

50376  
1989  
79

50376  
1989  
79

N° d'ordre : 774

**THÈSE**

présentée à

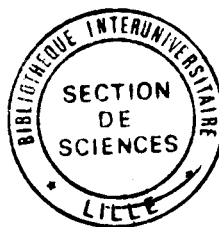
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES**

par

Philippe DELANNOY



**ETUDE DES MODIFICATIONS DE LA GLYCOSYLATION  
DE LA FIBRONECTINE DES CELLULES TRANSFORMEES.  
CONSEQUENCE SUR L’AFFINITE DE LA FIBRONECTINE  
POUR LE COLLAGENE**

Présentée le 17 Mars 1989 devant la Commission d’Examen

Président et Rapporteur :	J. MONTREUIL
Rapporteurs :	M. MONSIGNY A. VERBERT
Examineurs :	R. CACAN M. MAREEL P. ROUSSEL

*Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL au sein du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au C.N.R.S. n° 217 : Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires).*

## **TABLE DES MATIERES**

# INTRODUCTION.

1

## GENERALITES

### I. HISTORIQUE.

5

### II. LOCALISATION DES FIBRONECTINES.

6

#### A. LES FIBRONECTINES DANS L'EVOLUTION ANIMALE.

6

#### B. FIBRONECTINES SOLUBLES.

8

#### C. FIBRONECTINES INSOLUBLES.

8

### III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FIBRONECTINES.

10

#### A. CONFORMATION DE LA MOLECULE.

##### 1. Conformation de la fibronectine plasmatique.

10

##### 2. Conformation de la fibronectine cellulaire.

13

#### B. COMPOSITION EN ACIDES AMINES.

14

#### C. STRUCTURE PRIMAIRE.

14

### IV. DOMAINES FONCTIONNELS DE LA FIBRONECTINE.

18

#### A. PURIFICATION DES DOMAINES FONCTIONNELS DE LA FIBRONECTINE.

18

#### B. ORGANISATION INTRAMOLECULAIRE DES DOMAINES.

20

#### C. LE DOMAINE N-TERMINAL.

20

##### 1. Association fibronectine-fibronectine.

22

##### 2. Interactions avec l'actine.

22

##### 3. Interactions avec les bactéries.

23

#### D. DOMAINE DE FIXATION AU COLLAGENE.

23

#### E. DOMAINE D'ADHERENCE CELLULAIRE.

##### 1. Structure du domaine.

24

##### 2. Caractérisation de l'activité.

25

##### 3. Identification du récepteur cellulaire de la fibronectine.

25

#### F. DOMAINES DE FIXATION AUX PROTEOGLYCANES.

29

##### 1. Association avec l'héparine.

29

	Page
2. <u>Association avec les protéoglycannes à chondroïtines sulfates.</u>	30
3. <u>Association avec l'acide hyaluronique.</u>	31
G. <u>SITES DE FIXATION DE LA FIBRINE.</u>	31
H. <u>AUTRES INTERACTIONS.</u>	32

## V. HETEROGENEITES STRUCTURALES DES FIBRONECTINES.

A. <u>ETUDE COMPARATIVE DES DEUX SOUS-UNITES DE LA FIBRONECTINE.</u>	32
B. <u>DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE FIBRONECTINES PLASMATIQUE ET CELLULAIRE.</u>	33
C. <u>MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES FIBRONECTINES.</u>	
1. <u>Phosphorylation.</u>	36
2. <u>Sulfurylation.</u>	38
3. <u>Acylation.</u>	38
4. <u>Glycosylation.</u>	
a. Structure primaire des glycannes de la fibronectine.	
- La fibronectine plasmaticque.	38
- La fibronectine cellulaire.	40
- La fibronectine placentaire.	42
- La fibronectine du liquide amniotique.	42
b. Rôle des glycannes de la fibronectine.	43

## VI. BIOSYNTHESE ET REGULATION.

A. <u>LE GENE DES FIBRONECTINES.</u>	44
1. <u>Hypothèse d'un ou deux gènes.</u>	44
2. <u>Origine du gène de la fibronectine.</u>	45
3. <u>Isolement et caractérisation du gène de la fibronectine.</u>	45
B. <u>MATURATION DE L'ARNm.</u>	47
C. <u>REGULATION DE LA BIOSYNTHESE.</u>	47

## VII. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES FIBRONECTINES.

A. <u>L'ADHERENCE CELLULAIRE.</u>	
1. <u>In vivo.</u>	50
2. <u>In vitro.</u>	
a. Association avec le collagène.	52

	Page
b. Association avec les matériaux plastiques.	53
B. <u>MIGRATION CELLULAIRE ET CHIMIOTACTISME.</u>	
1. <u>Etudes in vitro.</u>	54
2. <u>Rôle de la fibronectine dans le développement embryonnaire.</u>	54
3. <u>Rôle de la fibronectine dans le processus de cicatrisation.</u>	55
a. Hémostase et formation du thrombus.	55
b. Assainissement des plaies.	56
c. Reconstitution du tissu lésé.	56
C. <u>FIBRONECTINE ET PHAGOCYTOSE.</u>	57
PROPRIETES OPSONISANTES DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE HUMAINE.	
D. <u>ROLE DE LA FIBRONECTINE DANS LES PHENOMENES DE MORPHOGENESE</u>	58
<u>ET DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE.</u>	

## VIII. FIBRONECTINE ET CANCER.

A. <u>INTRODUCTION.</u>	59
B. <u>DIMINUTION DE LA FIBRONECTINE DE LA SURFACE DES CELLULES</u>	60
<u>CANCEREUSES.</u>	
C. <u>CAUSES DE LA DIMINUTION DE LA FIBRONECTINE DES CELLULES</u>	62
<u>CANCEREUSES.</u>	
1. <u>Diminution de la synthèse de fibronectine.</u>	62
2. <u>Dégradation protéolytique de la fibronectine.</u>	62
3. <u>Modifications de la structure primaire de la protéine.</u>	63
4. <u>Perte du récepteur de la fibronectine.</u>	64
5. <u>Modification de la partie glycanique.</u>	64
D. <u>ETUDES AU NIVEAU DES TUMEURS IN SITU.</u>	65
E. <u>FIBRONECTINE ET METASTASE.</u>	66
F. <u>ETUDE CLINIQUE DU PLASMA.</u>	68

## IX. CONCLUSIONS.

69

## TRAVAUX PERSONNELS

<u>ETUDE STRUCTURALE DES GLYCANES DES FIBRONECTINES</u>	70
<u>DES CELLULES BHK21/C13 ET BHK21/C13-HSV.</u>	

	Page
I. <u>INTRODUCTION.</u>	71
A. <u>Modifications des structures des glycoprotéines de surface au cours de la transformation maligne.</u>	71
B. <u>Etude des cellules BHK21/C13 normales et transformées.</u>	72
II. <u>MEMOIRE.</u>	74
<p>Modifications de la structure des glycannes de la fibronectine provoquées par la transformation de cellules BHK 21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster. Hypothèse concernant l'essaimage métastatique par masquage des sites lectiniques de la fibronectine.</p>	
III. <u>DISCUSSION.</u>	80
 <b><u>ETUDE COMPAREE DES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES DES CELLULES BHK21/C13 ET BHK21/C13-HSV.</u></b>	 84
I. <u>INTRODUCTION.</u>	85
II. <u>MEMOIRE.</u>	89
<p>High sialylation of virus-transformed baby Hamster kidney cells fibronectin can be related to the increase of <math>\alpha</math>-2,3-sialyltransferase activity in relation to tri- and tetraantennary N-glycopeptidic acceptors.</p>	
III. <u>DISCUSSION.</u>	119
 <b><u>ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA GLYCOSYLATION SUR L'AFFINITE DE LA FIBRONECTINE POUR LE COLLAGENE.</u></b>	 121
I. <u>INTRODUCTION.</u>	122
A. <u>Choix du modèle expérimental.</u>	122
B. <u>Le type cellulaire.</u>	123
C. <u>Rôle des glycannes dans les activités biologiques de la fibronectine.</u>	123

	Page
II. <u>MATERIELS ET METHODES.</u>	124
A. <u>Matériels.</u>	124
B. <u>Purification de la fibronectine plasmatique.</u>	125
C. <u>Préparation d'un immunosérum monospécifique anti-pFn et couplage des anticorps sur Sepharose 4B.</u>	125
1. Préparation de l'immunosérum.	125
2. purification des anticorps et couplage sur Sepharose 4B.	126
D. <u>Culture cellulaire et purification de la fibronectine des milieux de culture des cellules HepG2.</u>	126
1. Culture cellulaire.	126
2. Purification de la fibronectine sécrétée par les cellules HepG2.	126
E. <u>Marquage métabolique et isolement des glycanes marqués.</u>	127
F. <u>Radio-iodation.</u>	127
G. <u>Purification du domaine de fixation au collagène.</u>	128
1. hydrolyse chymotrypsique de la fibronectine.	128
2. Purification du domaine de fixation au collagène.	128
H. <u>Déglycosylation.</u>	129
I. <u>Méthodes d'analyse.</u>	129
1. Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle.	129
a - Première dimension.	129
b - Deuxième dimension.	130
c - Visualisation des arcs de précipitation.	130
2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, électrotransfert et méthodes de coloration.	130
a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.	130
b - Méthodes de coloration.	130
3. Chromatographie d'affinité.	131
a - Chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B.	131
b - Chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel.	131
III. <u>RESULTATS.</u>	132
A. <u>MEMOIRE.</u>	133
Deglycosylation of chymotryptic collagen-binding fragment of human plasma fibronectin does not modify its affinity to denaturated collagen.	



