d'une modification de la partie glycanique de la fibronectine.

Le cas le plus caractéristique est illustré par la Figure 14. Celui-ci présente une très faible affinité vis-à-vis de la Con A par rapport au plasma normal (N). Dans ce cas, la migration du pic majeur de cette fibronectine pathologique atteint un Rf de 0,93 comparé à celui du pic maximum de la fibronectine normale (Rf = 0,50).

Ces résultats figurant dans le tableau V, précisent la modification du profil d'électrophorèse et suggèrent un changement comportemental (et d'affinité) de la fibronectine vis-à-vis de la lectine, donc une modification des glycanes de cette glycoprotéine.

Ces études préliminaires nous ont donc conduit à poursuivre nos investigations afin de vérifier si ces différences de migration sont bien dues à une différence de glycosylation - comme dans le cas de la fibronectine d'origine amniotique - et notamment, à une augmentation de l'antennarisation des glycanes.

C - ANALYSE DE LA CHARGE ELECTRIQUE DES FIBRONECTINES NORMALES ET PATHOLOGIQUES

Biou *et al.* (31) ont montré qu'il était possible de calculer le taux de désialylation d'une glycoprotéine par immunologie en effectuant

Tableau V - Calcul de la migration de la fibronectine en immunoélectrophorèse d'affinité bidimensionnelle sur du plasma normal (N) et cancéreux (P2).

Origine de la fibronectine	Rf de la migration maximale du profil d'électrophorèse	Rf de la migration du pic majeur
Plasma Normal (N)	0,80	0,50
Plasma Cancéreux (P2)	0,96	0,93



le rapport Rocket sur Mancini (R/M). Les glycoprotéines désialylées présentent un rapport plus faible, proportionnellement à leur taux de désialylation. Nous avons utilisé cette technique afin de vérifier l'hypothèse d'une éventuelle augmentation de la sialylation de la fibronectine provenant de plasmas pathologiques.

Pour calculer le rapport Rocket sur Mancini (R/M), nous avons préalablement établi une courbe étalon en utilisant des concentrations croissantes d'un plasma (Behring : Protein-Standard-Plasma, lot 04112 C) à 310 µg/ml de fibronectine. Les résultats obtenus sont représentés Fig.15.

Nous avons ensuite déterminé ce rapport R/M pour le plasma normal (N) et pour le plasma cancéreux présenté précédemment. Les résultats sont représentés dans le tableau VI.

Dans le cas de la fibronectine normale, ce rapport est égal à 1,21 et on passe à 1,50 pour la fibronectine pathologique. Cette augmentation du rapport R/M témoigne donc d'un accroissement du caractère acide de la fibronectine pathologique, pouvant provenir d'une augmentation de la sialylation des glycanes de cette glycoprotéine.

II - PURIFICATION DE LA FIBRONECTINE

La fibronectine a été purifiée à partir de plasmas et de cryoprécipité normaux et à partir de pools de plasmas d'individus cancéreux : P1 correspondant à des plasmas possédant un profil similaire à celui de la fibronectine plasmatique normale et P2 correspondant à des plasmas dont le comportement électrophorétique en présence de Con A est modifié.

A - PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

La fibronectine a été purifiée tout d'abord sur colonne de gélatine-Sepharose 4-B. Sur la Figure 16, nous pouvons observer la D.O. à 280 nm tout au long des étapes de purification, premier rinçage avec du P.B.S., second rinçage avec du NaCl 4 M, urée 1 M, enfin élution avec de

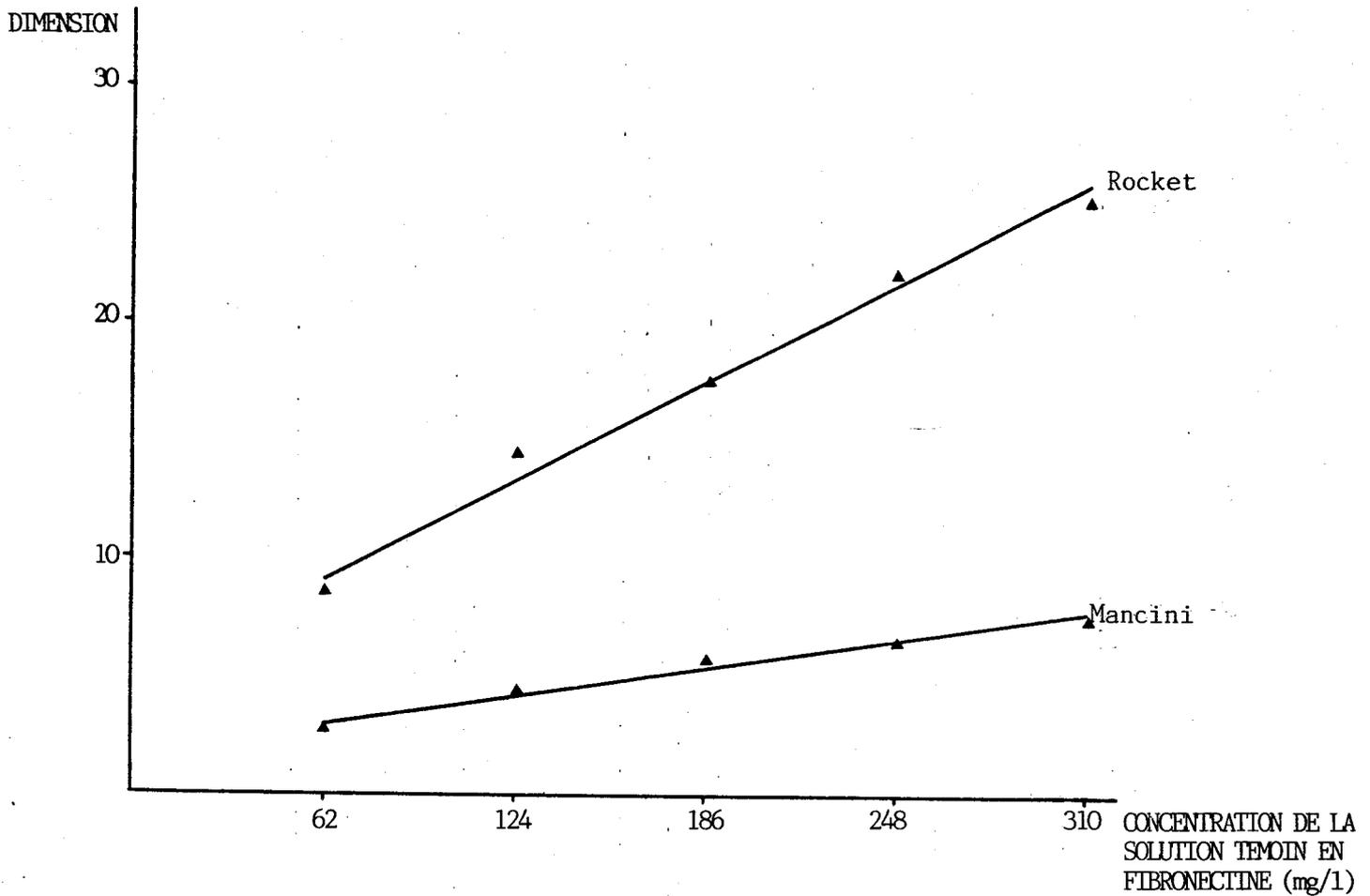


Figure 15 - Gammes étalon de la teneur en fibronectine réalisées à partir d'un plasma standard par dosage selon la méthode en Rocket et en Mancini.

Tableau VI - Teneur en fibronectine des plasmas (N) et (P2) par les techniques de dosage en Rocket et en Mancini.

Origine de la Fibronectine	Dosage en Rocket (R)	Dosage en Mancini (M)	Rapport (R/M)
Plasma Normal (N)	305 mg/l	251 mg/l	1,21
Plasma Cancéreux (P2)	289,5 mg/l	193 mg/l	1,50



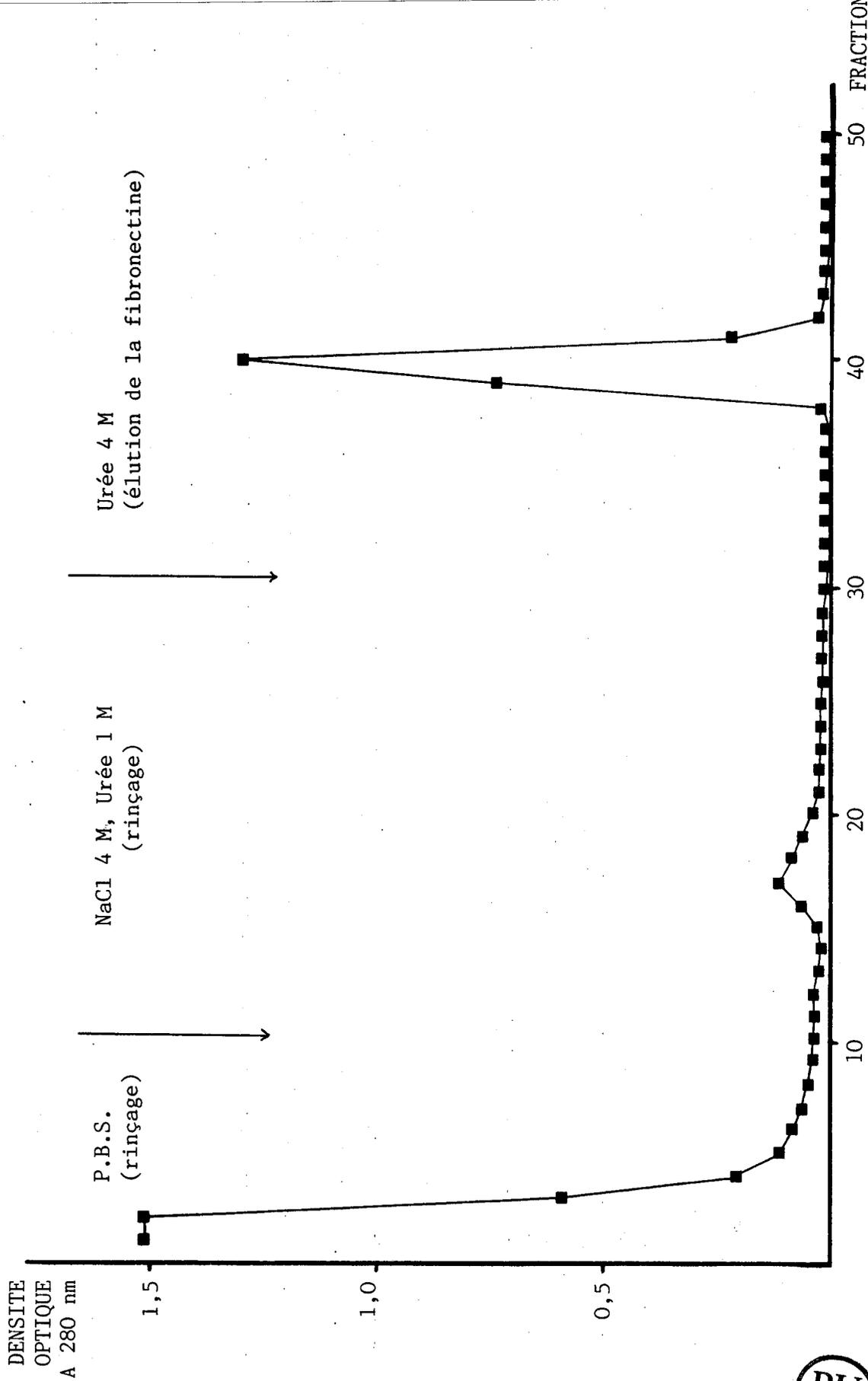


Figure 16 - Schéma de purification de la fibronectine plasmatique humaine sur colonne de gélatine-Sepharose 4-B, après l'injection du plasma sur la colonne celle-ci est rincée par du tampon puis la fibronectine est éluée par de l'Urée 4 M.

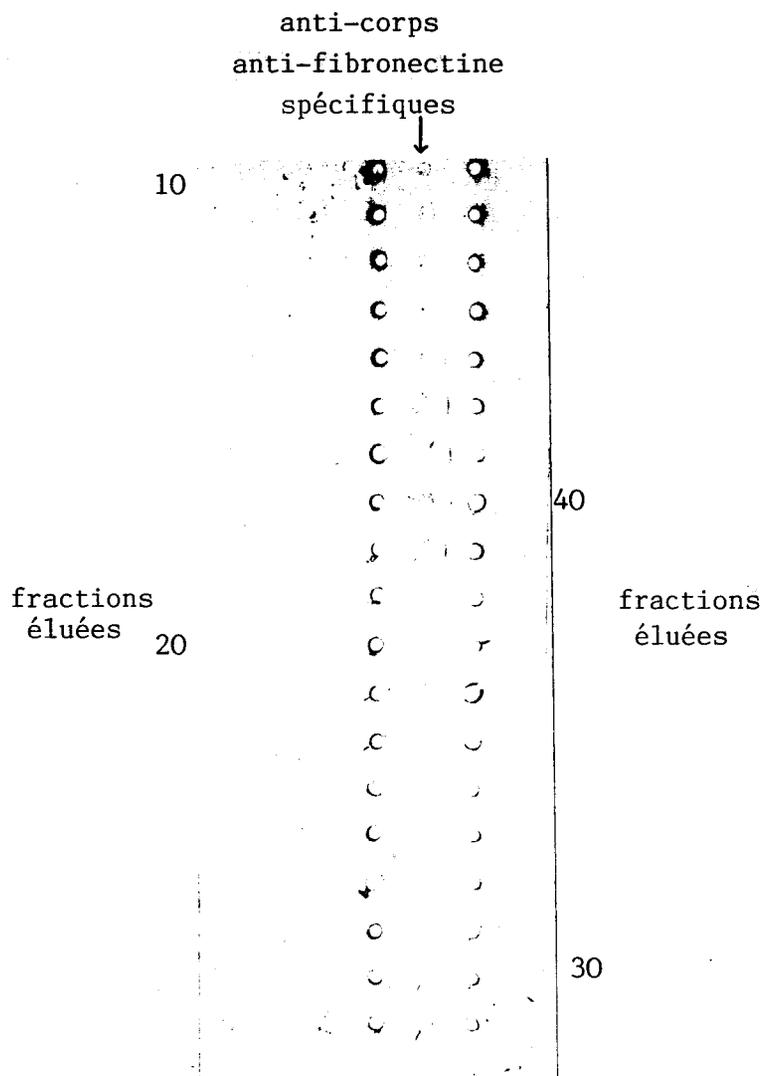


Figure 17 - Immunodiffusion des fractions recueillies après élution de la gélatine-Sepharose 4-B par l'urée 4 M, contre un anti-corps anti-fibronectine spécifique.

l'urée 4 M. Cette purification a également été suivie, tube par tube, par réaction contre des anti-corps anti-fibronectine spécifiques (Figure 17).

Cette étape est suffisante pour préparer la fibronectine à partir du cryoprécipité, mais elle doit être poursuivie lorsque la fibronectine doit être isolée du plasma total (normal ou pathologique).

B - PURIFICATION PAR TAMISAGE MOLECULAIRE

La première étape de purification par affinité a été suivie par un fractionnement en fonction de la masse moléculaire sur AcA-34 équilibrée dans du tampon P.B.S., urée 8 M. La fibronectine, en solution dans l'urée 4 M est ajustée à 8 M en urée, puis directement injectée sur la colonne d'AcA-34. La masse moléculaire importante de la fibronectine (440 KD) explique son élution au volume d'exclusion de la colonne (Fig.18). Cette étape de purification a également été suivie, tube par tube, par réaction immunologique contre des anti-corps anti-fibronectine spécifiques.

C - ETUDE DE LA PURETE DE LA FIBRONECTINE

La pureté de la fibronectine ainsi obtenue a été montrée par électrophorèse bidimensionnelle (Figure 19) ainsi que par électrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. (Figure 20).

La Figure 19 montre, après purification, un seul arc de précipitation de la fibronectine contre un anti-corps anti-plasma total. La Figure 20 montre une seule bande à une masse moléculaire de 220 KD, prouvant la pureté de la fibronectine obtenue à partir du plasma ou du cryoprécipité. Cette fibronectine purifiée a été utilisée pour l'analyse ultérieure des glycanes.

III- FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES OBTENUS PAR HYDRAZINOLYSE

Les glycanes obtenus à partir des fibronectines provenant de différentes sources (plasma humain normal et pathologique, cryoprécipité) ont été fractionnés en vue de déterminer leur structure.

DENSITE
OPTIQUE

A 280 nm

pic de fibronectine

1,2

1,0

0,8

0,6

0,4

0,2

83

10

20

30

40

50

60

FRACTIONS



Figure 18 - Schéma de purification de la fibronectine éluée de la gélatine, sur colonne d'ACA-34, la fibronectine pure est éluée de la colonne d'ACA-34 à son volume d'exclusion.



Figure 19 : Electrophorèse bidimensionnelle réalisée à l'aide de plasma total (Figure du haut) et de fibronectine purifiée (Figure du bas) contre des anti-corps anti-plasma total.