	Page
B. <u>Etude de la fibronectine sécrétée par les cellules HepG2.</u>	143
1. Analyse par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle.	143
a - Etude préliminaire.	143
b - Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle.	143
2. Chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose des glycannes de la HepG2Fn.	146
3. Purification de la HepG2Fn.	149
4. Chromatographie d'affinité sur gélatine-Sepharose de la fibronectine native.	151
5. Purification du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.	153
a - Etude préliminaire.	153
b - Purification du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.	153
6. Déglycosylation enzymatique du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.	156
7. Chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn, natif et déglycosylé.	159
IV. <u>DISCUSSION.</u>	161

## CONCLUSIONS.

164

## BIBLIOGRAPHIE.

## ABBREVIATIONS.

Ac	: anticorps
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
Ag	: antigène
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
BHK21/C13	: lignée de fibroblastes de rein de Hamster
CAPS	: acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique
ConA	: lectine de <i>Canavalia ensiformis</i>
cpm	: coups par minute
dpm	: désintégrations par minute
EDTA	: éthylènediaminetétracétate de sodium
Fuc	: L-fucose
Gal	: D-galactose
GlcNAc	: N-acétyl-D-glucosamine
HEPES	: acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HepG2	: cellules d'hépatocarcinome humain
HepG2Fn	: fibronectine des cellules HepG2
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
HSv	: virus du sarcome du Hamster
Ig	: immunoglobulines
IgG	: immunoglobulines G
kDa	: kilodalton
Man	: D-mannose
$\alpha$ -Me.Glc	: $\alpha$ -méthyl-D-glucoside
Neu5Ac	: acide N-acétylneuraminique
Neu5Gc	: acide N-glycoloylneuraminique
PBS	: tampon phosphate 10 mM NaCl 0,154 M pH 7,2
pFn	: fibronectine plasmatique humaine
PMSF	: phényl méthylsulfonyl fluorure
SAB	: sérumalbumine bovine
SDS	: dodécylsulfate de sodium
TBS	: tampon Tris/HCl 10 mM NaCl 0.154 M pH 7,4
Tris	: (hydroxyméthyl)-aminométhane

## ABREVIATIONS DES ACIDES AMINES.

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

## ENZYMES.

$\alpha$ -Chymotrypsine (EC 3.4.21.1)

Galactose oxydase (D-galactose: oxygène 6-oxydoréductase; EC 1.1.3.9)

$\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23)

Neuraminidase (acyl-neuraminyl hydrolase; EC 3.2.1.18)

N-Glycanase (peptide: N-glycosidase F, peptide-N4-[N-acétyl- $\beta$ -glucosaminyl] asparagine amidase; EC 3.5.1.52)

Pronase (EC 3.4.21.4 et EC 3.4.24.4)

Sialyltransférase (CMP-acide-N-acétylneuraminique: glycoprotéine sialyltransférase; EC 2.4.99.1)

## INTRODUCTION.

La transformation maligne conduit à de profonds remaniements du métabolisme des cellules qui se traduisent par la modification de la morphologie cellulaire, la perturbation de la perméabilité membranaire, l'augmentation du nombre des mitoses et la perte de l'inhibition de contact, l'apparition de néo-antigènes membranaires et la perte de l'adhésion cellulaire.

Parallèlement, les glycoconjugués membranaires des cellules transformées sont considérablement modifiés. En particulier, il apparaît une simplification de la partie oligosaccharidique des glycolipides et une augmentation de l'antennarisation et de la sialylation des N-glycosylprotéines. Par ailleurs, les modifications de la copule glycannique et, en particulier, l'hypersialylation de ces structures semblent directement associées au pouvoir métastasant des cellules tumorales.

La fibronectine est une glycoprotéine de haute masse moléculaire, largement répandue dans le règne animal. Elle est présente sous une forme soluble dans le plasma et certains autres liquides biologiques et associée en structures multimériques à la matrice conjonctive qui entoure les cellules.

Dans de nombreux cas, les cellules transformées présentent un taux de fibronectine péricellulaire sensiblement plus faible que les cellules normales ce qui conduit à une désorganisation complète de la matrice extracellulaire. En effet, la forme cellulaire de cette glycoprotéine joue un rôle essentiel dans l'organisation de la matrice, formant un réseau fibrillaire dense, associée à la fois à la membrane des cellules et aux autres macromolécules structurales. Par ailleurs, la disparition de la fibronectine péricellulaire permet d'expliquer la perte de cohésion du tissu tumoral, ce qui ne peut que favoriser la dissociation des cellules, phase initiale de la diffusion métastatique.

L'ensemble de ces données nous a conduit à entreprendre l'étude de la partie glycannique de la fibronectine des cellules transformées. Ce travail s'inscrit dans un vaste programme de recherches entreprises au

laboratoire visant à déterminer la nature des modifications des glycanes des glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses et à identifier d'éventuels néo-antigènes de surface, spécifiques de ces cellules.

Notre étude comporte les trois parties suivantes.

1 - Analyse comparée des glycanes des fibronectines de fibroblastes de rein de Hamster normaux et transformés par le virus du sarcome du Hamster, analyse fondée sur l'utilisation d'un schéma de fractionnement des glycopeptides mis au point au laboratoire.

2 - Sur la base des résultats obtenus, nous avons comparé les activités sialyltransférasiques de ces cellules afin de tenter de définir les causes de l'hypersialylation de la fibronectine des cellules transformées.

3 - Etude de l'influence de la glycosylation sur l'affinité de la fibronectine vis-à-vis du collagène afin de déterminer les conséquences de l'augmentation de l'antennarisation et de la sialylation.

L'ensemble de nos recherches ont fait l'objet des 8 publications suivantes, les travaux rapportés dans le présent mémoire correspondant principalement aux publications 2, 4, 5, 7 et 8.

#### A. MEMOIRES.

1. J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE & P. DELANNOY.  
Lectins as oligosaccharide receptors.  
In "Structural Carbohydrates in the Liver", M. Popper, W. Reutter, E. Köttgen et F. Gudat eds, MTP Press, Boston (1983) 239-258.
2. P. DELANNOY, H. DEBRAY & J. MONTREUIL.  
Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation de cellules BHK 21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster. Hypothèse concernant l'essaimage métastatique par masquage des sites lectiniques de la fibronectine.  
C. R. Acad. Sci. (1985) 301, 767-772.

3. H. DEBRAY, Z. QIN, P. DELANNOY & J. MONTREUIL,  
D. DUS, & C. RADZIKOWSKI,  
B. CHRISTENSEN & J. KIELER.  
Altered glycosylation of membrane glycoprotein in human  
uroepithelial cell lines.  
Int. J. Cancer (1986) **37**, 607-611.
4. P. DELANNOY, H. DEBRAY & J. MONTREUIL.  
High sialylation of virus-transformed baby hamster kidney cells  
fibronectin can be related to the increase of  $\alpha$ -2,3  
sialyltransferase activity in relation to tri- and tetraantennary  
N-glycopeptidic acceptors.  
Eur. J. Biochem. (1989) acceptée pour publication.
5. P. DELANNOY & J. MONTREUIL.  
Deglycosylation of chymotryptic collagen-binding fragment of human  
plasma fibronectin does not modify its affinity to denaturated  
collagen.  
FEBS Lett. (1989) acceptée pour publication.

B. COMPTE-RENDUS DE CONGRES.

6. H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE & J. MONTREUIL.  
Isolation and characterization of glycopeptides from virus  
transformed baby hamster kidney fibroblasts (BHK cells).  
Proc. 7th Intern. Symp. Glycoconjugates, Lund - Roneby, 18-23  
juillet 1983, pp. 172.
7. P. DELANNOY, P. DEBEIRE, J. MONTREUIL & H. DEBRAY.  
Comparison of glycans structures of fibronectin released by normal  
and virus-transformed baby hamster kidney fibroblasts.  
Proc. 7th Intern. Symp. Glycoconjugates, Lund - Roneby, 18-23  
juillet 1983, pp. 173-174.
8. P. DELANNOY & J. MONTREUIL.  
Increased glycosylation of HepG<sub>2</sub> cells fibronectin weakens its  
affinity to denaturated collagène.  
Proc. 9th Intern. Symp. Glycoconjugates, Lille, 6-11 juillet 1987,  
pp. G130.

En outre, les communications suivantes ont été présentées dans des  
réunions scientifiques.

1. H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE & J. MONTREUIL.  
Isolation and characterization of glycopeptides from virus  
transformed baby hamster kidney fibroblasts (BHK cells).
  - 1st European Congress on Cell Biology, Paris, 18-23 juillet 1982,  
Biology of the Cell (1982) **45**, 303.
  - 11st Intern. Carbohydrate Symposium, Vancouver, 22-28 août 1982.

2. J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DELANNOY, G. SPIK & P. DEBEIRE.  
Are heavy glycans of glycoproteins tumor markers?
  - Colloquium on the Role of Carbohydrate in Cellular Recognition, Aussois, 18-24 mars 1984.
  - XXXIIIth Colloquium on Protides of the Biological Fluids, Bruxelles, 30 avril - 2 mai 1984.
3. H. DEBRAY, P. DELANNOY, J. MONTREUIL, D. DUS, C. RADZIKOWSKI, B. CHRISTENSEN & J. KIELER.  
Comparison of glycopeptides from normal human uroepithelial cell line HCV-29 and its malignant HCV-29 T variant.  
8th Intern. Symp. Glycoconjugates, Houston, 8-13 septembre 1985.
4. P. DELANNOY, H. DEBRAY & J. MONTREUIL.  
Structural modifications of fibronectin glycans related to the transformation of BHK 21/C13 cells by hamster sarcoma virus.  
Increase of sialyltransferase activity.  
Intern. Meeting on Glycoprotein Biosynthesis, Aussois, 16-22 mars 1986.

## **GENERALITES**



## I. HISTORIQUE.

La découverte de la fibronectine remonte à l'année 1948, quand elle fut mise en évidence par Morisson et al. (323) dans les cryoprécipités plasmatiques humains. Cette propriété lui valut le nom de "Cold Insoluble Globulin" ou CIG. Dans les premiers temps, cette forme plasmatique de la fibronectine ne fut que très peu étudiée.

La découverte par Hynes en 1973 (212) de la diminution de la surface des fibroblastes viro-transformés d'une glycoprotéine de haute masse moléculaire s'apparentant à la CIG et désignée par l'auteur sous le nom de "Large External Transformation Sensitive Protein" ou "LETS Protein" conduisit rapidement à l'intensification des recherches. Elle fut également caractérisée par plusieurs autres équipes dans les mois et les années qui suivirent et elle reçut les noms de Protéine Zéta (402), Galactoprotéine a (140) ou encore Bande I (371).

Ce n'est qu'en 1976 que le terme de fibronectine - du latin *fibra* (fibre) et *nectere* (lier) - apparut proposé par le groupe de Ruoslahti (275) afin de regrouper sous le même vocable les différentes formes de cette glycoprotéine. En effet, il était clair que la CIG du plasma et les glycoprotéines mises en évidence à la surface et dans les milieux de culture cellulaires étaient des formes très similaires d'une même molécule (421). Dans le même temps, le facteur anti-gélatine (522) et "l' $\alpha_2$ -opsonic protein" (53) furent également identifiées à la fibronectine plasmatique.

En raison du nombre considérable des travaux publiés au cours de ces dix dernières années, la fibronectine est, à l'heure actuelle, la glycoprotéine d'adhésion cellulaire la mieux connue, aussi bien au niveau structural qu'au niveau de son mode d'action. Ces études ont permis de montrer les relations étroites existant entre structure et fonctions. Notamment, la fibronectine est rapidement apparue comme composée de plusieurs domaines fonctionnels parfaitement indépendants, pouvant être isolés tout en conservant leurs activités biologiques. En outre, les analyses immunologiques et l'étude de la structure ont permis

de mettre en évidence l'hétérogénéité des différentes formes de cette molécule.

Capable de se fixer spécifiquement à la fois à la membrane cellulaire et à un certain nombre de macromolécules de la matrice extracellulaire, elle joue un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes biologiques nécessitant la fixation et la migration cellulaire aussi bien *in vivo* et *in vitro*. Ces différentes propriétés ont d'ailleurs fait l'objet de nombreuses revues générales (23,138,160,199,213,219,253,329,420,425,482,493,524,525,526,528).

## II. LOCALISATION DES FIBRONECTINES.

### A. LES FIBRONECTINES DANS L'EVOLUTION ANIMALE.

Découverte dans le sang, la fibronectine a été caractérisée par la suite dans les cultures de cellules eucaryotes et dans les tissus d'un nombre considérable d'espèces animales, généralement par immuno-fluorescence (Tableau I; p. 7). Une recherche systématique, effectuée, à l'aide d'anticorps radioactifs anti-fibronectine plasmatique humaine, a permis de la mettre en évidence chez toutes les espèces de Vertébrés étudiées. Elle a été également très souvent caractérisée chez les Invertébrés (6). L'apparition précoce de la fibronectine dans l'évolution animale est certainement le reflet de l'importance fondamentale de cette glycoprotéine adhésive dans le développement des organismes pluricellulaires. De plus, elle semble avoir conservé l'essentiel de sa structure. Le fait que la fibronectine d'organismes aussi éloignés des Vertébrés supérieurs, comme le Lombric ou la Crevette, puisse être détectée par un anticorps anti-fibronectine humaine sous-entend que cette molécule a conservé certains motifs structuraux depuis son apparition.

A cet égard, une étude comparative des fragments peptidiques a montré qu'il existait une très grande analogie structurale entre les fibronectines isolées de culture de fibroblastes de Poulet, de Souris,

Tableau I. Organismes dans lesquels la fibronectine a pu être caractérisée par des méthodes immunologiques.

	Références
Mammifères	456
Oiseaux	482
Reptiles	6
Amphibiens	6,395
Poissons	6,338
Tunicidés	6
Echinodermes	226,238,452
Crustacés	6
Annélides	6
Mollusques	6
Coelentérés	6
Spongiaires	6,99,279

de Hamster, de Rat et de fibroblastes humains (15), en particulier dans la région de fixation au collagène. Comme l'ont montré Sato et Hayashi (427), la spécificité d'espace de la fibronectine plasmatique humaine est portée par un domaine particulier situé entre le domaine de fixation au collagène et le domaine de fixation cellulaire.

#### B. FIBRONECTINES SOLUBLES.

La fibronectine se retrouve sous une forme soluble dans le sang. Elle est désignée sous le nom de fibronectine plasmatique ou anciennement "Cold Insoluble Globulin" (CIG). Le plasma humain contient en moyenne 300 mg de fibronectine par litre (324), cette concentration pouvant varier considérablement en fonction de l'état physiologique de l'individu. La concentration en fibronectine augmente chez les individus âgés (278,290) et dans des cas d'inflammation (7). On l'a retrouvée également, mais en quantité plus faible, dans les liquides biologiques tels que le liquide amniotique (272), le liquide céphalo-rachidien (276) et le liquide synovial (75).

#### C. FIBRONECTINES INSOLUBLES.

La fibronectine existe également sous une forme insoluble à la surface et dans la matrice extracellulaire des cellules fibroblastiques, endothéliales et épithéliales. Dans d'autres types cellulaires, comme les myoblastes et les cellules embryonnaires, la présence de fibronectine est fonction de l'état de différenciation (524,528). La fibronectine cellulaire s'organise en un réseau complexe de fibrilles qui peut être mis en évidence par immuno-fluorescence (Fig.1; p. 9). Ce réseau est associé à la fois à la surface cellulaire et aux autres molécules de la matrice, essentiellement les fibres de collagène et les protéoglycanes. A ce niveau, les molécules de fibronectine sont associées par des ponts disulfures inter-moléculaires et, dans certains cas, par des liaisons de covalence.

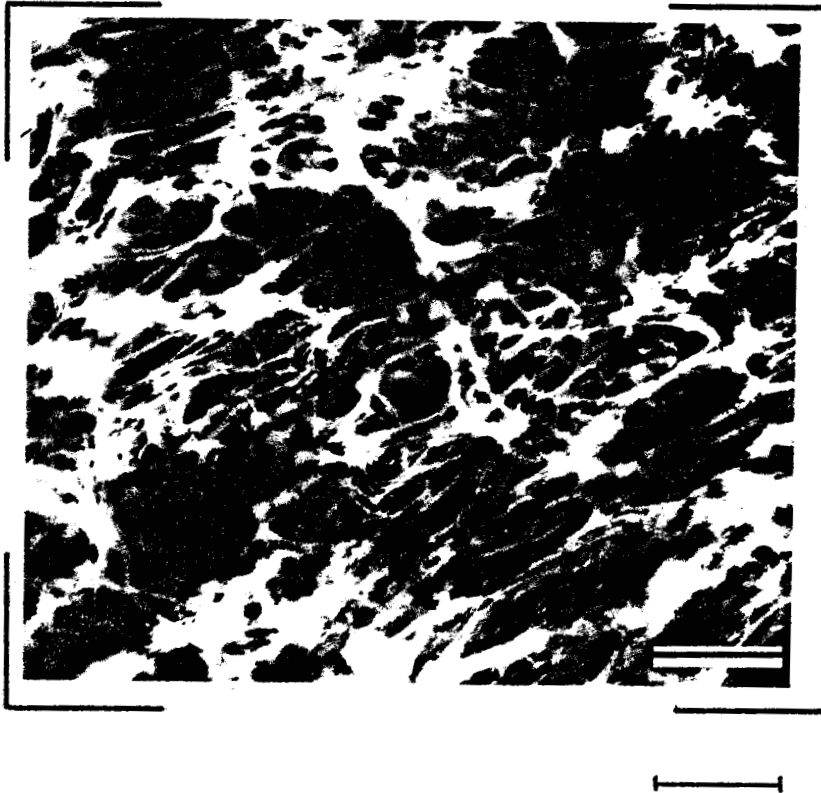


Fig. 1. Visualisation par immuno-fluorescence de la fibronectine dans la matrice extracellulaire de fibroblastes embryonnaires de poulet en culture confluente (528).