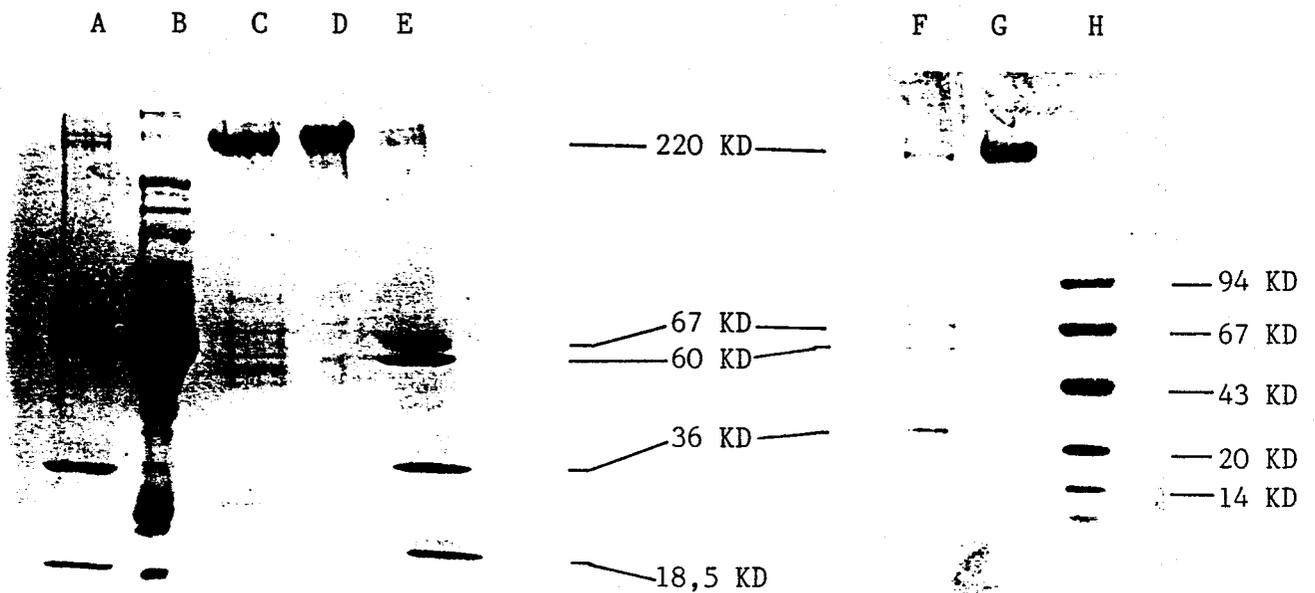


Figure 20 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide S.D.S. de fibronectine purifiée à partir de plasma total (Figure de gauche) et de cryoprécipité (Figure de droite).

A,E,F : Témoins de haute Masse Moléculaire

B : Plasma total

C : Pic de fibronectine partiellement purifiée après élution d'une colonne de gélatine - Sepharose 4-B

D : Fibronectine pure après passage sur colonne Aca 34

G : Fibronectine pure provenant de cryoprécipité après élution d'une colonne de gélatine - Sepharose 4-B

H : Témoins de faible Masse Moléculaire

A - FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR CON A

Après l'hydrazinolyse, les glycanes des fibronectines isolées de plasmas normaux et cancéreux ont été fractionnés sur colonne de Con A-Sepharose 4-B. Le fractionnement est représenté Figure 21 (N et P2) et Figure 22 (L et P1).

La spécificité de cette lectine (59) nous a permis d'obtenir deux fractions distinctes dont les pourcentages sont donnés dans le Tableau VII.

Une première fraction non retenue dans la colonne (FNRC) est éluée par le tampon au volume mort de la colonne. Elle correspond à des glycanes de type N-acétyl-lactosaminique de structure tri- et tétraantennée. L'éluion de la colonne par l' α -M.Glc 10 mM permet d'obtenir une seconde fraction (FEC 10 mM) constituée des glycanes de type N-acétyl-lactosaminique de structure biantennée. 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 la retrouve dans la fraction non retenue. Enfin, l'éluion par l' α -M.Glc 0,3 M permet dans certains cas (P1) de recueillir une troisième fraction (FEC 0,3 M), possédant une forte affinité vis-à-vis de la Con A et regroupant les glycanes de type oligomannosidique.

Dans le cas de la fibronectine normale, la fraction majeure est éluée par l' α -M.Glc 10 mM (FEC 10 mM) et correspond donc à des glycanes de structure biantennée. Cette fraction représente 77,5% de la radioactivité totale. Ce résultat est en accord avec ceux de Fischer et Laine (71) qui ont montré que la fraction glycanique majeure de la fibronectine était de structure biantennée. Ils ont également montré qu'il existait une fraction non retenue sur Con A, qu'ils supposaient constituée de structures tri- et tétraantennées.

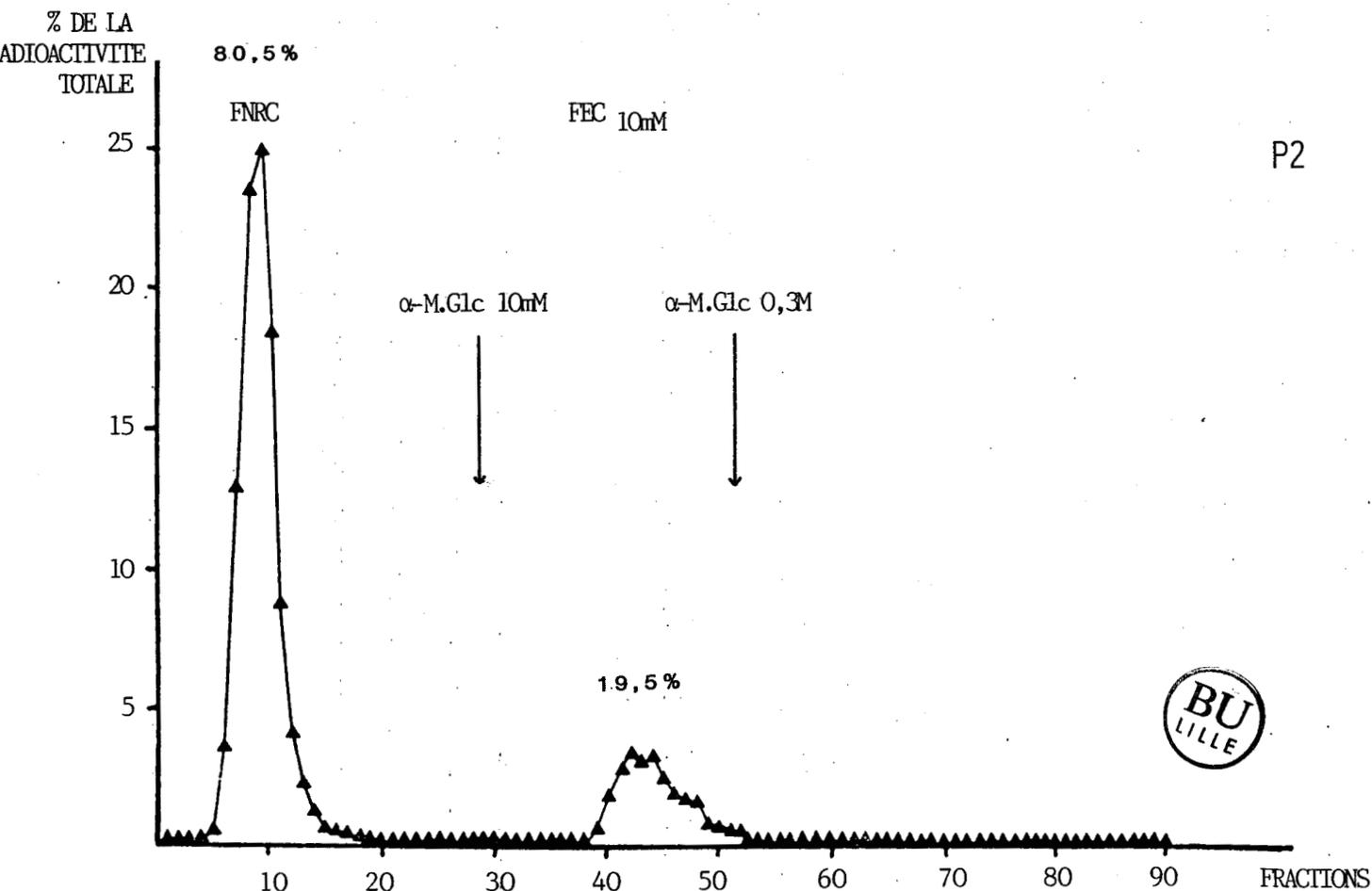
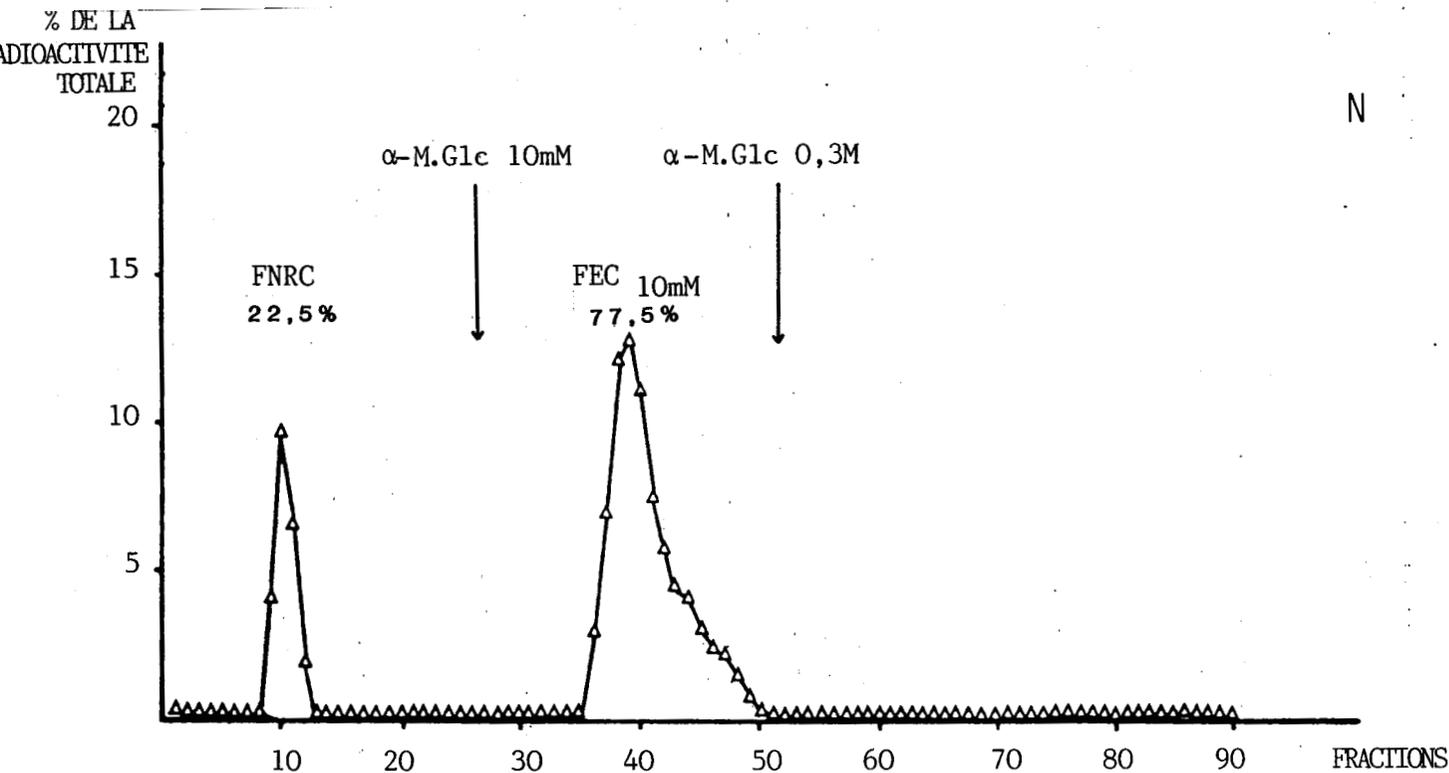
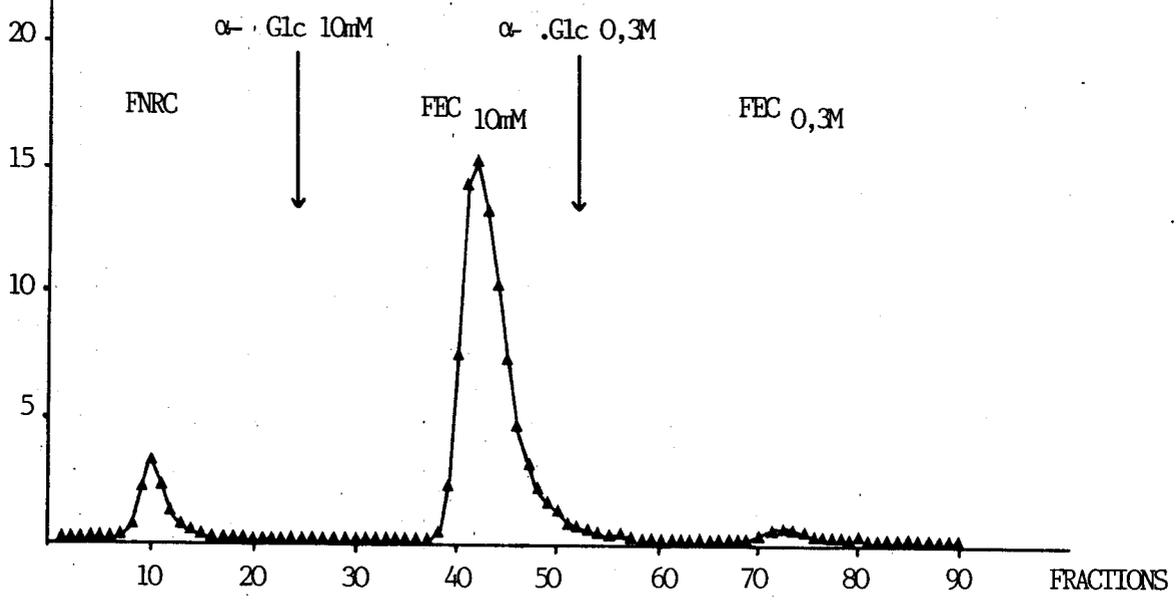


Figure 21 - Fractionnement des glycanes de la fibronectine normale (N) (figure du haut) et pathologique (P2) (Figure du bas). Les glycanes des fibronectines normales et pathologiques ont été fractionnés sur colonne de Con A-Sepharose équilibrée en tampon Acétate, après rinçage par le tampon, la fraction biantennée est éluée par l' α -M.Glc 10 mM, puis la fraction oligomannosidique est éluée par l' α -M.Glc 0,3 M.

% DE LA
RADIOACTIVITE
TOTALE

P1



% DE LA
RADIOACTIVITE
TOTALE

L

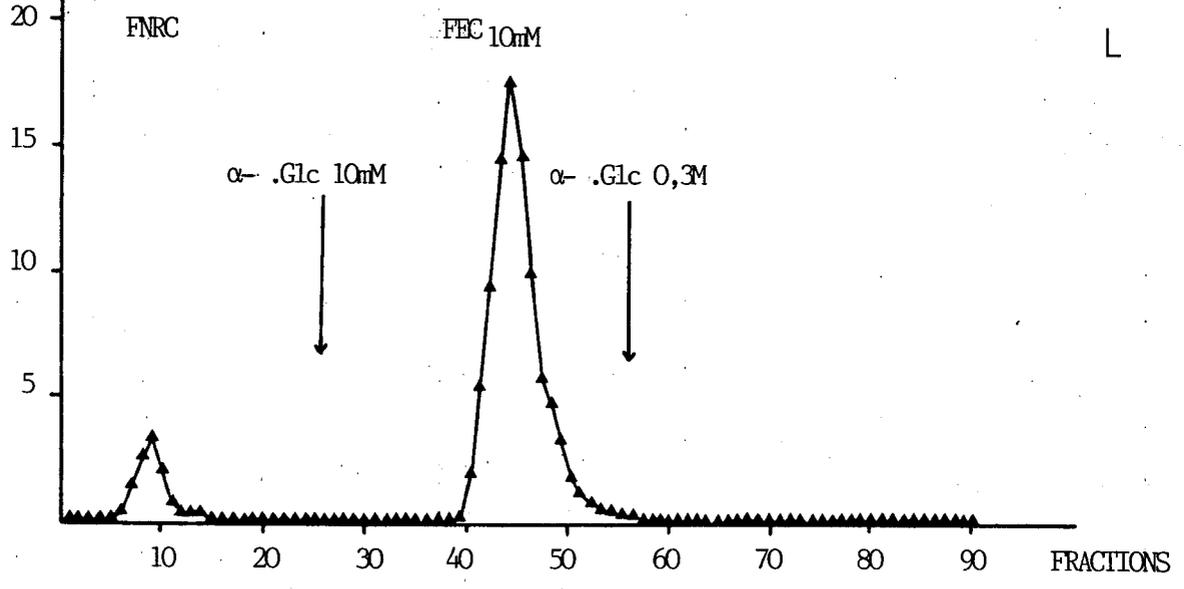


Figure 22 - Fractionnement des glycanes de la fibronectine pathologique (P1) (Figure du haut) et de la fibronectine de leucémiques (L) (Figure du bas) sur colonne de Con A-Sepharose 4-B. Les conditions expérimentales sont indiquées Figure 21 p. 87.

Tableau VII : Rapport de chacune des fractions FNRC et FEC 10 mM chez les individus sains et les patients cancéreux.

Origine de la Fibronectine	FNRC	FEC 10 mM
Plasma Normal (N)	22,5 %	77,5 %
Plasma Leucémique (L)	10,2 %	89,8 %
Plasma Cancéreux (P1)	12,7 %	87,3 %
Plasma Cancéreux (P2)	80,5 %	19,5 %



Cette fraction (FEC 10 mM) est également majeure dans le cas de la fibronectine provenant d'individus leucémiques (L) (89,8%), ainsi que dans le cas de la fibronectine provenant du lot de plasma (P1) (87,3%) ne présentant pas de modification du profil électrophorétique en présence de Con A. Ces résultats proches de ceux obtenus avec du plasma normal (N) confirment notre étude préliminaire montrant une forte affinité de ces fibronectines pour la Con A.

Par contre, l'analyse des glycanes de la fibronectine du plasma pathologique (P2) ayant donné les résultats les plus significatifs en électrophorèse d'immuno affinité, montre une très nette diminution de la fraction FEC 10 mM qui ne représente plus alors que 19,5% de la radioactivité totale. Ces résultats révèlent une diminution des structures biantennées de la fibronectine dans certains cas pathologiques. Toutefois, l'extension de ces résultats à l'ensemble des cas pathologiques cancéreux ne peut être généralisée.