La barre en bas à droite indique l'échelle = 25 nm.

### III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FIBRONECTINES

#### A. CONFORMATION DE LA MOLECULE.

Comme le montre le Tableau II (p. 11), les fibronectines plasmatique et cellulaire ont des propriétés physico-chimiques tout à fait comparables mais leurs configurations spatiales sont nettement différentes.

##### 1. Conformation de la fibronectine plasmatique.

La fibronectine plasmatique est une molécule dimérique constituée de deux sous-unités de structures très voisines dont la masse moléculaire est comprise entre 225 et 240 kDa. Ces deux sous-unités sont reliées par deux ponts disulfures situés à l'extrémité C-terminale de la molécule (143). Ces sous-unités présentent une différence de masse moléculaire de 10-25 kDa en électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, effectuée en milieu réducteur. Elles possèdent des séquences N- et C-terminales identiques ce qui prouve que cette différence de masse n'est pas due à une protéolyse de l'une des extrémités.

Comme l'ont montré Erickson et Carrel par microscopie électronique (129), la conformation de la fibronectine plasmatique est fonction de la nature du solvant. Dans un milieu de faible force ionique, la molécule présente une conformation globulaire (404). Lorsque la concentration en sels augmente, la molécule prend une forme en V, beaucoup plus étirée (Fig. 2; p. 12). Chaque sous-unité a une longueur d'environ 70 nm et un diamètre de 2 nm.

Une élévation du pH de la solution possède un effet similaire. A pH basique, la fibronectine plasmatique a une conformation très étirée, ce qui se traduit par une diminution de la constante de sédimentation qui passe de 14 S à pH 7 à 8 S à pH 11 (129,283,403,517). Selon Homandberg

Tableau II. Propriétés physico-chimiques des fibronectines  
plasmatique et cellulaire.

Les résultats regroupés dans ce tableau sont extraits des travaux de Mosesson et Umfleet (326), Mosesson et al. (325), Yamada et al. (534), Vuento et al. (501), Alexander et al. (11,12) et Rocco et al. (404).

	Fibronectine plasmatique	Fibronectine cellulaire
Masse moléculaire	225-240 kDa	230-250 kDa
Structure	Dimérique	Dimérique et multimérique
Constante de sédimentation	12-14 S à pH 7 8,0 S à pH 11	8,5 S à pH 8 7,6 S à pH 11
Rayon de Stokes	960-1.450 nm	1.100 nm à pH 11
Volume spécifique partiel	0,72	0,72
Coefficient de friction	2,8 à pH 11 1,7 à pH 7	2,8-2,9 à pH 11 -
Point isoélectrique	5,5-6,2	5,5-6,2
Coefficient d'extinc- tion (ml/mg.cm)	1,28	1,20
Dichroïsme circulaire (minimum/maximum)	213/227 nm	212/227 nm
Solubilité	Soluble à pH 7 Soluble à pH 11	Insoluble à pH 7 Soluble à pH 11

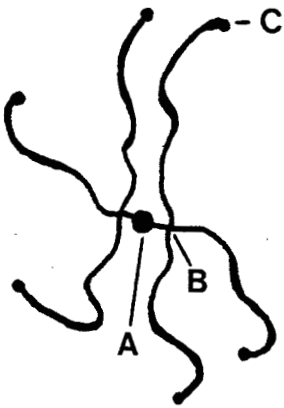
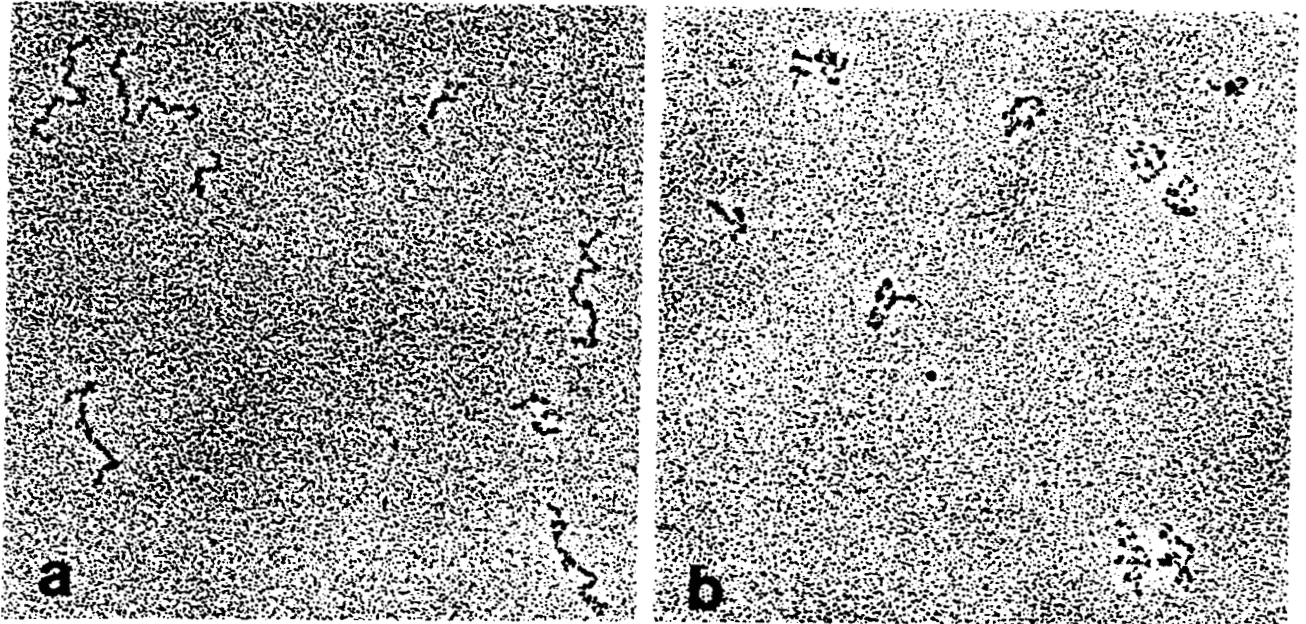
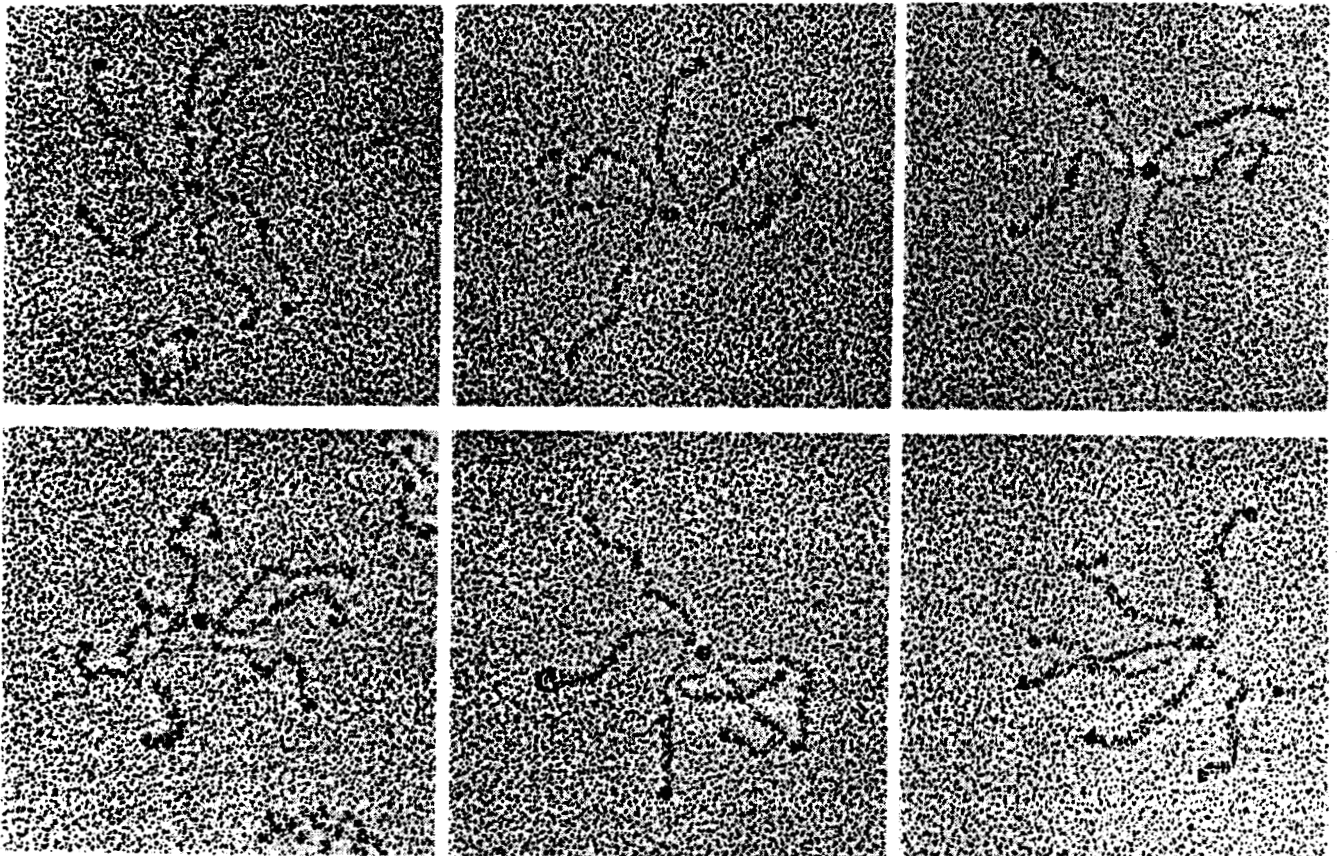


Fig. 2. Photographies en microscopie électronique (ombrage rotatif) de la fibronectine plasmatique et de la fibronectine cellulaire.

Ci-dessus: fibronectine plasmatique dans un milieu de forte (A) et de faible (B) force ionique (129). Ci-dessous: structure hexamérique de la fibronectine cellulaire de fibroblastes humains (130). Le dessin ci-contre schématise la structure d'un oligomère.





et Erickson (197), la structure globulaire de la fibronectine plasmatique serait due à des interactions entre certaines régions de la molécule, interactions pouvant être inhibées par une augmentation de la force ionique ou du pH. En outre, des mesures de dichroïsme circulaire et de spectrométrie infrarouge ont permis de montrer que la fibronectine présentait 79 % de structure en feuillet  $\beta$  et 21 % de coude  $\beta$  et qu'elle était dépourvue de structure en hélice  $\alpha$  (357,494).

## 2. Conformation de la fibronectine cellulaire.

La fibronectine cellulaire synthétisée par des cellules en culture ou extraite des tissus possède une structure comparable à celle de la fibronectine plasmatique. Sa masse moléculaire apparente, déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS est de l'ordre de 230 à 250 kDa (104,140,196,535). Elle peut exister sous forme dimérique, mais au niveau de la matrice extracellulaire, on la retrouve essentiellement sous une forme oligomérique ou multimérique, les molécules étant associées par l'intermédiaire de ponts disulfures (11,215,311,534). Une structure hexamérique isolée de cultures de fibroblastes humains (Fig. 2; p. 12) a pu être observée en microscopie électronique en ombrage rotatif par Erickson et Inglesias (130). Cette structure est constituée de trois dimères de fibronectine vraisemblablement associés par deux ponts disulfures au niveau de leurs extrémités C-terminales. Comme le montre le schéma présenté à la Fig 2 (p. 12), cet hexamère comprend un glomérule central (a), réunissant les monomères par deux jonctions en T (b), chaque monomère étant terminé par une protubérance (c).

Il existe, en effet, deux groupements thiols libres par monomère de fibronectine, l'un à proximité de l'extrémité C-terminale et l'autre dans la partie centrale de la molécule, à environ 170 kDa de l'extrémité N-terminale (447,504). Ces groupements thiols, impliqués dans la formation des multimères, pourraient également permettre la liaison entre des molécules de fibronectine et les molécules de la matrice extracellulaire, stabilisant ainsi le réseau fibrillaire.

## B. COMPOSITION EN ACIDES AMINES.

La fibronectine plasmatique humaine est une glycoprotéine relativement riche en proline et en cystéine (325). Comme le montre le Tableau III (p.15), la fibronectine sécrétée dans le milieu de culture de fibroblastes humains présente une composition en acides aminés très voisine de celle des fibronectines plasmatique et amniotique humaines. Bien que la fibronectine cellulaire soit légèrement plus riche en acides aminés hydrophobes, ces faibles variations ne suffisent pas à expliquer leurs différences de conformation.

## C. STRUCTURE PRIMAIRE.

L' enchaînement des 2265 résidus d'acides aminés composant la fibronectine plasmatique bovine vient d'être récemment publiée par Skorstengaard et al. (373,443-445). Cette étude a permis de mettre en évidence trois types d'homologies internes (type I, type II et type III), comme nous le montre la Fig. 3 (p. 16 et 17), suggérant qu'elle pourrait être le fruit de multiples duplications d'un gène originel (373). Cette séquence présente un haut niveau d'homologie avec celle de la fibronectine cellulaire humaine déduite de la séquence de son ADNc (266). Comme nous le verrons dans le chapitre V, un certain nombre de variations ont été mises en évidence entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dans la région C-terminale de la molécule. La séquence de la fibronectine plasmatique humaine n'a pas encore été totalement déterminée. Cependant, les différents fragments caractérisés pour le moment (72,142-145,155, 359) présentent un haut degré d'homologie avec la fibronectine cellulaire humaine (266) et de Rat (430). En outre, on retrouve dans toutes ces molécules les mêmes sous-domaines d'homologies internes décrits par Petersen et al. (373).

Tableau III. Composition en acides aminés des fibronectines plasmatique, amniotique et cellulaire humaines (34).

Résidus/1000 résidus			
	Fibronectine plasmatique	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
Glycine	87	88	90
Alanine	42	43	47
Cystéine <sup>a</sup>	24	25	23
Valine	76	73	77
Méthionine	10	11	12
Isoleucine	42	42	45
Leucine	51	56	61
Tyrosine	39	36	40
Phénylalanine	23	25	27
Histidine	21	20	23
Lysine	35	32	37
Arginine	51	50	52
Tryptophane	15	11	ND

<sup>a</sup> : déterminé par oxydation performique.

ND: non déterminé

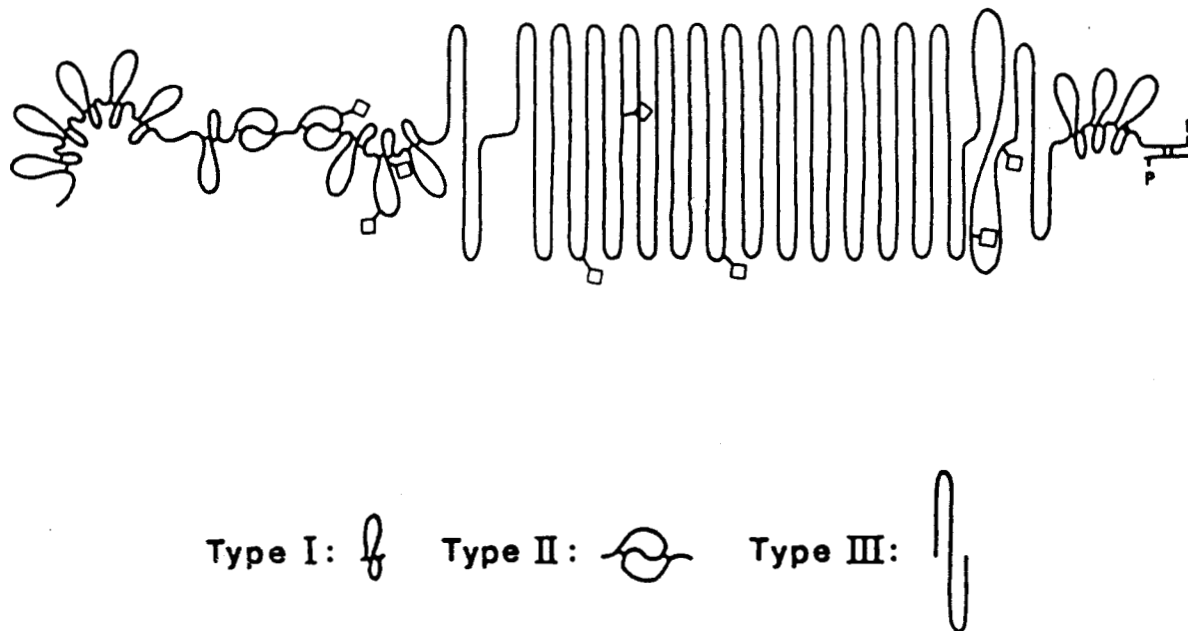


Fig. 3. Structure de la fibronectine plasmatique bovine (444).

Ci-contre. Structure primaire complète de la fibronectine plasmatique bovine (B) et comparaison avec la séquence de la fibronectine cellulaire humaine déduite de deux séquences d'ADNc (H), où seuls sont indiqués les acides aminés différents entre les deux molécules.

Ci-dessus. Modèle de l'une des chaînes de la fibronectine plasmatique bovine montrant les trois types d'homologies internes. Chacun des trois types d'homologies est représenté par un symbole précisé dans la ligne inférieure. Il existe au total 12 zones de type I, 2 zones de type II et 15 zones de type III. Les signes  $\diamond$  indiquent la position des glycannes.

#### IV. DOMAINES FONCTIONNELS DE LA FIBRONECTINE.

La fibronectine est capable de se fixer directement et spécifiquement à la membrane des cellules, à la paroi de certaines bactéries et à un certain nombre de macromolécules (voir Tableau IV; p. 19). Du fait de ces interactions, elle intervient dans différents mécanismes biologiques. La fixation de ces ligands intéresse des zones distinctes de la molécule et coïncide avec des domaines structuraux nettement définis.

L'analyse biochimique d'une protéine multifonctionnelle comme l'est la fibronectine est difficilement réalisable sur la molécule native. En particulier, la faible solubilité de cette glycoprotéine est un facteur limitant dans maintes expérimentations. Cependant, il est généralement possible d'isoler les domaines fonctionnels par chromatographie d'affinité après une dégradation protéolytique ménagée. En effet, la structure tertiaire de ces domaines est suffisamment stabilisée par de nombreuses liaisons ioniques et par des ponts disulfures intracaténaux pour leur conférer une plus grande résistance à l'action des protéinases.