Inversement, la fraction non retenue (FNRC), qui correspond à des glycanes tri- et tétraantennés, et qui dans le cas de la fibronectine normale est une fraction mineure (22,5% de la radioactivité totale), représente alors 80,5% de la radioactivité totale des glycanes provenant de la fibronectine du plasma (P2).

En outre, ce fractionnement sur Con A-Sepharose 4-B nous a permis d'obtenir, dans le cas du plasma (P1), une fraction mineure. Cette fraction, éluée par l' α -M.Glc 0,3 M (FEC 0,3 M) est caractéristique du plasma (P1), elle ne se retrouve en effet dans aucun autre cas, pathologique ou non. Toutefois, sa très faible proportion (1,8% de la radioactivité totale) étant un facteur limitant, son étude structurale n'a pu être poursuivie.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par électrophorèse d'immuno affinité. En effet, lorsque la fibronectine présente alors la plus faible migration, nous avons montré que la majeure partie des glycanes de cette glycoprotéine est de structure biantennée.

A l'opposé, lorsque par cette technique immunologique nous observons une migration plus importante de la fibronectine, nous avons montré parallèlement que la majeure partie des glycanes de cette glycoprotéine est de structure tri- ou tétraantennée.

Dans chacun des cas, la migration relative de la fibronectine en électrophorèse d'immuno affinité est corrélée avec sa composition en glycanes.

B - FRACTIONNEMENT PAR H.P.L.C. D'ECHANGE D'IONS

Les glycanes de type N- acétyl-lactosaminique obtenus par hydrazinolyse, N-réacétylation et réduction à partir de la fibronectine provenant de plasma normal (N) et de plasma cancéreux (P2) ont été fractionnés en fonction de leur charge par H.P.L.C. d'échange d'ions sur colonne de Micropak AX-10.

Quatre familles de glycanes ont été obtenues et identifiées en fonction du nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique : neutres, mono-, di- et trisialylés respectivement.

Les fractions glycaniques ont été analysées en fonction de leur affinité pour la Con A. Les fractions biantennées éluées de la lectine (FEC 10 mM) provenant de (N) et (P2) sont représentées sur la figure 23. Les pourcentages de chacun des pics en fonction de la radioactivité totale sont regroupés dans le Tableau VIII.

Ce tableau nous montre un taux de sialylation identique pour cette fraction FEC 10 mM qu'elle provienne de fibronectine normale (N)

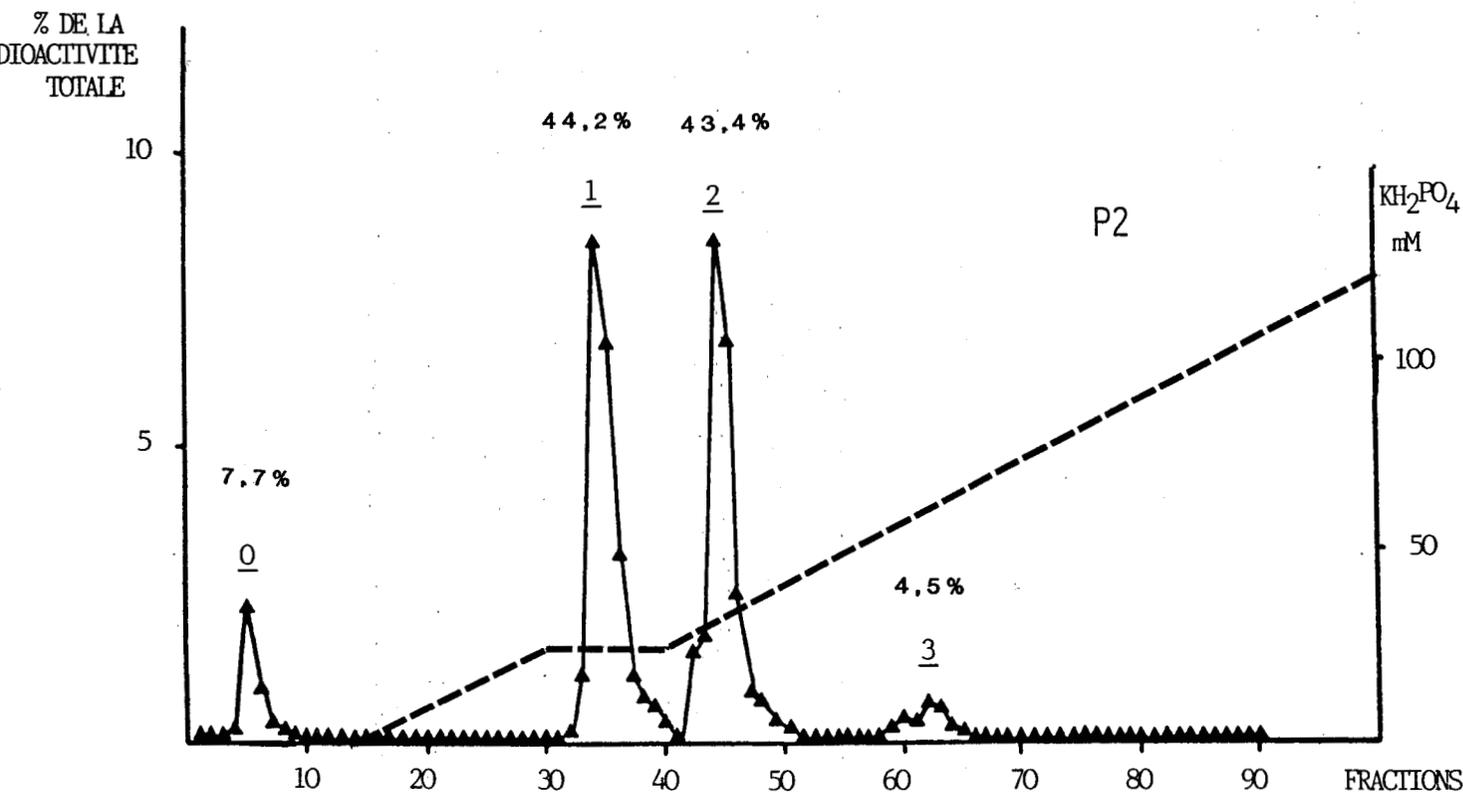
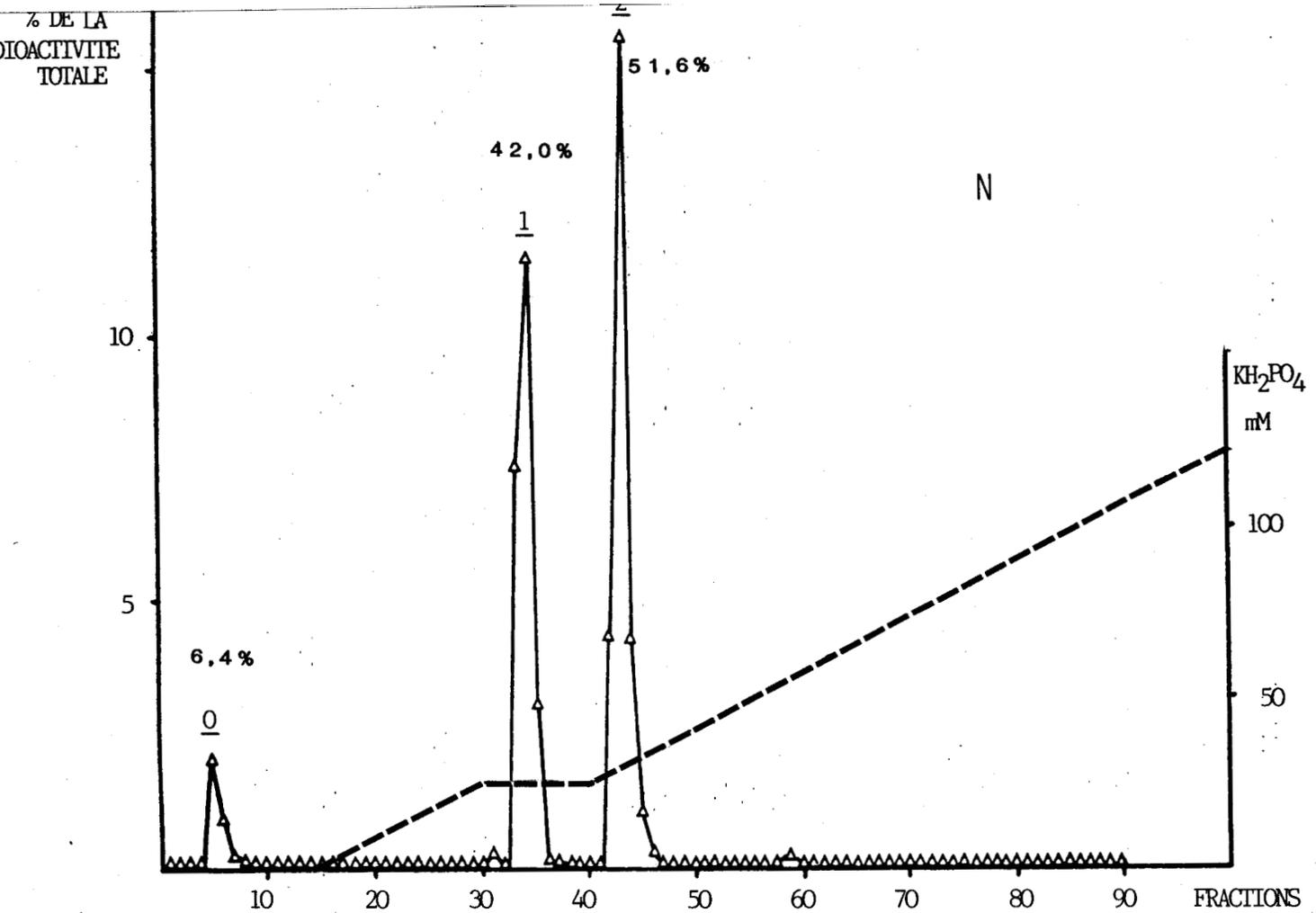


Figure 23 - Fractionnement des glycanes biantennés de la fibronectine normale (N) (Figure du haut) et pathologique (P2) (Figure du bas) en fonction du nombre de résidus d'Acide N-Acétyleuraminique.



Tableau VIII - Pourcentage de la radioactivité totale des familles des glycanes (FEC_{10mM}) obtenues par H.P.L.C. d'échange d'ions (0-3, neutre, mono-, di- et trisialylés respectivement).

Nombre de résidus d'Acide N-Acétyl- neuraminique	Pourcentage de la radioactivité totale de chaque pic	
	Plasma Normal (N)	Plasma Cancéreux (P2)
0	6,40	7,70
1	42,00	44,20
2	51,60	43,40
3	0	4,5



ou pathologique (P2).

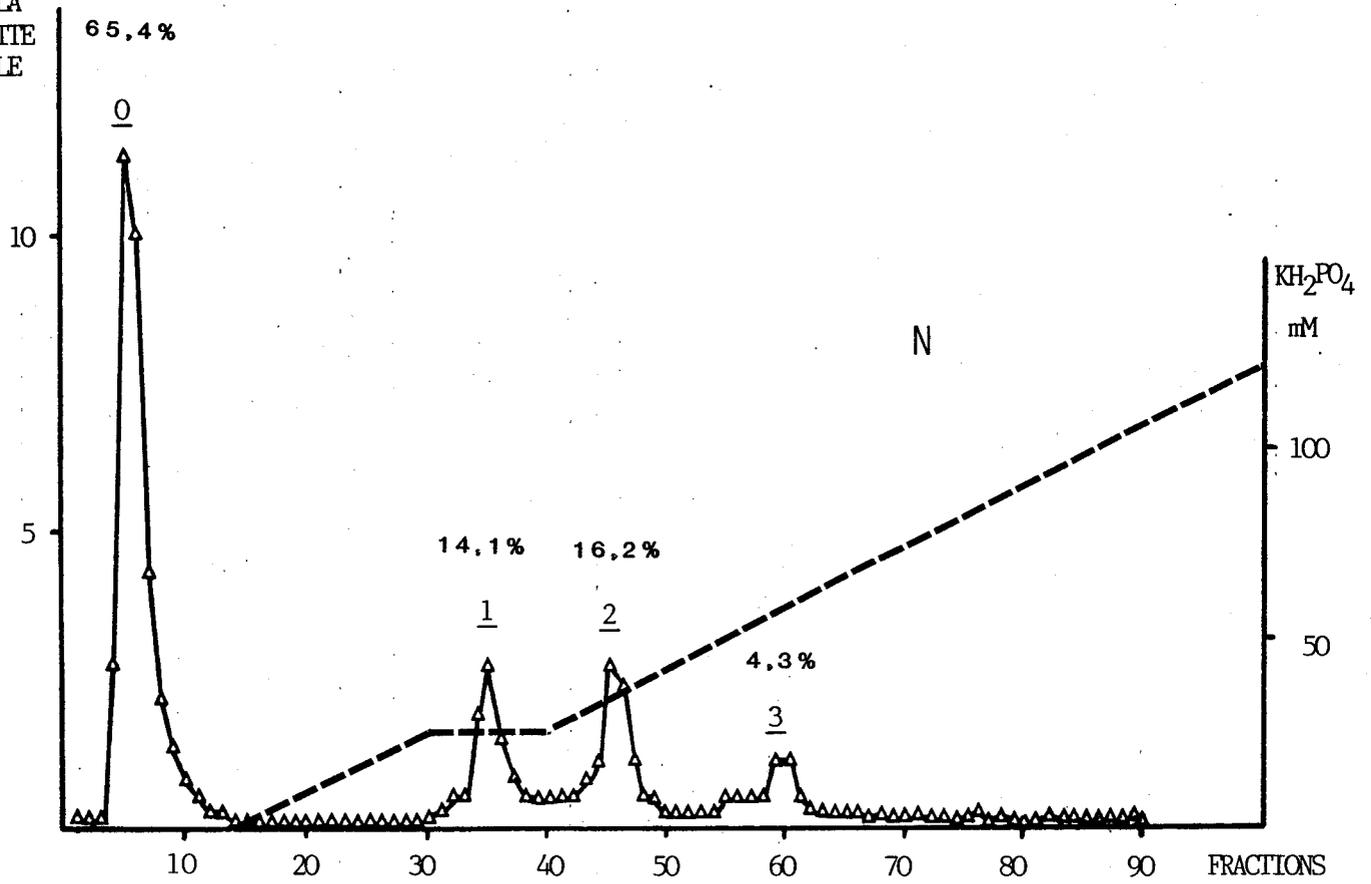
Il convient de noter que la fraction (P2) présente une classe de glycannes éluée comme la fraction trisialylée de l'orosomucoïde. Ces glycannes ne représentent toutefois qu'un faible pourcentage de la radioactivité totale (4,5%) et n'ont pu faire l'objet d'une étude structurale.

L'analyse des fractions non retenues sur la colonne de lectine (FNRC) et provenant de (N) et (P2) est représentée sur la Figure 24. Les pourcentages de chacun des pics en fonction de la radioactivité totale sont regroupés sur le Tableau IX.

Ce Tableau nous montre une très nette augmentation de la sialylation de cette fraction (FNRC) pour le plasma pathologique (P2). En effet, chacun des pics de glycannes mono-, di- et trisialylés est plus important que dans le cas des glycannes de fibronectine provenant d'individus sains.

Nous avons émis l'hypothèse d'une augmentation de la sialylation des glycannes de la fibronectine du plasma pathologique (P2) en étudiant le rapport R/M. Or, le fractionnement des glycannes de cette glycoprotéine, nous a permis de vérifier cette hypothèse. L'augmentation du rapport R/M chez la fibronectine provenant du plasma cancéreux (P2) par rapport à la fibronectine du plasma normal (N) est probablement due à cette augmentation du nombre de résidus d'Acide N-Acétylneuraminique présents sur chaque glycanne.

% DE LA
RADIOACTIVITE
TOTALE



% DE LA
RADIOACTIVITE
TOTALE

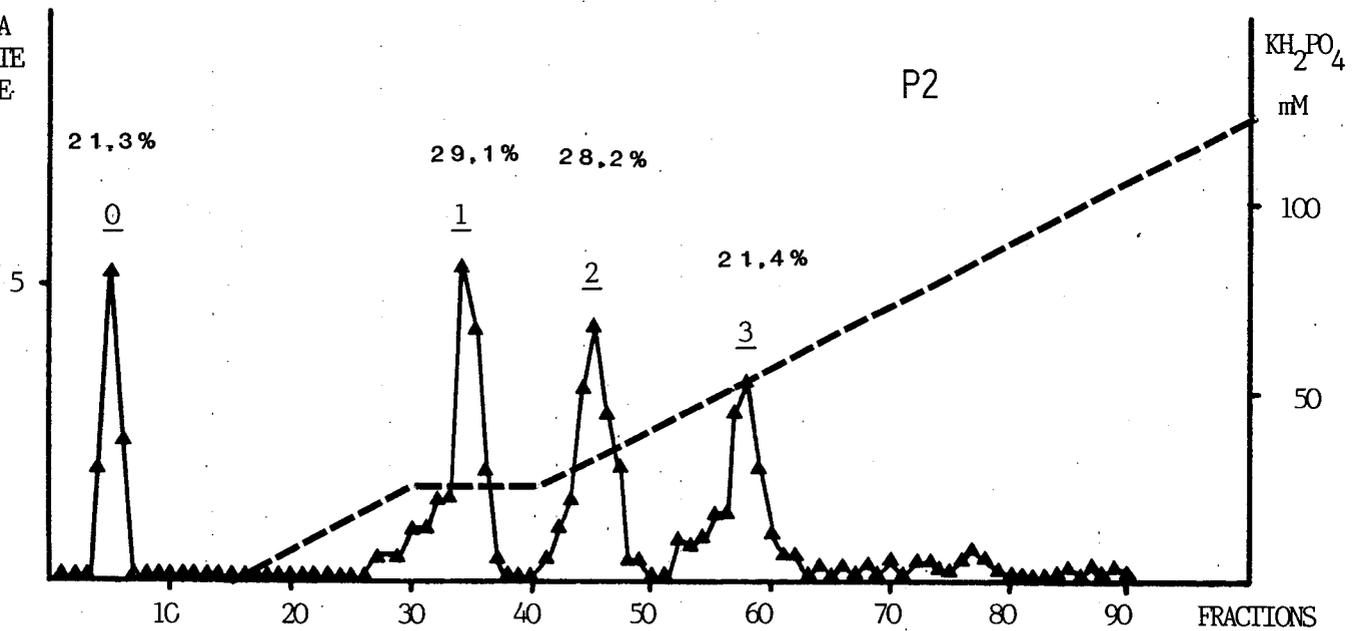


Figure 24 - Fractionnement des glycanes triantennés de la fibronectine normale (N) (Figure du haut) et pathologique (P2) (Figure du bas) en fonction du nombre de résidus d'Acide N-Acétylneuraminique.