##### A. PURIFICATION DES DOMAINES FONCTIONNELS DE LA FIBRONECTINE.

Deux méthodes d'isolement peuvent être employées pour purifier ces domaines. Dans les deux cas, on utilise comme support de chromatographie, un ligand immobilisé sur un support inerte. Ce ligand peut être soit une molécule qui interagit directement avec la fibronectine, soit un anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique du domaine recherché.

Dans le premier cas, la fibronectine purifiée est soumise à une protéolyse ménagée, le choix de l'enzyme étant conditionné par le domaine désiré. Après inhibition de l'enzyme, l'hydrolysate est chromatographié sur le support d'affinité et le fragment spécifique est élué soit par augmentation de la force ionique, soit par des agents chaotropiques tels que l'urée.

Dans le deuxième cas, la fibronectine est préalablement fixée sur le support d'affinité et soumise à l'action de l'enzyme. Cette méthode a pour avantage de mieux protéger le domaine recherché. Cependant, il est

Tableau IV. Différentes interactions des fibronectines.

	LIGANDS
A	Membrane des cellules eucaryotes, Gangliosides
B	Collagène natif (types I à V), Gélatine
C	Héparine et héparanes sulfates, Chondroïtines sulfates Acide hyaluronique
D	Fibrine, Facteur XIIIa transglutaminase Thrombospondine
E	Bactéries et Levures, Composant C1 <sub>q</sub> du complément
F	Actine, ADN

Tableau V. Principaux types de collagène (553).

LES COLLAGENES FIBRILLAIRES			
Type	Chaînes	Molécules	Tissus représentatifs
A - ASSOCIES AU TYPE I			
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ $[\alpha 1(I)]_3$	Peau, os, tendon, dentine. Dentine, peau (forme mineure).
III	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	Peau, vaisseaux.
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	$[\alpha 1(V)]_3$ $[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$ $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$	Culture de cellules de poumon de Hamster. Membranes foetales, os, peau. membranes synoviales, placenta.
B - ASSOCIES AU TYPE II			
II	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartilage hyalin, humeur vitrée.
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Cartilage hyalin.
LES COLLAGENES NON FIBRILLAIRES			
Type	Chaînes	Molécules	Tissus représentatifs
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	Membranes basales.
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	$\alpha 1(VI) \alpha 2(VI) \alpha 3(VI)$	Vaisseaux, peau, disque intervertébraux.
VII	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	Membranes foetales.
VIII	(?)	(?)	Cellules endothéliales, Membrane de Descemet.
		$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$	Membranes foetales, os, peau.
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Cartilage hyalin.
X	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$	Plaques de croissance.

nécessaire que les conditions d'hydrolyse soient compatibles avec la fixation du ligand et que ce dernier ne soit pas de nature protéique.

Citons enfin une méthode décrite récemment par Borsi et al. (56) permettant la purification des différents domaines de la fibronectine plasmatique humaine par chromatographie sur hydroxy-apatite (Bio-Rad Lab., USA) après hydrolyse par la thermolysine.

## B. ORGANISATION INTRAMOLECULAIRE DES DOMAINES.

Un schéma de l'organisation des différents domaines fonctionnels de la fibronectine est donné dans la figure 4 (p. 21) (126,433,492). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la molécule de fibronectine plasmatique est constituée de deux sous-unités de structures très voisines, reliées par deux ponts disulfures situés à l'extrémité C-terminale de la molécule (143,373,504). Les deux sous-unités renferment les mêmes domaines structuraux. Il existe cependant certaines différences entre les deux sous-unités dans la région C-terminale (183,398,431), différences qui seront décrites dans le chapitre V-A (p. 32).

## C. LE DOMAINE N-TERMINAL.

Le premier domaine structural, situé à l'extrémité N-terminale de la molécule, a la particularité de se fixer à un grand nombre de ligands. L'actine, la fibrine et la transglutaminase du facteur XIIIa, l'héparine et les héparanes sulfates, la paroi de *Staphylococcus aureus* ou de *Streptococcus pyogenes* interagissent avec ce fragment. Sa masse moléculaire est comprise entre 24 et 29 kDa (373,434,504,). La structure primaire du domaine N-terminal de la fibronectine plasmatique bovine (373) fait apparaître 259 résidus d'acides aminés organisés en 5 sous-domaines homologues de type I, stabilisés chacun par deux ponts disulfures intracaténaux.

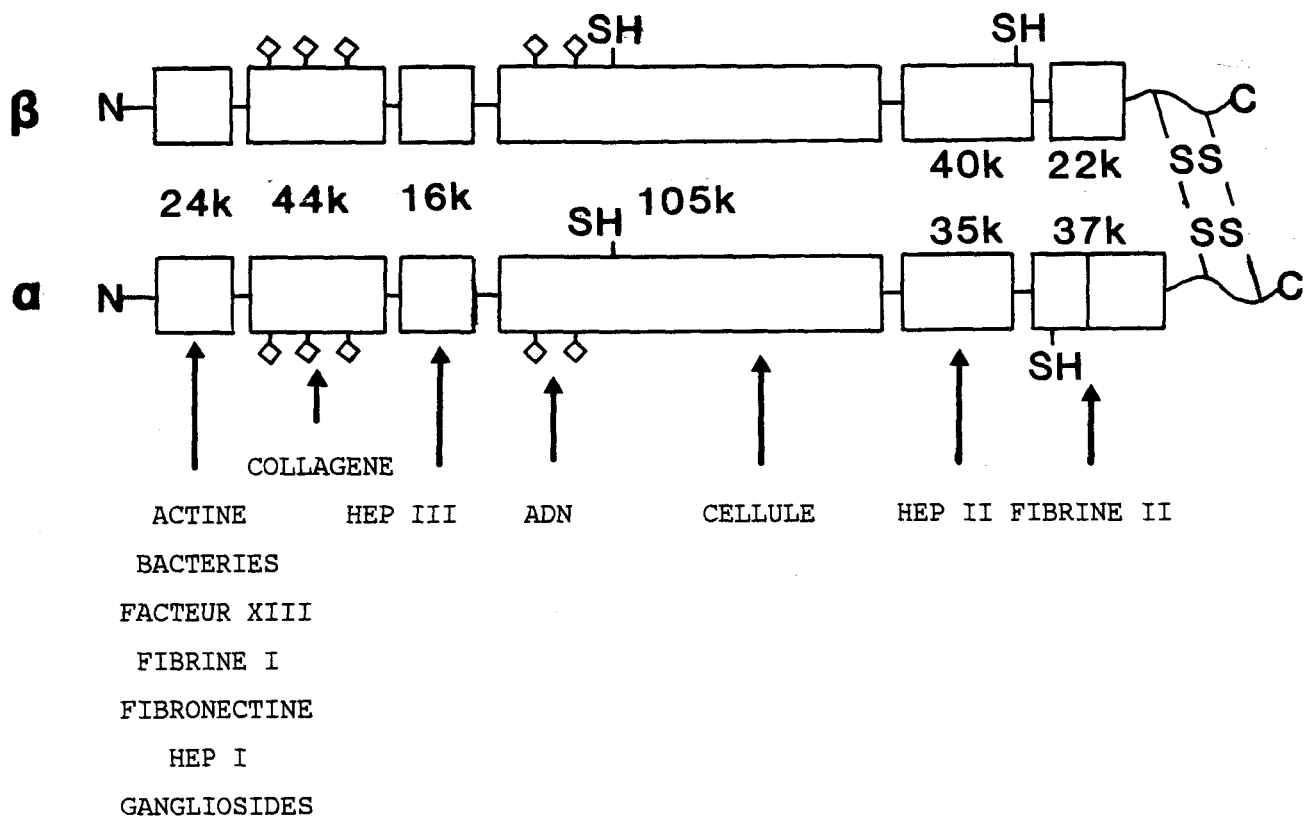


Fig. 4. Organisation des différents domaines fonctionnels de la fibronectine plasmatique humaine.

Les masses moléculaires ainsi que la nature des ligands de ces domaines sont indiquées dans la figure. Les signes  $\diamond$  précisent la position des glycanes substituant les chaînes peptidiques. **HEP I**, **HEP II** et **HEP III**: domaines de fixation à l'héparine et aux héparanes sulfates.



## 1. Association fibronectine-fibronectine.

Dans la matrice extracellulaire, la fibronectine s'organise en un réseau fibrillaire (76,188,189,311). Ce réseau est stabilisé par des ponts disulfures intermoléculaires et, dans certains cas, par des liaisons covalentes (215,242,311,327,534) catalysées par une transglutaminase faisant intervenir un résidu de glutamine de ce domaine N-terminal (229). En outre, la fibronectine peut également s'associer à la fibrine et au collagène sous l'action de cet enzyme (327,330,333).