Tableau IX - Pourcentage de la radioactivité totale des familles des glycanes (FNRC) obtenues par H.P.L.C. d'échange d'ions (0-3, neutre, mono-, di- et trisialylés respectivement).

: Nombre de résidus : d'Acide N-Acétyl- : neuraminique	: Pourcentage de la radioactivité totale de : chaque pic	
	: Plasma Normal : (N)	: Plasma Cancéreux : (P2)
: 0	: 65,40	: 21,30
: 1	: 14,10	: 29,10
: 2	: 16,20	: 28,20
: 3	: 4,30	: 21,40



IV - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE

Les glycanes isolés de la fibronectine ont été analysés en fonction de leur affinité pour la ConA. La structure des deux fractions ainsi séparées (FEC 10mM ou FNRC) a été déterminée par l'application des procédés de méthanolyse, de méthylation et de spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire.

A - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA FRACTION FEC 10mM

Cette fraction glycanique est la plus importante chez la fibronectine plasmatique humaine, elle comprend en effet environ 80% des glycanes chez les individus normaux. Les rapports molaires de cette fraction furent d'ailleurs donnés les premiers par plusieurs auteurs (23, 71, 124,154,201,244,286,318,333).

Les rapports molaires des monosaccharides, déterminés par chromatographie en phase gazeuse, sont indiqués dans le Tableau X.

Les valeurs obtenues exprimées sur la base de trois résidus de mannose suggèrent que cette fraction serait composée d'un glycanne biantenné sialylé et non fucosylé.

Les dérivés méthylés des monosaccharides ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Le diagramme obtenu est présenté dans la Figure 26. Les rapports molaires de ces différents dérivés sont donnés dans le Tableau XI.

La présence du dérivé 2,3,4,6 tétra-O-méthyl,1 acétyl galactose fait apparaître une désialylation partielle des glycanes analysés. Ceci est confirmé par le fait que nous obtenons 1,2 résidus de 4,7,8,9 tétra-O-méthyl,2 acétyl acide N-Acétylneuraminique. Une valeur de 1,6 avait été obtenue après méthanolyse.

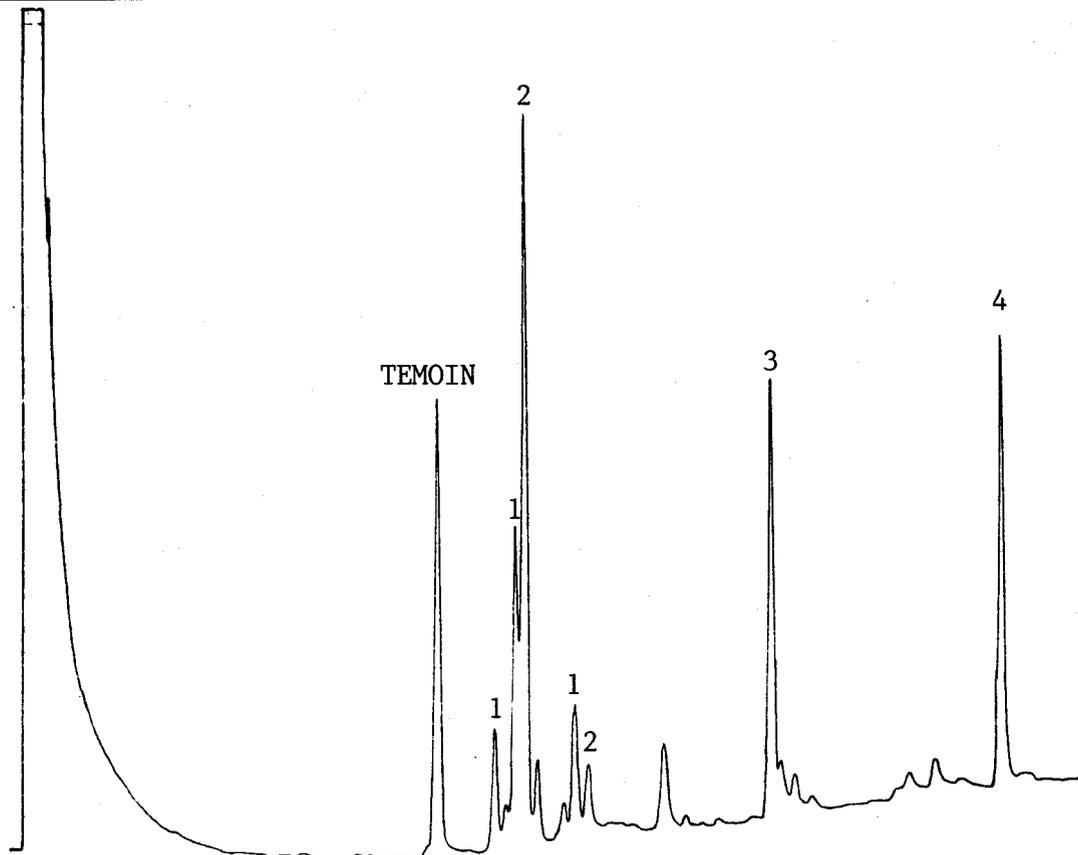


Figure 25 - Séparation des résidus méthanolisés de la fraction FEC de la fibronectine plasmatique normale par chromatographie en phase gazeuse. L'identification et les rapports molaires des résidus méthanolisés sont donnés dans le Tableau ci-dessous.

Tableau X - Identification et détermination des rapports molaires des résidus méthanolisés de la fraction FEC de la fibronectine plasmatique normale. les calculs ont été réalisés sur la base de 3 résidus de mannose.

Dérivés méthanolisés	Rapports molaires
pic 1: Galactose	2,3
pic 2: Mannose	3
pic 3: N-Acétyl glucosamine	4,2
pic 4: Acide N-acétylneuraminique	1,6



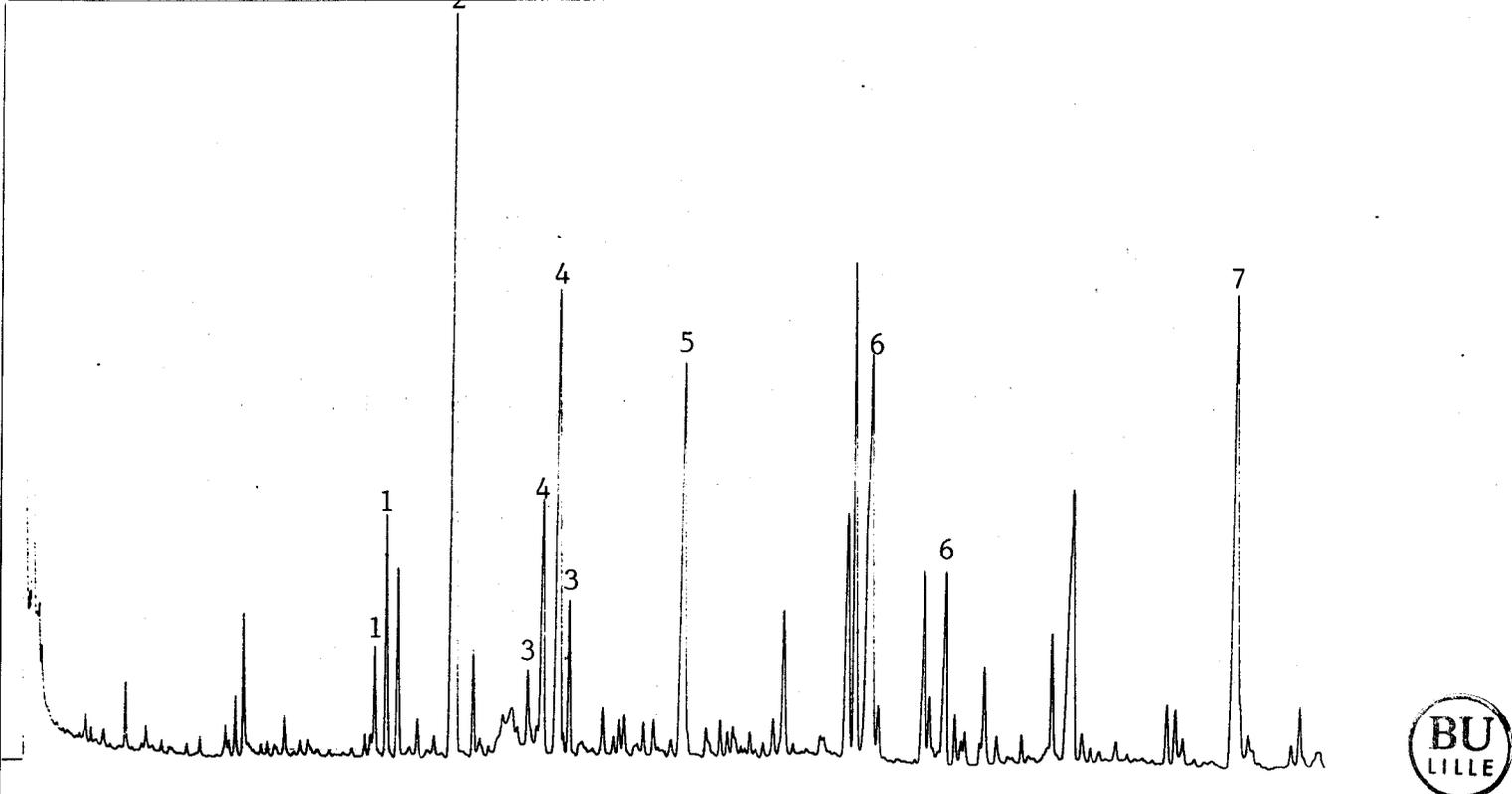


Figure 26 - Séparation des dérivés méthylés de la fraction FEC de la fibronectine plasmatique normale par chromatographie en phase gazeuse. L'identification et les rapports molaires des dérivés méthylés sont donnés dans le Tableau ci-dessous.

Tableau XI- Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés de la fraction FEC de la fibronectine plasmatique normale. Les calculs ont été réalisés sur la base d'un résidu de 2,4-di-O-méthyl 1,3,6 triacétyl mannose.

Dérivés méthylés	Rapports molaires
pic 1: 2,3,4,6 tétra-O-méthyl,1 acétyl galactose	0,8
pic 2: 3,4,6 tri-O-méthyl,1,2 diacétyl mannose	1,9
pic 3: 2,4,6 tri-O-méthyl,1,3 diacétyl galactose	0,4
pic 4: 2,3,4 tri-O-méthyl,1,6 diacétyl galactose	1,8
pic 5: 2,4 di-O-méthyl,1,3,6 triacétyl mannose	1
pic 6: 3,6 di-O-méthyl,2,4 diacétyl glucosamine	1,5
pic 7: 4,7,8,9 tétra-O-méthyl,2 acétyl acide N-acétyl neuraminique	1,2

La présence de 3,4,6 tri-O-méthyl,1,2 diacétyl mannose en quantité 2 fois plus importante que le 2,4 di-O-méthyl,1,3,6 triacétyl mannose indique que nous sommes en présence d'un glycanne biantenné. L'absence de 3,4 di-O-méthyl,1,2,6 triacétyl mannose et de 3,6 di-O-méthyl,1,2,4 triacétyl mannose confirme l'absence de structure triantennée. De même, toutes les études ont montré l'absence de résidu de fucose.

L'analyse du spectre de Résonance Magnétique Nucléaire du proton des oligosaccharides-alditols obtenus par hydrazinolyse de la fibronectine humaine montre qu'il s'agit d'un mélange de sialyl-oligosaccharides biantennés. Leurs structures primaires ont été établies sur la base des observations suivantes (tableau XII et figure 27).

1 - L'analyse des signaux relatifs aux protons H-3ax et H-3eq de l'acide N-Acétylneuraminique montre l'existence unique de liaisons α 2-6 ($\delta = 1.718$ ppm et $\delta = 2.668$ ppm).

2 - La structure biantennée des chaînes glycaniques est déduite des glissements chimiques des protons H₂ des résidus de mannose 3,4 et 4' ($\delta = 4.25$, 4.19 et 4.12 ppm).

3 - Le pourcentage de chacun des constituants est donné par les intensités des signaux relatifs aux protons H₁ des mannoses 4 et 4'. La substitution du galactose 6 par un résidu d'Acide N-Acétyl neuraminique (α 2-6) conduit à la valeur $\delta = 5.132$ ppm pour H₁ du mannose 4, alors que pour le galactose 6 terminal, le proton H₁ du mannose 4 est déplacé à $\delta = 5.120$ ppm.

De plus la substitution du Galactose 6' par un résidu d'Acide N-Acétyl neuraminique (α 2-6) conduit à la valeur $\delta = 4.941$ ppm pour H₁ du mannose 4', alors que pour la branche asialo du mannose 4' possède la valeur $\delta = 4.926$ ppm.

4 - L'analyse de la région où résonnent les protons anomériques des

Protons anomériques

Protons H-2

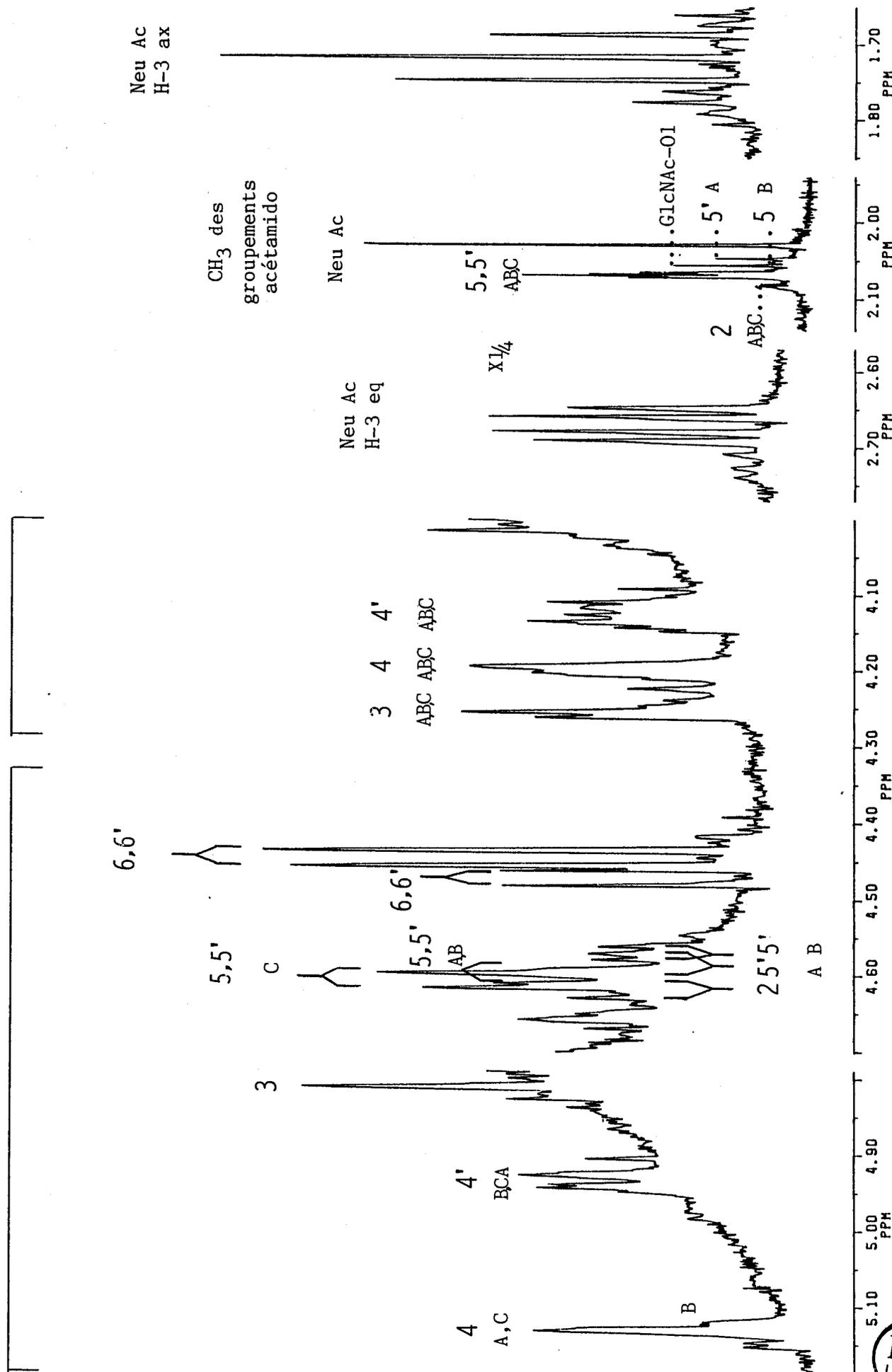
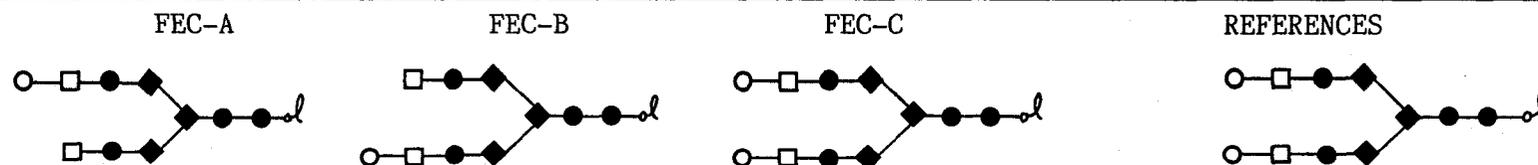


Figure 27 : Spectre de R.M.N. à 400 Mhz des oligosaccharides-aldoitols FEC-A, FEC-B, FEC-C.

TABLEAU XII

GLISSEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS REPRESENTATIFS DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES OLIGOSACCHARIDES-ALDITOLS FEC-A, FEC-B et FEC-C
DETACHES DE LA FIBRONECTINE HUMAINE PAR HYDRAZINOLYSE

COMPOSE ET STRUCTURE SIMPLIFIEE



		FEC-A	FEC-B	FEC-C	REFERENCES	
H ₁	GlcNAc 2	4.620	4.620	4.620	4.613	4.68
	Man 3	4.811	4.811	4.811	4.77	n.d. (a)
	Man 4	5.132	5.120	5.132	5.136	5.132
	Man 4'	4.926	4.941	4.941	4.943	4.946
	GlcNAc 5	4.601	4.570 (b)	4.606	4.60	4.603
	GlcNAc 5'	4.581 (b)	4.601	4.606	4.60	4.603
	Gal 6	4.445	4.470	4.445	4.440	4.443
	Gal 6'	4.470	4.445	4.445	4.440	4.443
H ₂	Man 3	4.254	4.254	4.260	4.260	4.256
	Man 4	4.194	4.194	4.197	4.197	4.198
	Man 4'	4.121	4.121	4.121	4.121	4.116
H ₃	NeuAc(α2-6)	1.718	-	1.718	1.719	1.718
	NeuAc'(α2-6)	-	1.718	1.718	1.719	1.718
H _{3eq}	NeuAc(α2-6)	2.668	-	2.668	2.663	2.672
	NeuAc'(α2-6)	-	2.668	2.668	2.663	2.672
Nac	GlcNAc-ol	2.056	2.056	2.056	n.d. (a)	2.056
	GlcNAc 2	2.079	2.079	2.082	2.078	2.082
	GlcNAc 5	2.069	2.051	2.069	2.064	2.071
	GlcNAc 5'	2.047	2.067	2.065	2.064	2.065
	NeuAc	2.030	2.030	2.030	2.026	2.030

(a) n.d. : non déterminé

(b) : Les valeurs peuvent être échangées

○, acide N-acétylneuraminique (α2-6); □ galactose; ● N-acétylglucosamine; ◆ Mannose;
●-ol : N-acétylglucosaminitol

B - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA FRACTION FNRC

Cette fraction mineure dans le cas de la fibronectine plasmatique normale n'a été jusqu'à présent que très peu étudiée. En effet, elle ne représente qu'environ 20% des glycanes totaux. Par contre, elle constitue l'essentiel (80%) de la fraction glucidique de la fibronectine du plasma (P2).

La ConA, en effet, ne reconnaît pas les fractions les plus lourdes, comprenant les structures tri- et tétraantennées ainsi que les biantennées avec une osamine intercalaire.

Les rapports molaires de monosaccharides, déterminés par chromatographie en phase gazeuse, sont indiqués dans le Tableau XIII.

Les valeurs obtenues exprimées sur la base de trois résidus de mannose suggèrent que cette fraction serait composée d'un glycanne tri-antenné sialylé et non fucosylé.

Les dérivés méthylés des monosaccharides ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Le diagramme obtenu est présenté dans la Figure 29. Les rapports molaires de ces différents dérivés sont donnés dans le Tableau XIV.

La présence du dérivé 2,3,4,6 tétra-O-méthyl, 1 acétyl galactose révèle une désialylation partielle des glycanes analysés. Ceci se confirme par le fait que nous n'obtenons que 2,2 résidus de 4,7,8,9 tétra-O-méthyl, 2 acétyl acide N-acétyl neuraminique. La méthanolyse indique exactement la même valeur.

Les rapports molaires des dérivés 3,6 di-O-méthyl, 1,2,4 triacétyl mannose, 3,4 di-O-méthyl, 1,2,6 triacétyl mannose et 3,4,6 tri-O-méthyl, 1,2 diacétyl mannose comparés à celui du dérivé 2,4 di-O-méthyl, 1,3,6 triacétyl mannose pris comme base de calcul indiquent que le glycanne de la fraction FNRC est de structure triantennée. Nous obtenons des rapports de 0,9

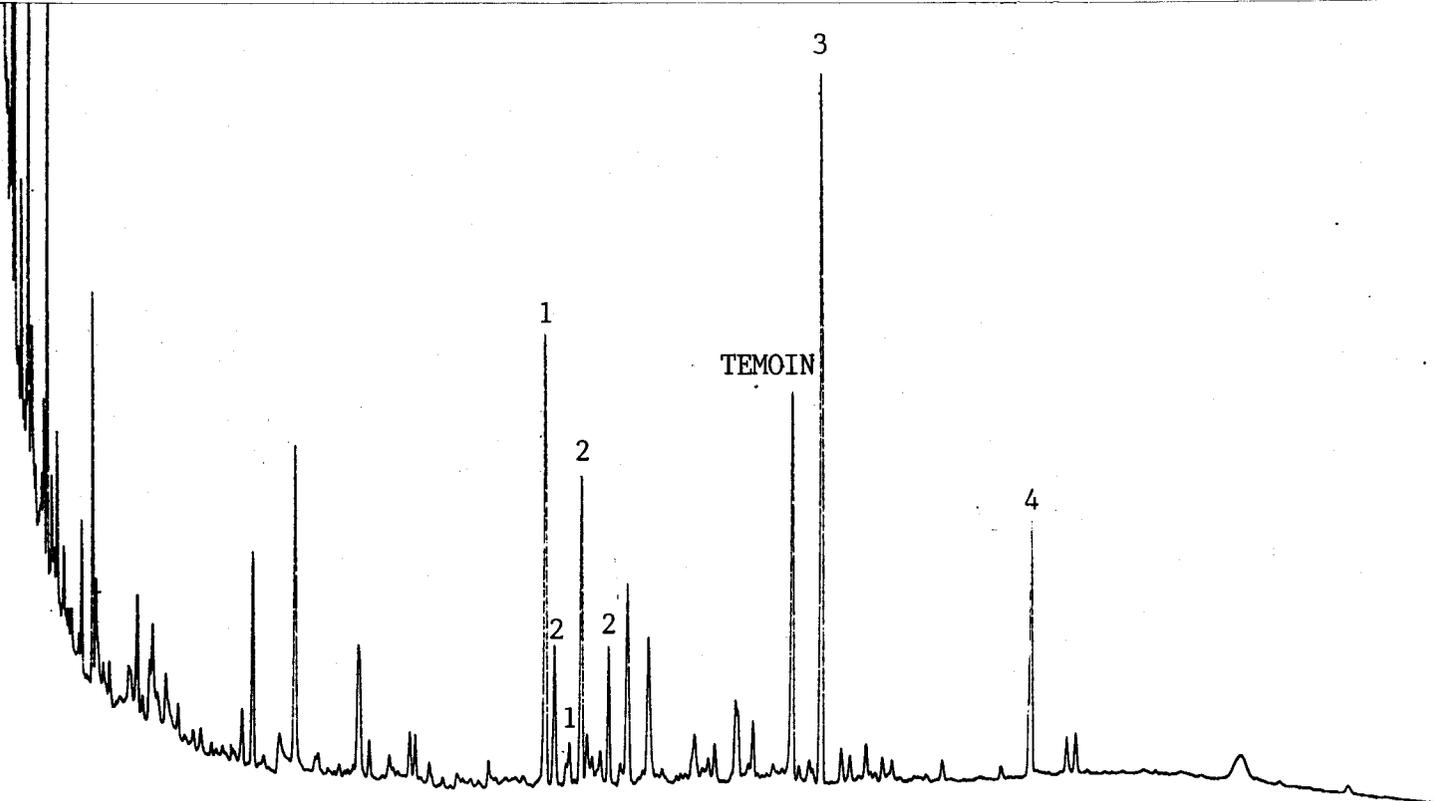


Figure 28 : Séparation des résidus méthanolisés de la fraction FNRC par chromatographie en phase gazeuse. L'identification et les rapports molaires des résidus méthanolisés sont donnés dans le Tableau ci-dessous.

Tableau XIII: Identification et détermination des rapports molaires des résidus méthanolisés de la fraction FNRC. Les calculs ont été réalisés sur la base de 3 résidus de mannose.

Dérivés méthanolisés	Rapports molaires
Pic 1: Mannose	3
Pic 2: Galactose	3,5
Pic 3: N-Acétyl glucosamine	5,0
Pic 4: Acide N-acétylneuraminique	2,2



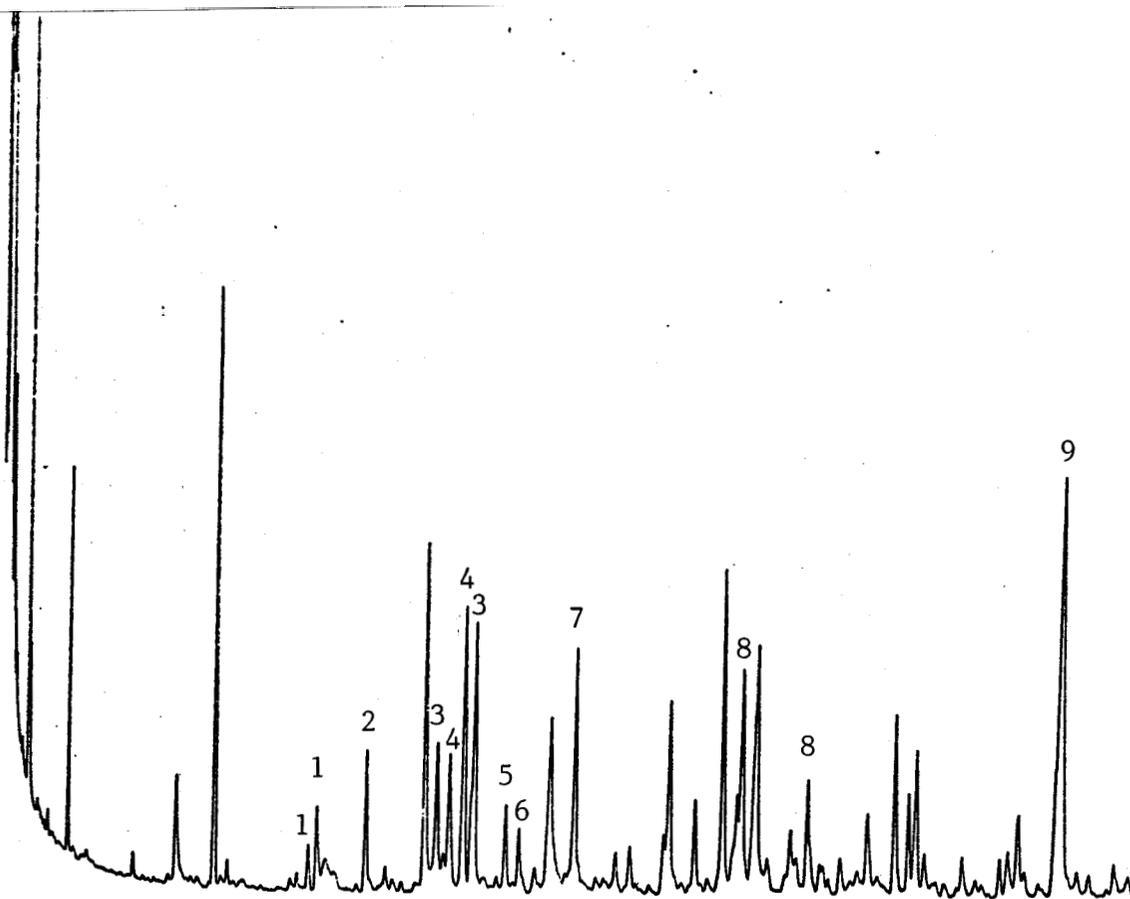


Figure 29 : Séparation des dérivés méthylés de la fraction FNRC par chromatographie en phase gazeuse. L'identification et les rapports molaires des dérivés méthylés sont donnés dans le Tableau ci-dessous.

Tableau XIV : Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés de la fraction FNRC. Les calculs ont été réalisés sur la base d'un résidu 2,4 di-O-méthyl 1,3,6 triacétyl mannose.

Dérivés méthylés	Rapports molaires
pic 1: 2,3,4,6 tétra-O-méthyl,1 acétyl galactose	0,8
pic 2: 3,4,6 tri-O-méthyl,1,2 diacétyl mannose	1,2
pic 3: 2,4,6 tri-O-méthyl,1,3 diacétyl galactose	1,1
pic 4: 2,3,4 tri-O-méthyl,1,6 diacétyl galactose	2,0
pic 5: 3,6 di-O-méthyl,1,2,4 triacétyl mannose	0,5
pic 6: 3,4 di-O-méthyl,1,2,6 triacétyl mannose	0,4
pic 7: 2,4 di-O-méthyl,1,3,6 triacétyl mannose	1
pic 8: 3,6 di-O-méthyl,2,4 diacétyl glucosamine	1,9
pic 9: 4,7,8,9 tétra-O-méthyl,2 acétyl acide N-acétyl neuraminique	2,2

DISCUSSION ET CONCLUSION

La transformation maligne des cellules se traduit par de profonds changements de leur métabolisme. En particulier, apparaissent d'importantes modifications des glycannes des glycolipides et des glycoprotéines membranaires. Ces modifications, antérieurement caractérisées par la microscopie électronique, ont été récemment confirmées et définies. Les travaux effectués dans notre laboratoire (59 ,60 ,336) et dans des laboratoires étrangers (338,339,340) montrent que dans le domaine particulier des glycoprotéines, elles concernent essentiellement les N-glycosyl protéines dont la proportion des glycannes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantenné et de type poly-N-acétyllactosaminique augmente sensiblement aux dépens des structures biantennées. Toutefois, lorsque les analyses portent sur le mélange des glycannes issus des glycoprotéines membranaires totales, les variations ne sont pas toujours significatives. En effet, tous les glycannes des glycoprotéines membranaires ne sont pas modifiés et les différences portées par les glycannes transformés sont atténuées. Aussi, certains auteurs ont-ils choisi de travailler sur des glycoprotéines pures. Ainsi sont apparues des différences plus significatives; observation d'un résidu de N-acétyl glucosamine intercalaire dans les glycannes chez la lignée de cellules leucémiques promyelocytiques humaines HL 60 (335); inversion du rapport glycannes tri- et tétraantennés sur glycannes biantennés de la fibronectine de cellules BHK 21-C13 transformées par le virus HSV (60) (Tableau XV).

En effet, la fibronectine, N-glycosylprotéine de la matrice extracellulaire qui joue un rôle fondamental dans l'association des cellules n'échappe pas à ce phénomène. Les travaux de Delannoy *et al.* (60) et d'autres auteurs (337,341) portant sur des cellules en culture ont montré que les cellules transformées sécrétaient une fibronectine fortement enrichie en glycannes tri- et tétraantennés et très sialylés.

D'autre part, il a également été montré à plusieurs reprises que les cellules tumorales possédaient un taux de fibronectine plus faible que les cellules normales. Ces modifications pourraient, dans une certaine mesure, expliquer la faible cohésion des cellules tumorales et être associées au phénomène de métastase.

Sur la base de ces résultats, l'idée est venue au laboratoire d'étudier d'une manière comparative, la fibronectine des plasmas de sujets sains et de sujets cancéreux. L'hypothèse de départ était double :

- 1 - si les tissus cancéreux perdent leur fibronectine, celle-ci doit se retrouver dans le plasma sanguin.
- 2 - les glycannes de la fibronectine des sujets cancéreux devraient présenter des modifications identiques à celles qui ont été observées à propos des cellules cancéreuses en culture, si toutefois, le phénomène est "universel".

Sur cette base, le but que nous nous étions fixé au début de cette étude était de caractériser ces modifications prévues des glycannes de la fibronectine plasmatique des cancéreux. Les résultats obtenus par affino-immuno-électrophorèse croisée ont permis de confirmer cette hypothèse dans la majorité des cas étudiés. En effet, cette technique montre que pour un grand nombre de sujet cancéreux (68 sur 128 cas étudiés) la fibronectine plasmatique présente une affinité beaucoup plus faible

vis-à-vis de la Con A que celle du plasma des individus sains. Ce résultat indique clairement que, chez ces patients, la structure glycanique de la fibronectine plasmatique est modifiée soit par un enrichissement en structures tri- et/ ou tétraantennées, soit par l'apparition d'un résidu de N-acétylglucosamine "intercalaire".

L'étude immunologique que nous avons réalisée nous a en outre permis de constater une diminution du pH_i qui pouvait résulter d'une augmentation du taux de sialylation de la fibronectine dans certains cas de cancer. Nous avons poursuivi cette étude par l'analyse comparative des N-glycannes des fibronectines normales et pathologiques libérés par hydrazinolyse de la glycoprotéine purifiée. Le fractionnement de ces glycannes par chromatographie d'affinité sur Con A immobilisée nous a permis de préciser la nature des modifications de la fibronectine plasmatique des sujets cancéreux et de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour les cellules en culture.

Ce fractionnement montre, en effet, que les N-glycannes des fibronectines normales et pathologiques sont essentiellement de type N-acétyllactosaminique, la fraction oligomannosidique étant pratiquement inexistante. Les résultats obtenus, résumés dans le Tableau XV, nous montrent que la structure majeure des glycannes de la fibronectine normale est de type biantenné, la fraction des glycannes tri- et tétra-antennés ne représentant que 22,5% des glycannes totaux.

L'analyse des glycannes de la fibronectine isolée du plasma (P2) montre une inversion complète de ce rapport au profit des structures tri- et tétraantennées qui représentent dans ce cas 80,5% des glycannes totaux. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux observés pour les cellules BHK 21-C13 transformées par le virus HSV. En effet, le

Tableau XV - Pourcentages respectifs des glycanes biantennés et tri + tétraantennés de la fibronectine du plasma normal (N) et du plasma de cancéreux (P2) obtenus par chromatographie d'affinité sur Con A. A titre de comparaison, nous présentons également les résultats obtenus avec la fibronectine provenant de cellules BHK et de celles BHK viro-transformées.