Actuellement, le mécanisme de formation de la matrice de fibronectine est encore très mal connu. Mc Donald et al. ont montré que des anticorps dirigés contre le domaine N-terminal de la fibronectine inhibaient la formation d'une matrice fibrillaire normale dans des cultures de fibroblastes (309), prouvant ainsi la participation de ce domaine au mécanisme de formation de ces structures fibrillaires. Le domaine N-terminal intervient également lors de l'incorporation de la fibronectine plasmatique soluble dans la matrice (202,312,348). Cependant, la localisation et le rôle spécifique de cette région restent imprécis. Très récemment, Mc Donald et al. (310) ont indiqué que le domaine de fixation cellulaire participait lui aussi à l'assemblage de ce réseau matriciel, tout du moins dans sa phase initiale. En outre, ces mêmes auteurs ainsi que Spiegel et al. ont montré que des anticorps anti-fibronectine bloquant de manière compétitive la fixation au collagène inhibaient la formation de la matrice extracellulaire (309,453). Toutefois, à l'heure actuelle, les éventuelles relations existant entre la fixation de la fibronectine au collagène et l'organisation du réseau fibrillaire restent à définir.

## 2. Interactions avec l'actine.

Les fibronectines cellulaire et plasmatique interagissent avec les fibres d'actine (243,244,267) par l'intermédiaire du domaine N-terminal. Elle peuvent également interagir avec d'autres molécules du cytosquelette telles que la myosine et la tropomyosine, l' $\alpha$ -actinine et la vinculine. Ces interactions sont toutefois relativement faibles (269). Bien que l'hypothèse en ait été émise (87), l'existence d'interactions directes entre les microfilaments d'actine du cytosquelette et la

fibronectine extracellulaire est peu probable. En effet, l'actine demande à être dénaturée avant d'avoir une affinité pour la fibronectine. De plus, le complexe fibronectine-actine peut être phagocyté par les macrophages (267,317). Il est donc plus probable que cette fixation permettent l'élimination de débris cellulaires par les cellules phagocytaires.

### 3. Interactions avec les bactéries.

Ce fragment N-terminal se fixe à la paroi des bactéries des genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* (38,274,332,389). Cette association permettrait, d'une part, sa fixation sur la membrane de la cellule hôte, premier stade de l'infection et, d'autre part, favoriserait l'adhérence et l'ingestion du micro-organisme par les macrophages et les cellules réticulo-endothéliales (voir chapitre VII-C; p. 57).

Les interactions entre la fibrine, l'héparine et la fibronectine faisant intervenir plusieurs domaines de la molécule, seront présentées dans les chapitres IV-F (p. 29) et IV-G (p. 31).

### D. DOMAINE DE FIXATION AU COLLAGENE.

Le domaine de fixation au collagène possède une structure globulaire, résistante à la protéolyse. Sa masse moléculaire varie entre 40 et 44 kDa selon le type d'hydrolyse utilisé (33,156,170,419). Sa structure primaire a été déterminée pour la fibronectine bovine (445). Il est constitué de 340 résidus d'acides aminés et est stabilisé par 12 ponts disulfures. Ces derniers sont nécessaire au maintien de l'activité (518). Il renferme deux des trois types d'homologies internes (types I et II) décrites par Petersen et al. (373). En outre, le domaine est substitué par trois chaînes glycaniques. Dans la fibronectine bovine, les glycanes sont liés aux résidus d'asparagine situés en position 399, 497 et 511 (445). Une étude comparative de fibronectines de différentes

espèces animales a montré le haut degré de conservation de ce domaine (15) qui est, par voie de conséquence, très faiblement immunogène.

L'affinité de la fibronectine est variable selon le type de collagène (121,127,128,229,251,254). La fixation est inhibée par les détergents ioniques tels que le SDS, mais insensible à l'action des détergents non-ioniques (169). En outre, l'affinité augmente après dénaturation thermique de la structure en triple-hélice du collagène. En fait, il a été montré que la fibronectine se liait préférentiellement à la région la moins structurée de la triple-hélice du collagène (254).

Nous verrons plus loin que ces interactions permettent l'adhérence des cellules au collagène. Dans certains cas, la liaison peut être stabilisée sous l'action de la transglutaminase du facteur XIIIa par une liaison de covalence entre le collagène le domaine N-terminal de la fibronectine (330,333).

#### E. DOMAINE D'ADHERENCE CELLULAIRE.

##### 1. Structure du domaine.

Les interactions de la fibronectine avec la surface des cellules lui confère un rôle essentiel dans les mécanismes de l'adhérence cellulaire. Cette activité a tout d'abord été caractérisée au niveau d'un fragment de 145-155 kDa (171,308,417,432). Ce fragment est en fait constitué du domaine de fixation cellulaire, associé à un domaine spécifique de l'héparine (domaine Hep II) de 50 kDa. Le domaine de fixation cellulaire proprement dit, de 75 kDa, situé dans la partie centrale de la molécule, est obtenu par hydrolyse tryptique de la fibronectine (183).

Parallèlement, Grinnel et Minter (165), d'une part, et Carlsson et al. (74), d'autre part, ont montré que les interactions fibronectine-cellule pouvaient être inhibées par un immunosérum anti-fibronectine. S'appuyant sur ces résultats, Pierschbacher et al. (374) ont purifié un anticorps monoclonal ayant la propriété d'inhiber l'adhérence des cellules à la fibronectine. Grâce à cet anticorps, ils ont purifié un fragment peptidique de 11.5 kDa porteur de l'intégralité de l'activité.

Ce fragment, représenté dans la figure 5 (p. 26), est constitué de 108 résidus d'acides aminés - dont 9 résidus de proline, ce qui lui confère une structure très repliée (378).

## 2. Caractérisation de l'activité.

Afin de déterminer la nature du site de reconnaissance, Pierschbacher et al. (375) ont étudié l'activité biologique de peptides synthétiques calqués sur la structure primaire du peptide de 11,5 kDa. des expériences d'inhibition de l'adhérence cellulaire, réalisées à l'aide de peptides de taille de plus en plus faible, leur ont permis d'identifier un chaînon de quatre acides aminés: Arg-Gly-Asp-Ser, capable d'inhiber de manière compétitive la fixation de la fibronectine aux cellules. Dans cette séquence, le tripeptide Arg-Gly-Asp est indispensable, alors que la sérine peut être remplacée par certains autres acides aminés (376-377,529).

Comme l'indique le Tableau VI (p. 27), la séquence Arg-Gly-Asp-X (où X = Ser ou un autre résidu d'acide aminé compatible avec l'activité) se retrouve dans la structure primaire de protéines d'origines diverses. Il est à noter que la plupart de ces protéines sont susceptibles d'interagir avec la membrane cellulaire. A l'heure actuelle, on ne peut pas affirmer que toutes ces molécules se fixent à la surface cellulaire par l'intermédiaire de ce chaînon. Cependant, le tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser est capable d'inhiber la fixation sur les plaquettes de la fibronectine, du fibrinogène et du facteur Von Willebrand (147,152,178,380). De même, il semble que le collagène de type I se fixe à la membrane plasmique par l'intermédiaire de cette séquence mais au niveau d'un site récepteur différent de celui de la fibronectine (118).

## 3. Identification du récepteur cellulaire de la fibronectine.

L'existence d'interactions spécifiques entre la fibronectine et la surface cellulaire implique la présence d'un récepteur membranaire. Bien que recherché depuis plusieurs années, la nature de ce récepteur n'a été que tout récemment précisée et ceci grâce en partie à la découverte du tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser.