Origine de la fibronectine				
Nature des fractions	Plasma normal (N)	Plasma cancéreux (P2)	Cellules BHK	Cellules BHK-HSV
Glycanes biantennés	77,5 %	19,5 %	60 %	30 %
Glycanes tri + tétra antennés	22,5 %	80,5 %	40 %	70 %
Rapport des glycanes tri + tétra antennés sur biantennés	0,29	4,13	0,73	2,46



rapport glycanes tri + tétraantennés sur glycanes biantennés passe dans ce cas de 0,73 à 2,46 (Tableau XV). Des résultats similaires ont également été obtenus par Murayama *et al.* (337) avec les fibronectines de fibroblastes de poumon normaux et viro-transformées. Leurs conclusions font en effet, ressortir une inversion des rapports tri + tétraantennés sur biantennés qui passent de 1,74 à 5,07 pour la fibronectine des cellules transformées.

Nous avons poursuivi notre étude par l'analyse de la sialylation des deux fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur Con A. En effet, l'étude immunologique préliminaire faisait apparaître une augmentation de l'électronégativité de la fibronectine des patients de type (P2) pouvant provenir d'une augmentation de la sialylation. En outre, les résultats obtenus avec des cellules en culture révélaient une forte augmentation de la sialylation de la fibronectine des cellules BHK-HSV.

L'analyse par HPLC d'échange d'ions, résumée dans le Tableau XVI, montre que le taux de sialylation de la fraction biantennée reste inchangé (1,45). Par contre, il apparaît une augmentation sensible de la sialylation de la fraction triantennée de la fibronectine (P2), le taux de sialylation passant de 0,59 à 1,50 acide sialique par glycanne. Cette fraction correspondant à la fraction majeure de la fibronectine (P2), elle peut être la cause de la diminution du pH_1 que nous avons observée. Ces résultats sont en tous points semblables à ceux qui avaient été observés avec les cellules BHK 21-C13 transformées par le virus HSV.

A titre de comparaison le Tableau XVI rassemble les résultats obtenus à partir des fibronectines provenant des fibroblastes BHK 21-C13 et BHK 21-C13 HSV (résultats non publiés) où il apparaît, de la même manière, une forte augmentation de la sialylation affectant dans ce cas

Tableau XVI - Répartition (en pourcentage de la radioactivité totale) des glycanes de la fraction biantennée et de la fraction tri + tétraantennée des fibronectines de plasma normal (N) et de plasma de cancéreux (P2) en fonction du nombre de résidus d'acide sialique. A titre de comparaison, nous présentons également les résultats obtenus avec la fibronectine provenant de cellules BHK 21-C13 et de leurs homologues transformées par le virus HSV.

Nombre de résidus d'acide sialique par glycanne	Fraction biantennée				Fraction tri + tétraantennée			
	Plasma normal N	Plasma cancéreux P2	Cellules BHK	Cellules BHK-HSV	Plasma normal N	Plasma cancéreux P2	Cellules BHK	Cellules BHK-HSV
0	6,4	7,7	36	14	65,4	21,3	27	4
1	42	44,2	48	35	14,1	29,1	49	28
2	51,6	43,4	16	51	16,2	28,2	15	27
3	-	4,5	-	-	4,3	21,4	7	30
4	-	-	-	-	-	-	2	11
Taux de sialylation	1,45	1,45	0,81	1,70	0,59	1,50	1,07	2,16

précis aussi bien la fraction biantennée que la fraction tri- et tétraantennée.

Du fait de la faible quantité de produit dont nous disposions, seule la structure glycanique de la fibronectine normale a été étudiée : elle est de type N-acétyllactosaminique biantenné non fucosylé et mono et disialylés. Il convient de noter en outre que la liaison de l'acide sialique est uniquement en position C-6 des résidus de galactose. La fraction non retenue sur Con A ne renferme que des glycanes triantennés non fucosylés. Il nous a été impossible de réaliser l'étude par ^3H R.M.N. de cette fraction et ainsi de préciser l'anométrie de la liaison de l'acide sialique. Par contre, les résultats de la méthylation démontrent l'absence de N-acétyl glucosamine intercalaire.

Nous avons complété notre étude par une analyse physico-chimique des fractions majeures purifiées par chromatographie d'affinité sur Con A. Les résultats de méthylation et de résonance magnétique nucléaire du proton nous ont permis de préciser les structures de ces glycanes comme le montre la Figure 30.

Le phénomène de multiantennarisation des glycanes de la fibronectine plasmatique que nous avons mis en évidence dans certains cas de cancers et que l'on retrouve pour la fibronectine de cellules en culture viro-transformées peut également affecter d'autres glycoprotéines et, en particulier, les glycoprotéines de la membrane plasmique. En effet, des résultats comparables ont été obtenus par différents auteurs (338,339) à la suite de l'étude des glycanes isolés des cellules entières, normales ou transformées. Dans la plupart des cas, les modifications portent essentiellement sur l'augmentation de l'antennarisation et de la sialylation des N-glycanes des cellules transformées. Toutefois, ces modifications peuvent également

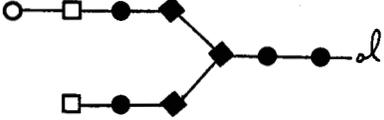
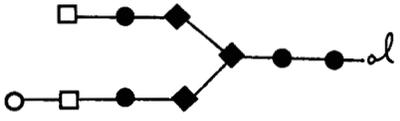
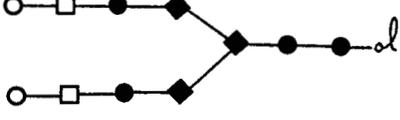
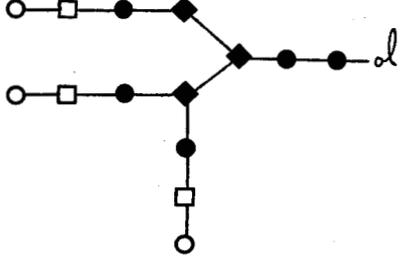
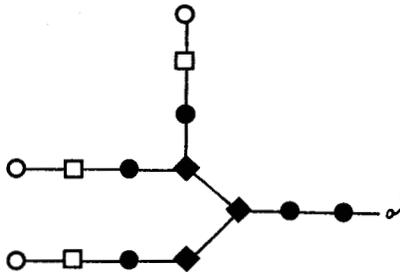
Schéma des structures glycaniques de la fibronectine plasmatique humaine	Plasma normal (N)	Plasma cancéreux (P2)
	38,5 %	n.d.
	19,5 %	n.d.
	19,5 %	n.d.
	10 %	36 %
	12,5 %	45 %



Figure 30 - Schémas et propositions des différentes structures des fibronectines normales et cancéreuses identifiées par des méthodes physico-chimiques.

se traduire par l'apparition d'un taux plus élevé de N-acétylglucosamine intercalaire ainsi que l'ont observé Mizoguchi *et al.* (335).

De plus, l'augmentation de l'antennarisation et de la sialylation des glycanes des N-glycosylprotéines a été observée dans des cas non pathologiques ou de pathologie non cancéreuse et de ce fait il est difficile de considérer ce phénomène, bien que fortement associé à la transformation maligne, comme un marqueur spécifique de la cancérisation. En particulier de telles modifications apparaissent au niveau des glycanes de la fibronectine placentaire (332) qui possèdent des structures tétra-antennées et de type poly N-acétyllactosaminique. Enfin, d'autres glycoprotéines plasmatiques présentent une augmentation de l'antennarisation dans des cas pathologiques ne relevant pas du cancer. La transferrine par exemple, voit sa proportion de glycanes triantennés sensiblement augmenter lors de certaines pathologies hépatiques.

Ce phénomène de polyantennarisation a probablement des conséquences biologiques, à la fois pour la glycoprotéine elle-même et pour les cellules qui la sécrètent. Les structures tri- et tétraantennées recouvrent, en effet, des surfaces importantes de la protéine et peuvent être stabilisées par des liaisons entre acides sialiques et acides aminés basiques. De telles dispositions ont été appelées "umbrella conformation" (186-189) et semblent protéger la protéine. En fait les résultats obtenus par différents auteurs divergent quant à la protection de la chaîne peptidique de la fibronectine à l'égard des protéases. Toutefois, des structures glycaniques aussi importantes peuvent masquer au niveau de la protéine des sites antigéniques et/ou lectiniques. A cet égard, il semble que l'augmentation de taille des glycanes diminue l'affinité de la fibronectine pour le collagène.

Cette diminution de l'affinité de la fibronectine vis-à-vis des autres constituants de la matrice extracellulaire pourrait expliquer la diminution du taux de fibronectine observée pour les cellules cancéreuses en culture et favoriser la dissociation spontanées des cellules de la tumeur primaire, première étape de la diffusion métastatique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

N°	REFERENCES	PAGES
1	ABRAHAM S.N., BEACHEY E.H., SIMPSON W.A., <i>Infect. Immun.</i> , 41 (1983) 1261-1268.	32
2	ADAMS S.L., SOBEL M.E., HOWARD B.M., OLDEN K., YAMADA K.M., DE CROMBRUGGHE B., PASTAN I., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 74 (1977) 3399-3403.	57
3	AKIYAMA S.K., JOHNSON M.D., <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> 76b (1983) 687-694.	4,5
4	AKIYAMA S., YAMADA K.M., In "Connective Tissue and Diseases of Connective Tissue" Wagner B., Fleischmajer R. eds., Williams et Wilkins : Baltimore (1983) 55-96.	48
5	AKIYAMA S.K., YAMADA K.M., <i>J. Biol. Chem.</i> 260 (1985) 4492-4500	30
6	ALEXANDER S.S., COLONNA G., YAMADA K.M., PASTAN I., EDELHOCH H.J., <i>J. Biol. Chem.</i> 253 (1978) 5820-5824.	7,8
7	ALEXANDER S.S., COLONNA G., EDELHOCH M., <i>J. Biol. Chem.</i> 254 (1979) 1501-1505.	8
8	ALI I.U., <i>F.E.B.S. Lett.</i> , 151 (1983), 45-48.	13
9	ALI I.U., <i>F.E.B.S. Lett.</i> , 176 (1984) 169-175.	13
10	ALI I.U., HUNTER T., <i>J. Biol. Chem.</i> , 256 (1981) 7671-7677.	13,58
11	ALI I.U., HYNES R.O., <i>Cell</i> , 14 (1979) 439-446.	32
12	ALI I.U., MAUTNER V.M., LANZA R., HYNES R.O., <i>Cell</i> , 11 (1977) 115-126.	56
13	ALITALO K., HOVI T., VAHERI A., <i>J. Exp. Med.</i> , 151 (1980) 602-613.	6
14	ALLAND A., HARTMANN D.J., LOUPY G., LECHEVALIER G., VILLE G., COTISSON A., ULRICH J.Y., <i>Path. Biol.</i> , 32 (1984) 115-121.	50
15	AMINOFF D., GATHMANN W.D., Mc LEAN C.M., YADOMAE T., <i>Anal. Biochem.</i> , 101 (1980) 44-53.	65
16	ANTIKATZIDES T.G., SABA T.M., <i>J. Reticuloendothel. Soc.</i> , 22 (1979) 1-12.	54
17	APLIN J.D., HUGHES R.C., <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 694 (1982) 375-418.	1;4
18	ARNESON M.A., HAMMERSCHMIDT D.E., FURCHT L.T., KING R.A., <i>J. Am. Med. Soc.</i> 244 (1980) 144-147.	50

- 19 ASCH B.B., KAMAT B.R., BURSTEIN N.A., *Cancer Res.*, 41 (1981) 2115-2125. 53,56
- 20 BABU J.P., SIMPSON W.A., COURTNEY H.S., BEACHEY E.H., *Infect. Immun.*, 41 (1983) 162-168. 32
- 21 BAENZIGER J.U., NATOWICZ M., *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 357-361. 67
- 22 BALIAN G., CLICK E.M., CROUCH E., DAVIDSON J.M., BORNSTEIN P., *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 1429-1432. 41
- 23 BALIAN G., CROUCH E., CLICK E.M., CARTER W.G., BORNSTEIN P., *J. Supramol. Struct.*, 12 (1979) 505-516. 12,19,97
- 24 BANNIKOV G.A., S^T VINCENT L., MONTESANO R., *Br. J. Cancer*, 42 (1980) 596-609. 56
- 25 BARNES D., WOLFE R., SERRERO G., Mc CLURE D., SATO G., *J. Supramol. Struct.*, 14 (1980) 47-63. 29
- 26 BAYARD D., MONTREUIL J., In "J. 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, 209-218. 65
- 27 BEACHEY E.H., SIMPSON W.A., *Infection*, 10 (1982) 65-69. 41
- 28 BENTLEY K.L., KLEBE R.J., HURST R., HOROWITZ P.M., *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 7250-7256. 45
- 29 BERNARD B.A., *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 8549-8554. 23
- 30 BIOT N., GINDRE D., HARF R., MARECHAL F., VERCOUSTRE P., PERRIN-FAYOLLE M., In "Marker Proteins in Inflammation" vol.2 Walter de Gruyter and Co, Berlin. New York (1984) 243-246. 50
- 31 BIOU D., BORDAS M., FEGER J., AGNERAY J., DURAND G., *C.R. Acad. Sc. Paris*, 292 (1981) 479-484. 76
- 32 BIRDWELL C.R., GOSPODAROWICZ D., NICOLSON G.L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 (1978) 3273-3277. 6
- 33 BIREMBAUT P., GAILLARD D., ADNET J.J., DOUSSET H., KALIS B., POYNARD J.P., LEUTENEGGER M., LABAT-ROBET J., ROBERT L., *Ann. Pathol.*, 1 (1981) 140-146. 48
- 34 BLITHE D.L., BUCK C.A., WARREN L., *Biochemistry*, 19 (1980) 3386-3395. 1
- 35 BLUMENSTOCK F.A., WEBER P., SABA T.M., *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 7156-7162. 4

36	BØG-HANSEN T.C., PRAHL P., LØWENSTEIN H., J. Immunol. Méthods, 22 (1978) 293-307.	62
37	BOUCAUT J.C., DARRIBERE T., BOULEKBACHE H., THIERY J.P., Nature, 307 (1984) 364-367.	35
38	BOUCAUT J.C., DARRIBERE T., POOLE T.J., AOYAMA H., YAMADA K.M., THIERY J.P., J. Cell Biol., 99 (1984) 1822-1830.	35
39	BOUGHTON B.J., SIMPSON A., Br. J. Haemat., 51 (1982) 487-491.	54
40	BOWERSOX J.C., SORGENTE N., Cancer Res., 42 (1982) 2547-2551	35
41	BROWN J.R., In "Atlas of Protein Sequence and Structure", Dayhoff ed., Washington, 5 (1976) 266-267.	25
42	BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L., Biochemistry, 9 (1970) 4567-4576.	1
43	BURRIDGE K., Proc. Natl. Acad. Sci., 73 (1976) 4457-4461.	56
44	CARNEMOLLA B., CASTELLANI P., CUTOLO M., BORSI L., ZARDI L., F.E.B.S. Lett., 171 (1984) 285-288.	13
45	CARTER W.G., HAKOMORI S.I., Biochimistry, 18 (1979) 730-738.	19
46	CHEN W.T., CHEN J.M., PARSONS S.J., PARSONS J.T., Nature, 316 (1985) 156-158.	57
47	CHEN L.B., MURRAY A., SEGAL R.A., BUSHNELL A., WALSH M.I., Cell, 14 (1978) 377-391.	56
48	CHEN W.T., OLDEN K., BERNARD B.A., CHU F.F., J. Cell Biol., 98 (1984) 1546-1555.	57
49	CHEN W.T., SINGER S.J., J. Cell Biol., 91 (1981) 258-262	19
50	CHEN W.T., SINGER S.J., J. Cell Biol., 95 (1982) 205-222.	41
51	CHIQUET M., PURI E.C., TURNER D.C., J. Biol. Chem., 254 (1979) 5475-5482.	35
52	CHOATE J.J., MOSHER D.F., Cancer, 51 (1983) 1142-1147.	54
53	COLLET M., ERIKSON R., Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (1978) 2021-2024.	57
54	COSIO F.G., J. Lab. Clin. Med., 103 (1984) 613-619.	32
55	COUCHMAN J.R., HOOK M., REES D.A., TIMPL R., J. Cell Biol., 96 (1983) 177-183.	29

56	CZOP J.K., AUSTEN K.F., J. Immunol., 129 (1982) 2678-2681.	32
57	CZOP J.K., KADISH J.L., AUSTEN K.F., Proc. Natl. Acad. Sci., 78 (1981) 3649-3653.	32
58	CZOP J.K., KADISH J.L., AUSTEN K.F., J. Immunol., 129 (1982) 163-167.	32
59	DEBRAY H., PIERCE-CRETEIL A., SPIK G., MONTREUIL J., In "Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry", T.C. Bøg-Hansen et G.A. Spengler eds., De Gruyter, Berlin (1983) 335-350.	66,86 108
60	DELANNOY P., DEBRAY H., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sc. Paris, 301 (1985) 767-772.	13,108 109
61	DER C.J., STANBRIDGE E.J., Cell, 15 (1978) 1241-1251.	56
62	DESSAU W., ADELMANN B.C., TIMPL R., MARTIN G.R., Biochem. J., 169 (1978) 55-59.	42
63	DEVERBIZIER G., BEAUCHANT M., CHAPRON A., TOUCHARD G., REISS D., The Lancet (1984).	53
64	DIXON A.J., BURNS J., DUNHILL M.S., Mc GEE J., J. Clin. Pathol., 33 (1980) 1021-1028.	50
65	ENGWALL E., RUOSLAHTI E., Int. J. Cancer, 20 (1977) 1-5.	42,63
66	ENGVALL E., RUOSLAHTI E., MILLER E.J., J. Exp. Med., 147 (1978) 1584-1595.	42,46
67	ERICKSON H.P., CARREL N.A., J. Biol. Chem., 258 (1983) 14539-14544.	7,10
68	ERICKSON H.P., INGLESIAS J.L., Nature, 311 (1984) 267-269.	10,11
69	FAGAN J.B., YAMADA K.M., DE CROMBRUGGHE B., PASTAN I., Nucleic Acids Res., 6 (1979) 3471-3480.	25
70	FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H., Carb. Research, 80 (1980) 336.	69
71	FISHER S.J., LAINE R.A., J. Supramol. Struct., 11 (1979) 391-399.	19,86,97
72	FISCHER F., NEBEL H.G., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 302 (1955) 10-18.	66
73	FLEISCHMAJER R., PERLISH J.S., KRIEG T., TIMPL R., J. Invest. Dermatol., 76 (1981) 400-403.	51
74	FRANGOU S.A., MORRIS E.R., REES D.A., WELSH E.J., CHAVIN S.I., Biopolymers, 22 (1983) 821-831.	31
75	FUKUDA., HAKOMORI S.I., J. Biol. Chem., 254 (1979) 5451-5457.	1,7,19

76	FUKUDA M., LEVERY S.B., HAKOMOROSI S.I., J. Biol. Chem., 257 (1982) 6856-6860.	19
77	FURCHT L.T., In "Modern Cell Biology" Satir B. ed., A.R. Liss : New-York (1983) 53-117.	4
78	FYRAND O., SOLUM N.O., Thromb. Res., 6 (1976) 447-455.	48
79	GAHMBERG C.G., KIEHN D., HAKOMORI S.I., Nature, 248 (1974) 413-415.	3
80	GARCIA-PARDO A., PEARLSTEIN E., FRANGIONE B., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120 (1984) 1015-1021.	7
81	GEYER R., GEYER H., STIRM S., HUNSMANN G., SCHNEIDER J., DABROWSKI U., DABROWSKI J., Biochemistry, 23 (1984) 5628-5637.	65
82	GILBERT W., Nature, 271 (1978) 501.	25
83	GILCHREST B.A., CALHOUN J.K., MACIAG T., J. Cell physiol. 112 (1982) 197-206.	35
84	GINSBERG M.H., PAINTER R.G., BIRDWELL C., PLOW E.F., FORSYTH J., J. Supramol. Struct., 11 (1979) 167-174.	33
85	GOLD L.I., FRANGIONE B., PEARLSTEIN E., Biochemistry, 22 (1983) 4113-4119.	44,45
86	GOLD L.I., GARCIO-PARDO A., FRANGIONE B., FRANKLIN E.C., PEARLSTEIN E., Proc. Natl. Acad. Sci., 76 (1979) 4803-4807.	41
87	GRINNELL F., Int. Rev. Cytol., 53 (1978) 65-144.	34
88	GRINNELL F., In "Growth and Maturation Factors" Guroff G. ed., John Wiley and Sons : New-York (1983) 267-292.	4
89	GRINNELL F., In "Growth and Maturation Factors" Guroff G. ed., John Wiley et fils : New-York (1983) 454-486.	34
90	GRINNELL F., FELD M.K., Cell, 17 (1979) 117-129.	32
91	GRINNELL F., FELD M., MINTER D., Cell, 19 (1980) 517-525.	34
92	GRINNELL F., FELD M., SNELL W., Cell Biol. Int. Rep., 3 (1979) 585.	34
93	GRINNELL F., MINTER D., Proc., Natl. Acad. Sci., 75 (1978) 4408-4412.	29
94	GRINNELL F., PHAN T.V., Thromb. Res., (sous presse).	34
95	GODEWICZ P.W., MOLNAR J., LAI M.Z., BEEZHOLD D.W., SIEFRING G.E., CREDO R.B., LORAND L., J. Cell Biol., 87 (1980) 427-433.	32

96	HAHN E., WICK G., PENCER D., TIMPL R., <i>Gut.</i> , 21 (1980) 63-71.	49
97	HAHN L.H.E., YAMADA K.M., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 76 (1979) 1160-1163.	41
98	HAHN L.H.E., YAMADA K.M., <i>Cell</i> , 18 (1979) 1043-1051.	42
99	HAKOMORI S.I., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 417 (1975) 55-89.	1,55
100	HANSEN M.S., CLEMMENSEN I., <i>Biochem. J.</i> , 201 (1982) 629-633.	33
101	HARD G.C., CLARKE F.M., TOH B.H., <i>Cancer Res.</i> , 40 (1980) 3728-3734.	56
102	HAYASHI M., SCHLESINGER D.H., KENNEDY D.W., YAMADA K.M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 255 (1980) 10017-10020.	44,45
103	HAYASHI M., YAMADA K.M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 256 (1981) 1292-1300.	40,44,45
104	HAYASHI M., YAMADA K.M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 5263-5267.	44,45
105	HAYASHI M., YAMADA K.M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 258 (1983) 3327-3331.	44
106	HAYASHI M., YAMADA K.M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 258 (1983) 3332-3340.	42,46
107	HAYMAN E.G., ENGVALL E., RUOSLAHTI E., <i>J. Cell Biol.</i> , 88 (1981) 352-357.	57
108	HAYMAN E.G., PIERSCHBACHER M.D., OHGREN Y., RUOSLAHTI E., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 80 (1983) 4003-4007.	29
109	HIRANO H., YAMADA Y., SULLIVAN M., DE CROMBRUGGHE B., PASTAN I., YAMADA K.M., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 80 (1983) 46-50.	24,25,26
110	HÖÖK M., RUBIN K., OLDBERG Å., ÖBRINK B., VAHERI A., <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 79 (1977) 726-733.	31
111	HÖRMANN H., <i>Klin Wochenschr</i> , 60 (1982) 1265-1277.	4, 41
112	HÖRMANN H., JELINIC V., <i>Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> , (1981) 87-94.	45
113	HÖRMANN H., JILEK F., <i>Artery</i> , 8 (1980) 482-486.	42
114	HÖRMANN H., SEIDL M., <i>Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> , 361 (1980) 1449-1452.	46
115	HUGHES R.C., PENA S.D.J., CLARK J., DOURMASHKIN R.R., <i>Exp. Cell Res.</i> , 121 (1979) 307-314.	32
116	HYNES R.O., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 70 (1973) 3170-3174.	3,55,56
117	HYNES R.O., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 458 (1976) 73-107.	1

118	HYNES R.O., In "Cell Biology of the Extracellular Matrix" Hay E.D. ed., Plenum Publishing Corp : New-York (1981) 295-334.	4,41
119	HYNES R.O., ALI I.U., DESTREE A.T., MAUTNER V., PERKINS M.E., SINGER D.R., WAGNER D.D., SMITH K.K., Ann. N.Y. Acad. Sci., 312 (1978) 317-342.	18,33,57
120	HYNES R.O., DESTREE A., Proc. Natl. Acad. Sci., 74 (1977) 2855-2859.	7,41
121	HYNES R.O., MARTIN G.S., CRITCHLEY D.R., SCHEARER M., EPSTEIN C.J., Dev. Biol., 48 (1976) 35-46.	56
122	HYNES R.O., YAMADA K.M., J. Cell Biol., 95 (1982) 369-377.	1,41
123	IAMMARTINO A.J., ANDERSON B., DONAKOWSKI C., SCHMID F.R., Arthritis Rheum., 23 (1980) 694.	50
124	ISEMURA M., YAMAGUCHI Y., MUNAKATA H., AIKAWA J., KAN M., YAMANE I., YOSIZAWA Z., J. Biochem., 96 (1984) 163-169.	19,97
125	ISEMURA M., YOSIZAWA Z., KOIDE T., ONO T., J. Biochem., 91 (1982) 731-734.	45
126	ITAYA K., HAKOMORI S.I., F.E.B.S. Lett., 66 (1976) 65-69.	56
127	IWANAGA S., SUZUKI K., HASHIMOTO S., Ann. N.Y. Acad. Sci., 312 (1978) 56-73.	46
128	IYER R.N., CARLSON D.M., Arch. Biochem. Biophys., 142 (1971) 101-105.	65
129	JAFFE E.A., MOSHER D.F., J. Exp. Med., 147 (1978) 1779-1791.	6
130	JARSTRAND C., AHLGREN T., BERGHEN L., J. Clin. Lab. Immunol., 8 (1982) 59-63.	34
131	JOHANSSON S. J. Biol. Chem., 260 (1985) 1557-1561.	30
132	JOHANSSON S., HÖÖK M., J. Cell Biol., 98 (1984) 810-817.	31
133	JOHANSSON S., KJELLEN L., HÖÖK M., TIMPL R., J. Cell Biol., 90 (1981) 260-264.	29
134	JILEK F., HÖRMANN H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359 (1978) 247-250.	42
135	JILEK F., HÖRMANN H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 187 (1979) 521-524.	31
136	JILEK F., HÖRMANN H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360 (1979) 597-603.	45
137	KAMERLING, GERWIG, VLIEGENTHART, CLAMPS, Biochem. J., 151 (1975) 491-495.	69

138	KAMYKOWSKI G.W., MOSHER D.F., LORAND L., FERRY J.D., <i>Biophys. Chem.</i> , 13 (1981) 25-28.	46
139	KENNEDY D.W., ROHRABACH D.H., MARTIN G.R., MOMOI T., YAMADA K.M., <i>J. Cell Physiol.</i> , 114 (1983) 257-262.	29
140	KESKI-OJA J., MOSHER D.F., VAHERI A., <i>Cell</i> , 9 (1976) 29-35.	41
141	KESKI-OJA J., MOSHER D.F., VAHERI A., <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 74 (1977) 699-706.	41
142	KESKI-OJA J., SEN A., TODARO G.J., <i>J. Cell Biol.</i> , 85 (1980) 527-533.	40
143	KESKI-OJA J., YAMADA K.M., <i>Biochem. J.</i> , 193 (1981) 615-620.	40
144	KLEBE R.J., <i>Nature</i> , 250 (1974) 248-251.	42
145	KLEINMAN H.K., KLEBE R.J., MARTIN G.R., <i>J. Cell Biol.</i> , 88 (1981) 473-485.	4,34
146	KLEINMAN H.K., Mc GOODWIN E.B., MARTIN G.R., KLEBE R.J., FIETZEK P.P., WOOLEY D.E., <i>J. Biol. Chem.</i> , 253 (1978) 5642-5646.	42
147	KNOX P., GRIFFITHS S., <i>J. Cell Sci.</i> , 46 (1980) 97-112.	29
148	KNOX P., WELLS P., <i>J. Cell Sci.</i> , 40 (1979) 77-88.	45
149	KNOX P., GRIFFITHS S., WELLS P., In "The Extracellular Matrix"; Hawkes S.P., Wang J.L., eds., (1982) 103-107.	45
150	KNOX P., GRIFFITHS S., WELLS P., In "The Extracellular Matrix", Hawkes S.P., Wang J.L., eds., (1982) 103-107.	45
151	KOTELIANSKY V.E., GLUKHOVA M.A., MOROZKIN A.D., MUSATOV A.P., SHIRINSKY V.P., <i>F.E.B.S. Lett.</i> , 133 (1981) 31-35.	40
152	KOTELIANSKY V.E., GNEUSHEV H.N., GLUKHOVA M.A., SHARTAVA A.S., SMIRNOV V.N., <i>F.E.B.S. Lett.</i> , 143 (1982) 168-170.	40
153	KOTELIANSKY V.E., LEYTIN V.L., SVIRIDOV D.D., REPIN V.S., SMIRNOV V.N., <i>F.E.B.S. Lett.</i> , 123 (1981) 59.	34
154	KRUSIUS T., FUKVDA M., DELL A., RUOSLAHTI E., <i>J. Biol. Chem.</i> , 260 (1985) 4110-4116.	19,21,22, 74,97
155	KUUSELA P., <i>Nature</i> , 276 (1978) 718-720.	32,41
156	KUUSELA P., RUOSLAHTI E., ENGVALL E., VAHERI A., <i>Immunochemistry</i> , (1976) 639-642.	3
157	KUUSELA P., VAHERI A., PALO J., RUOSLAHTI E., <i>Lad. Clin. Med.</i> , 92 (1978) 595-601.	6

158	LABAT-ROBERT J., BIREMBAUT P., ADNET J.J., MARCANTINI F., ROBERT L., <i>Cell Biol. Int. Rep.</i> , 4 (1980) 609-616.	53
159	LABAT-ROBERT J., BIREMBAUT P., ROBERT L., ADNET J.J., <i>Diagnost. Histopathol.</i> , 4 (1981) 299-306.	53,54
160	LABAT-ROBERT J., POTAZMAN J.P., DEROUETTE J.C., ROBERT L., <i>Cell Biol. Int. Rep.</i> , 5 (1981) 969-973.	6
161	LAEMMLY V.K., <i>Nature</i> , 227 (1970) 680-685.	64
162	LAEMMLY V.K., FAVRE M., <i>J. Mol. Biol.</i> 80 (1973) 575-599.	64
163	LASKOWSKI M., KATO I., KOHR W.J., MARCH C.J., BOGARD W.C., In "Protides of the Biological Fluids" Pecters ed., New-York (1980) 123-128.	25
164	LATERRA J., CULP L.A., <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 719-726.	17
165	LATERRA J., SILBERT J.E., CULP L.A., <i>J. Cell Biol.</i> , 96 (1983) 112-123.	29
166	LEE Y.C., SCOCCA J.R., <i>J. Biol. Chem.</i> , 247 (1972) 5753-5758.	65
167	LEFEVRE A., MAZURIER C., GOUEMAND M., <i>Revue Française de Transfusion et Immuno-Hématologie</i> , 26 (1983) 135-145.	6,48
168	LEUTENEGGER M., BIREMBAUT P., POYNARIO J.P., ESCHARD J.P., RICARD Y., CARON Y., ROBERT L., SZENDROI M., LABAT-ROBERT J., <i>Path. Biol.</i> , 31 (1983) 45-48.	7
169	LEVINSON A., OPPERMAN H., LEVINTON L., VARMUS H., BISHOP J., <i>Cell</i> , 15 (1978) 561-572.	57
170	LINDER E., STENMAN S., LEHTO V.P., VAHERI A., <i>Ann. N.Y. Acad. Sci.</i> , 312 (1978) 151-159.	53
171	LORING J., GLIMELIUS B., WESTON J.A., <i>Dev. Biol.</i> , 90 (1982) 165-174.	35
172	MACARAK E.J., HOWARD P.S., <i>J. Cell Physiol.</i> , 116 (1983) 76-86.	35
173	MACARAK E.J., KIRBY E., KIRK T., KEFALIDES N.A., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 75 (1978) 2621-2625.	6
174	MACIAG T., HOOVER G.A., STEMERMAN M.B., WEINSTEIN E., <i>J. Cell Biol.</i> , 91 (1981) 420-426.	35
175	Mc CARTHY J.B., FURCHT L.T., <i>J. Cell Biol.</i> , 98 (1984) 1474-1480.	33
176	MANCINI G., CARONARA A.O., HEREMANS J.F., <i>Immunochemistry</i> , 2 (1965) 235.	61
177	MAHADAVI V., HYNES R.O., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 583 (1979) 167-178.	57

178	MARCEAU N., GOYETTE R., VALET J.P., DESCHENES J., <i>Exp. Cell Res.</i> , 125 (1980) 497-502.	6
179	MARCIANI D.J., LYONS L.B., THOMPSON E.B., <i>Cancer Res.</i> , 36 (1976) 2937-2944.	56
180	MARINO J.A., PENSKY J., CULP L.A., SPAGNUOLO P.J., <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 105 (1985) 725-730.	32
181	MARQUETTE D., MOLNAR J., YAMADA K.M., SCHLESSINGER D., DARBY S., VAN ALTEN P., <i>Mol. Cell Biochem.</i> , 36 (1981) 147-155.	18,19,32
182	MAYER B.W., HAY E.D., HYNES R.O., <i>Dev. Biol.</i> , 82 (1981) 267-286.	35
183	MENSING H., ALBINI A., KRIEG T., PONTZ B.F., MULLER P.K., <i>Int. J. Cancer</i> , 33 (1984) 43-48.	33
184	MOLNAR J., FROELICH J., ROUIN B., <i>J. Supramol. Struct. Suppl.</i> , 5 (1981) 310.	40
185	MOLNAR J., GELDER F.B., LAI M.Z., SIEFRING G.E., CREDO R.B., LORAND L., <i>Biochemistry</i> 18 (1979) 3909-3916.	40
186	MONTREUIL J., In "Proc. Aharon Katzir-Katchalski Conference on Carbohydrate-Protein Interactions" Kiblutz Kiryat Anamiv., 9 (1980) 3-4.	59,109,116
187	MONTREUIL J., In "Comprehensive Biochemistry" Neuberger A. et Van Deenen L.L.M. eds., Elsevier, Amsterdam, 19B, part. II (1982) 1-188.	59,109,116
188	MONTREUIL J., <i>Biochem. Soc. Trans.</i> , 11 (1983) 134-136.	59,109,116
189	MONTREUIL J., <i>Pure and Appl. Chem.</i> , 56 (1984) 859-877.	59,109,116
190	MORISSEY J.H., <i>Anal. Biochem.</i> , 117 (1981) 307-310.	64
191	MORISSON P., EDSALL R., MILLER S.G., <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 70 (1948) 3103-3108.	3
192	MOSESSON M.W., AMRANI D.L., <i>Blood</i> , 56 (1980) 145-158.	4,6,40
193	MOSESSON M.W., CHEN A.B., HUSEBY R.M., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 386 (1975) 509-524.	8
194	MOSESSON M.W., UMFLEET R.A., <i>J. Biol. Chem.</i> , 245 (1970) 5728-5736.	8
195	MOSHER D.F., <i>J. Biol. Chem.</i> , 250 (1975) 6614-6621.	46
196	MOSHER D.F., <i>J. Biol. Chem.</i> , 251 (1976) 1639-1645.	46

197	MOSHER D.F., Fibronectin. Prog. Hemostasis. Thromb. 5 (1980) 111-151.	32,40
198	MOSHER D.F., JOHNSON R.B., Ann. N.Y. Acad. Sci., 408 (1983) 583-594.	46
199	MOSHER D.F., PROCTOR R.A., Science, 209 (1980) 927-929.	32,41
200	MOSHER D.F., SCHAD P.E., VANN J.M., J. Biol. Chem. 255 (1980) 1181-1188.	42
201	MURAYAMA K., NICHOLS E.J., LEVERY S.B., CARTER W.G., HAKOMORI S.I., Glycoconjugate, 1 (1984) 155-169.	13,19,20 97
202	NATALI P.G., GALLOWAY D., NICOTA M.R., DE MARTINO C., Connective Tissue Res., 8 (1981) 199-204.	50
203	NICOLLET I., LEBRETON J.P., FONTAINE M., HIRON M., Biochim. Biophys. Acta, 668 (1981) 235-245.	62
204	NORRIS D.A., CLARK R.A.F., SWIGART L.M., HUFF J.C., WESTON W.L., HOWEL S.E., J. Immunol., 129 (1982) 1612-1618.	34
205	OGATA S.I., MURAMATSU T., KOBATA A., Nature, 259 (1976) 580-582.	1
206	OKADA M., BLOMBÄCK B., CHANG M.D., HOROWITZ B., J. Biol. Chem., 260 (1985) 1811-1820.	46,47,48
207	O'KEEFE E.M.D., WOODLEY D.M.D., CASTILLO G.M.D., RUSSEL N.B.S., PAYNE R.E.B.S., J. Invest. Dermatol., 82 (1984) 150-155.	7
208	OLDBERG Å, RUOSLAHTI E., J. Biol. Chem. (1982) 4859-4863.	45
209	OLDEN K., YAMADA K.M., Cell, 11 (1977) 957-969.	57
210	PARASKEVA C., GALLIMORE P.H., Int. J. Cancer, 25 (1980) 631-639.	56
211	PARSONS R.G., ALDENDERFER P.H., KOWAL R., J. Natl. Cancer Inst., 63 (1979) 43-47.	54
212	PARSONS R.G., TODD H.D., KOWAL R., Cancer Res., 39 (1979) 4341-4345.	54
213	PEARLSTEIN E., GOLD L.I., GRACIA-PARDO A., Mol. Cell Biochem., 29 (1980) 103-128.	4,41
214	PEARLSTEIN E., HYNES R.O., FRANKS L.M., HEMMING V.L., Cancer Res., 36 (1976) 1475-1480.	56
215	PEARLSTEIN E., WATERFIELD M.D., Biochem. Biophys. Acta, 362 (1974) 1-12.	3
216	PENA S.D.J., HUGHES R.C., Cell Biol. Int. Rep., 2 (1978) 339-344.	18

217	PENNYPACKER J.P., HASSEL J.R., YAMADA K.M., PRATT R.M., <i>Exp. Cell Res.</i> , 121 (1979) 411-415.	36
218	PETERSEN T.E., THØGERSEN H.C., SKORSTENGAARD K., VIBE-PEDERSEN K., SAHL P., SOTTRUP-JENSEN L., MAGNUSSON S., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 80 (1983) 137-141.	7,9,25 42
219	PETTERSON E.E., COLVIN R.B., <i>Clin. Immunol. Immunopathol.</i> , 11 (1978) 425-431.	50
220	PIERSCHBACHER M.D., RUOSLAHTI E., <i>Nature</i> , 309 (1984) 30-33.	42,43
221	PIERSCHBACHER M.D., HAYMAN E.G., RUOSLAHTI E., <i>Cell</i> , 26 (1981) 259-267.	42
222	PIERSCHBACHER M.D., HAYMAN E.G., RUOSLAHTI E., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 80 (1983) 1224-1227.	42
223	PIERSCHBACHER M.D., RUOSLAHTI E., SUNDELIN J., LIND P., PETERSON P., <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 9593-9597.	42
224	PLOW E.F., GINSBERG M.H., <i>J. Biol. Chem.</i> , 256 (1981) 9477-9482.	33
225	PODLESKI T.R., GREENBERG I., SCHLESSINGER J., YAMADA K.M., <i>Exp. Cell Res.</i> , 123 (1979) 104-126.	35
226	POMMIER C.G., INADA S., FRIES L.F., TAKAHASHI T., FRANK M.M., BROWN E.J., <i>J. Exp. Med.</i> , 157 (1983) 1844-1854.	32
227	POUYSSÉGUR J., WILLINGHAM M., PASTAN I., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 74 (1977) 243-247.	32
228	PROCTOR R.A., HAMILL R.J., MOSHER D.F., TEXTOR J.A., OLBRANTZ P.J., <i>J. Antimicrob. Chemother.</i> , 12 (1983) 85-95.	32
229	PROCTOR R.A., MOSHER D.F., OLBRANTZ P.J., <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 14788-14794.	32
230	PROCTOR R.A., PRENDERGAST E., MOSHER D.F., <i>Blood</i> , 59 (1982) 681-687.	32,41
231	PROCTOR R.A., TEXTOR J.A., VANN J.M., MOSHER D.F., <i>Infect. Immun.</i> , 47 (1985) 629-637.	32
232	RENNARD S., HUNNINGLAKE G.W., BITTERMAN P.B., CRYSTAL R.G., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 78 (1981) 7147-7151.	51
233	RICH A.M., PEARLSTEIN E., WEISSMANN G., HOFFSTEIN S.T., <i>Nature</i> , 193 (1981) 224-226.	45
234	RICHTER M., SEIDL M., HORMANN H., <i>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> , 362 (1981) 399-408.	44,45
235	RIEBER M., RIEBER M.S., <i>Cancer Res.</i> , 40 (1980) 2562-2567.	56

256	SALIER J.P., FAYE L., VERGAINE D., MARTIN J.P., Electrophoresis, 1 (1980) 193-197.	62,72
257	SANTER U.V., GLICK M.C., Biochemistry, 18 (1979) 2533-2540.	1
258	SCATCHARD G., Ann. N.Y., Acad. Sci., 51 (1949) 660-672.	30
259	SCHEIDEGGER J.J., Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7 (1955) 103.	61
260	SCHEINMAN J.I., FISH A.J., MICHAEL A.F., Am. J. Pathol., 90 (1978) 71-88.	50
261	SCHOR S.L., COURT J., J. Cell Sci., 38 (1979) 267-281.	29
262	SEIDL M., HÖRMANN H., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 364 (1983) 83-92.	42
263	SEKIGUCHI K., FUKUDA M., HAKOMORI S.I., J. Biol. Chem., 256 (1981) 6452-6462.	44,46
264	SEKIGUCHI K., HAKOMORI S.I., Proc. Natl. Acad. Sci., 77 (1980) 2661-2665.	44
265	SEKIGUCHI K., HAKOMORI S.I., J. Biol. Chem., 258 (1983) 3967-3973.	46
266	SEKIGUCHI K., SIRI A., ZARDI L., HAKOMORI S.I., J. Biol. Chem., 260 (1985) 5105-5114.	13,14,16 38,58
267	SIEBER-BLUM M., SIEBER F., YAMADA K.M., Exp. Cell Res., 133 (1981) 285-295.	35
268	SIMPSON A.W., BOUGHTON B.J., J. Clin. Pathol., 37 (1984) 787-789.	32
269	SKORSTENGAARD K., THØGERSEN H.C., PETERSEN T.E., Eur. J. Biochem., 140 (1984) 235-243.	41
270	SMETS L.A., VAN BEEK W.P., Biochim. Biophys. Acta, 738 (1984) 237-249.	1
271	SMITH R.T., J. Clin. Invest., 36 (1957) 605-616.	48,54
272	SMITH H.S., HACKETT A.J., RIGGS J.L., MOSESSON M.W., WALTON J.R., STAMPFER M.R., J. Supramol. Struct., 11 (1979) 147-166.	53,56
273	SMITH D.E., MOSHER O.F., JOHNSON R.B., FUCHT L.T., J. Biol. Chem., 257 (1982) 5831-5838.	11
274	SMITH H.S., RIGGS J.L., MOSESSON M.W., Cancer Res., 39 (1979) 4138-4144.	56
275	SOTTRUP-JENSEN L., CLAEYS H., ZAJDEL M., PETERSEN T.E., MAGNUSSON S., In "Progress in chemical Fibrinolysis and Thrombolysis" Davidson ed., New-York (1978) 191-209.	

276	STAMPFER M.R., VLODAVSKY I., SMITH H.S., FORD R., BECKER F.F., RIGGS J., J. Natl. Cancer Inst., 67 (1981) 253-261.	53,56
277	STATHAKIS N.E., FOUNTAS A., TSIANOS E., J. Clin. Pathol., 34 (1981) 504-508.	54
278	STATHAKIS N.E., FOUNTAS A., TSIANOS E., J. Clin. Pathol., 147 (1981) 1054-1064.	48
279	STENMAN S., VAHERI A., J. Exp. Med., 147 (1978) 1054-1064.	49
280	STENMAN S., VAHERI A., Int. J. Cancer., 27 (1981) 427-435.	53,54
281	STENMAN S., VON SMITTEN K., VAHERI A., Acta Med. Scand., 642 (1980) 165-170.	50
282	STENN K.S., MADRI J.A., TINGHITELLA T., TERRANOVA V.P., J. Cell Biol., 96 (1983) 63-67.	35
283	SVENDSEN P.J., CARSTEN R., Sci. Tools, (1970) 13-17.	62
284	TAKASAKI S., IKEHUTA M., KOBATA A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 (1980) 735-742.	1
285	TAKASAKI S., YAMASHITA K., SUZUKI K., IWANAGA S., KOBATA A., J. Biol. Chem., 254 (1979) 8548-8553.	19
286	TAKASAKI S., YAMASHITA K., SUZUKI K., KOBATA A., J. Biochem., 88 (1980) 1587-1594.	19,97
287	TAKASHIMA A., GRINNELL F., J. Invest. Dermatol., (sous presse).	35
288	TAMKUN J.W., HYNES R.O., J. Biol. Chem., 258 (1983) 4641-4647.	6
289	TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., BURCHELL J., HURST J., Cancer Res., 41 (1981) 2491-2500.	56
290	THIERY J.P., DUBAND J.L., DELOUVEE A., Dev. Biol., 93 (1982) 324-343.	35
291	TODD H.S., COFFEE M.S., WAALKES T.P., ABELOFF M.D., PARSONS R.G., J. Natl. Cancer Inst., 65 (1980) 901-904.	54
292	TSUKAMOTO Y., HELSEL W.E., WAHL S.M., J. Immun. 127 (1981) 673.682.	32
293	VAHERI A., MOSHER D.F., Biochim. Biophys. Acta, 516 (1978) 1-25.	1,40,56
294	VAHERI A., RUOSLAHTI E., WESTERMARK B., PONTEN J.A., J. Exp. Med., 143 (1976) 64-72.	56
295	VAN DE WATER L., DESTREE A.T., HYNES R.O., Science, 220 (1983) 201-204.	32

296	VAN DE WATER L., SCHROEDER S., CRENSHAW E.B., HYNES R.O., J. Cell Biol., 90 (1981) 32-39.	6,32
297	VARTIO T., BARLATI S., DE PETRO G., MIGGIANO V., STÄHLI C., TAKACS B., VAHERI A., Eur. J. Biochem. 135 (1983) 203-207.	15
298	VERBRUGH H.A., PETERSON P.K., SMITH D.E., NGUYEN B.T., HOIDAL J.R., WILKINSON B.J., VERHOEF J., FURCHT L.T., Infect. Immu., 33 (1981) 811-819.	32
299	VERCELLOTTI G.M., LUSSENHOP D., PETERSON P.K., FURCHT L.T., Mc CARTHY J.B., JACOB H.S., MOLDOW C.F., J. Lab. Clin. Med., 103 (1984) 34-43.	32
300	VILLIGER B., KELLEY D.G., ENGLEMAN W., KUHN C., Mc DONALD J.A., J. Cell Biol., 90 (1981) 711-720.	6
301	VOSS B., ALLAM S., RAUTERBERG J., ULLRICH K., GIESELMANN V., VON FIGURA K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 90 (1979) 1348-1354.	6
302	VUENTO M., WRANN M., RUOSLAHTI E., F.E.B.S. Lett., 82 (1977) 227-231.	8
303	WAGNER D.D., HYNES R.O., J. Biol. Chem., 255 (1980) 4304-4312.	11
304	WAGNER D.D., IVATT R., DESTREE A.T., HYNES R.O., J. Biol. Chem., 256 (1981) 11708-11715.	1,57,58
305	WALL R.T., COOPER S.L., KOSEK J.C., Exp. Cell Res., 140 (1982) 105-109.	34
306	WARREN L., BUCK C.A., TUSZINSKY G.P., Biochim. Biophys. Acta, 516 (1978) 97-127.	1
307	WARTIOVAARA J., VAHERI A., Dev. Mamm., 4 (1980) 233-266.	4
308	WEISS M.A., OOI B.S., OOI Y.M., ENGVALL E.E., RUOSLAHTI E., Lab. Invest., 41 (1979) 340-347.	50
309	WEST C.M., LANZA R., ROSENBLOOM J., LOWE M., HOLTZER H., AVDALOVIC N., Cell, 17 (1979) 491-501.	36
310	WESTON J.A., In "Cell Interactions Development : Molecular Mechanisms" Yamada K.M. ed., John Wiley et fils : New-York, 153-184.	35
311	WICKUS G.G., ROBBINS P.W., Nature, 245 (1973) 65-67.	57
312	WIGLEY C.G., SUMMERHAYES I.C., Exp. Cell Res., 118 (1979) 394-399.	56
313	WILLIAMS E.C., JANMEY P.A., FERRY J.D., MOSHER D.F., J. Biol. Chem., 257 (1982) 14973-14978.	31
314	WILLIAMS E.C., JANNEY P.A., JOHNSON R.B., MOSHER D.F., J. Biol. Chem., 258 (1983) 5911-5914.	41
315	WILLINGHAM M., JAY G., PASTAN I., Cell, 18 (1979) 125-134.	57

316	WILSON B.S., RUBERTO G., FERRONE S., <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 101 (1981) 784-791.	58
317	WOLFF I., TIMPL R., PECKER I., STEFFEN C., <i>Vox Sang.</i> , 12 (1967) 443-456.	4
318	WRANN M., <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 84 (1978) 269-274.	19,97
319	YAMADA K.M., In "Glycoconjugates" Vol.3, Horowitz, M.I. ed., <i>Acad. Press : New-York</i> (1982) 331-352.	1,8,18 31
320	YAMADA K.M., <i>Annu. Rev. Biochem.</i> , 52 (1983) 761-799.	4
321	YAMADA K.M., HAYASHI M., HIRONO H., AKIYAMA S.K., In "The role of Extracellular Matrix in Development", Liss A.R.: New-York (1984) 89-121.	4,24,28
322	YAMADA K.M., KENNEDY D.W., <i>J. Cell Biol.</i> , 80 (1979) 492-498.	17,18
323	YAMADA K.M., KENNEDY D.W., KIMATA K., PRATT R.M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 255 (1980) 6055-6063.	45
324	YAMADA K.M., OLDEN K., <i>Nature</i> , 275 (1978) 179-184.	1,56
325	YAMADA K.M., SCHLESINGER D.H., KENNEDY D.W., PASTAN I., <i>Biochemistry</i> , 16 (1977) 5552-5559.	7,8,41
326	YAMADA K.M., YAMADA S.S., PASTAN I., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 73 (1976) 1217-1221.	56
327	YAMAGUCHI Y., ISEMURA M., YOSIZAWA Z., SATO A., SUZUKI M., <i>Tohoku J. Exp. Med.</i> , 141 (1983) 359-367.	55,74
328	YONEMASU K., NAKANISHI A., SASAKI T., KASHIBA S., <i>Microbiol. Immunol.</i> , 27 (1983) 283-290.	34
329	ZANETTA J.P., BRECKENBRIDGE W.C., VINCENDON G., <i>J. Chromato</i> , 69 (1972) 291.	68
330	ZARDI L., CECCONI C., BARBIERI O., CARNEMOLLA B., PICCA M., SANTI L., <i>Cancer Res.</i> , 39 (1979) 3774-3779.	54
331	ZERLAUTH G., WOLF G., <i>Am. J. Med.</i> , 77 (1984) 685-689.	48,54
332	ZHU B.C.R., FISHER S.F., PANDE H., CALAYCAY J., SHIVELY J.E., LAINE R.A., <i>J. Biol. Chem.</i> , 259 (1984) 3962-3970.	19,20,23
333	ZHU B.C.R., LAINE R.A., <i>J. Biol. Chem.</i> , 260 (1985) 4041-4045.	19,23,41,9
334	ZUCKER M.B., MOSESSON M.W., BROCKMAN M.J., KAPLAN K.L., <i>Blood</i> , 54 (1979) 8.	33

- 335 MIZOGUCHI A., TAKASAKI S., KOBATA A., (1984) J. Biol. Chem., 259 (1984) 11949-11957. 108,116
- 336 MONTREUIL J., DEBRAY H., DEBEIRE P., DELANNOY P., in "Structural carbohydrates in the liver" M. Popper, W. Reutter, E. Kottgen et F. Gudat eds. M.T.P. Press, England (1983) 239-258. 108
- 337 MURAYAMA K., NICHOLS E.J., LEVERY., CARTER W.G., HAKOMORI S.I., glycoconjugate J., 1 (1984) 155-169. 109,112
- 338 OGATA S.I., MURAMATSU T., KOBATA A., Nature, 259 (1979) 580-582. 108,114
- 339 SAUTER U.V., GLICK M.C., Biochemistry, 18 (1979) 2533-2540. 108,114
- 340 TAKASAKI S., IKEHIRA M., KOBATA A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 (1980) 735-742. 108
- 341 WAGNER D.D., IVATT R., DESTREE A.T., HYNES R.O., J. Biol. Chem. 256 (1981) 11708-11715. 109