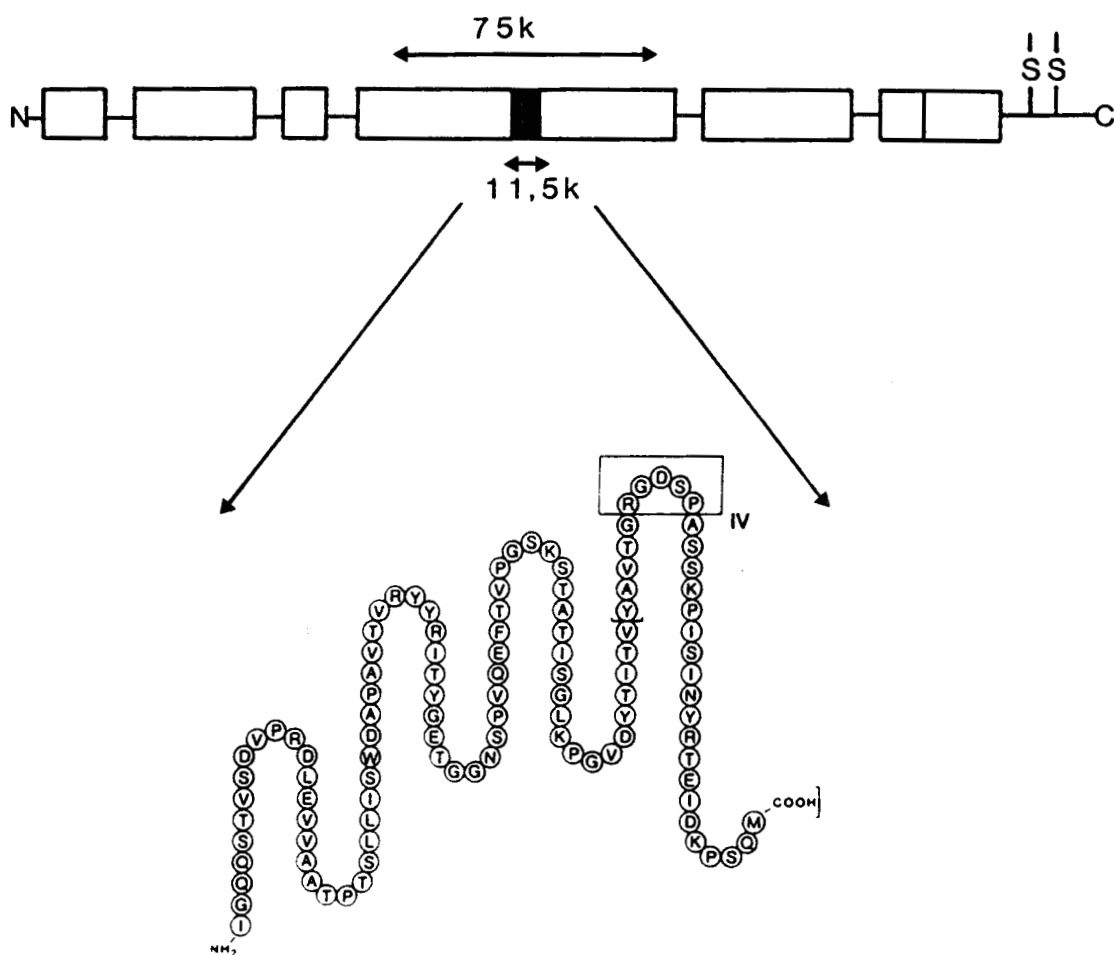


Fig. 5. Structure primaire du fragment peptidique de 11,5 kDa de la fibronectine.

Ce peptide de 108 acides aminés, obtenu par hydrolyse trypsique du domaine de fixation cellulaire de 75 kDa, comporte une série de coudes  $\beta$ . Le site de fixation, constitué des quatre acides aminés Arg-Gly-Asp-Ser (encadré), se trouve dans la partie la plus hydrophile de ce fragment (378). Le code à une lettre des acides aminés est indiqué dans les pages d'introduction.

Tableau VI. Protéines contenant la séquence Arg-Gly-Asp-X<sup>(a)</sup> responsable de la fixation à la membrane plasmique des cellules (377).

Séquence <sup>(b)</sup>	Protéine	Origine	Référence
RGD-S	Protéine $\alpha$ -lytique	Myxobacter 495	354
	Protéine basique du testicule	Rat	249
	Fibrinogène (chaîne $\alpha$ )	Homme	509
	Récepteur $\checkmark$	<i>E. Coli</i>	94
	Facteur de Von Willebrand	Homme	476
	Polyprotéine de la membrane	Virus Sindbis	396
	Vitronectine	Homme	462
	Protéine virale I	Virus de la fièvre aphteuse	412
Ostéopondine	Rat	350	
RGD-A	Collagène type I (chaîne $\alpha 1$ )	Homme, Vache	315
	Collagène type I (chaîne $\alpha 2$ )	Poulet	315
	Thrombine	Homme, Vache	294
	Discoïdine I (chaîne A)	<i>Dictyostelium discoïdeum</i>	384
	Vitellogénine I (précurseur)	Drosophile	206,211
	3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase	Porc	50
RGD-T	Collagène type I (chaîne $\alpha 2$ )	Homme	47
	Protéine P1	Virus A de l'influenza	49,521

(a) : où X = Ser ou un autre acide aminé compatible avec l'activité.

(b) : le code à une lettre des acides aminés est indiqué dans les pages d'introduction.

La nature polypeptidique de ce récepteur était prévisible. En effet, seul l'existence d'un récepteur transmembranaire capable d'interagir à la fois avec la fibronectine et les molécules du cytosquelette pouvait expliquer les changements cytomorphologiques induits par la fibronectine (344). D'autre part, certains auteurs ont montré que la fixation de la fibronectine pouvait être inhibée par une protéolyse ménagée des cellules (8,356,469). En outre, Akiyama et al. ont observé qu'il existait environ  $5 \times 10^5$  sites de fixation de la fibronectine sur les fibroblastes de rein de Hamster et que la constante de dissociation (Kd) avoisinait  $8,0 \times 10^{-7}$  pour la glycoprotéine native et  $4,0 \times 10^{-7}$  pour le domaine de fixation cellulaire de 75 kDa (5). Dans le cas des hépatocytes de Rat, le nombre de récepteurs exprimés par cellule est d'environ  $2,8 \times 10^5$  et le Kd est de  $1,7 \times 10^{-8}$  pour le fragment de 75 kDa (231).

Ce récepteur a été isolé en 1985 à partir de différents types de cellules, soit, par chromatographie d'affinité en utilisant comme ligand le fragment de 75 kDa de la fibronectine et élution par le tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser (363,393), soit par purification d'un anticorps monoclonal spécifique de ce récepteur (9,64,146,149,205). Il s'agit d'un complexe transmembranaire constitué d'au moins deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , de masse moléculaire variant de 125 à 140 kDa et associées de manière non covalente. Ces deux sous-unités ont apparemment des structures très voisines (65). Leurs structures viennent d'être déduites de la séquence du ADNc correspondant (24). Horwitz et al. (204) ont prouvé que ce complexe transmembranaire interagissait avec la taline (287), une protéine du cytosquelette. Chen et al. (88), Krotoski et al. (271) et Duband et al. (123) ont montré l'implication de ce récepteur dans les phénomènes de migration et de différenciation des cellules embryonnaires (voir chapitre VII; p. 50). Enfin, il semble que ce récepteur puisse interagir avec d'autres macromolécules adhésives telles que la laminine (204) ou la vitronectine (187,392).

Il est certain que l'étude de ce récepteur et de ses interactions avec les molécules du cytosquelette permettra de mieux définir comment les molécules de la matrice extracellulaire et, en particulier, la fibronectine influencent la morphologie et le métabolisme des cellules.

Cependant, bien que récepteur joue un rôle primordial dans les interactions fibronectine-cellule, l'existence d'un deuxième site de

fixation a été proposée par Urushihara et Yamada (481). A cet égard, Mc Carthy et al. ont montré qu'un domaine de 33 kDa, situé dans la région C-terminale de la molécule, stimulait l'adhérence de cellules de mélanome de Souris B16-F10 (307).

Enfin, certaines études ont révélé que la fibronectine était capable d'interagir avec les gangliosides (255,303,375,527,530). Thompson et al. ont récemment localisé le site de fixation des gangliosides au niveau du domaine N-terminal de la molécule, nettement distinct du domaine de fixation cellulaire (475). De plus, Cheresch et al. (89,90) ont montré que les gangliosides GD<sub>2</sub> et GD<sub>3</sub> étaient impliqués dans l'attachement de cellules de mélanome humain sur la fibronectine.

Il semble donc que les interactions entre la fibronectine et la membrane cellulaire fassent intervenir un ou plusieurs autres systèmes interactifs qui pourraient avoir comme fonction de stabiliser ou de moduler la liaison entre la fibronectine et la membrane cellulaire induite par la fixation du fragment Arg-Gly-Asp-Ser sur son récepteur.

#### F. DOMAINES DE FIXATION DES PROTEOGLYCANNES.

La fibronectine se fixe à différents types de protéoglycannes, héparine et héparanes sulfates, chondroïtines sulfates et acide hyaluronique. Ces différentes interactions ont certainement un rôle important dans l'organisation de la matrice extracellulaire (42,400).

##### 1. Association avec l'héparine.

L'héparine favorise l'organisation en fibrilles des molécules de fibronectine (230) et semble aussi augmenter sa fixation à la surface cellulaire. En outre, la formation d'un complexe héparine-fibronectine augmente considérablement l'affinité de cette dernière pour le collagène de type III (230). Les propriétés des principaux types de collagène sont résumées dans le Tableau V (p. 19).

L'étude des interactions entre la fibronectine et l'héparine a permis de distinguer au moins deux sites de fixation d'affinités différentes. Les constantes de dissociation respectives de ces deux sites ont pu être estimées à  $1 \times 10^{-6}$  M et  $3,5 \times 10^{-8}$  M (42). Parallèlement,



l'hydrolyse ménagée a permis de caractériser trois régions distinctes de la fibronectine capable d'interagir avec l'héparine (Hep I, Hep II et Hep III de la figure 4; p. 21).

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre IV-C, le domaine N-terminal de la fibronectine présente une affinité pour l'héparine (155,180, 399,431,432). L'activité de ce domaine nécessite la présence d'une concentration physiologique en ions calcium, les autres ions divalents n'ayant aucun effet sur la fixation de l'héparine (181). L'affinité de ce domaine peut être inhibée par une concentration de 0,25 M en NaCl (399).

Un deuxième site d'affinité a été localisé dans la partie C-terminale de la molécule (155,180,182,399,418,431,432). Ce domaine Hep II, inclus entre le domaine de fixation cellulaire et la partie C-terminale (Fig. 4; p. 21), a une masse moléculaire comprise entre 29 et 36 kDa (155). Il s'agit d'un fragment peptidique globulaire, compact, bien qu'il ne soit pas stabilisé par des ponts disulfures intracaténaux (179). L'affinité de ce domaine est plus élevée que celle du domaine N-terminal et peu sensible à la force ionique (399). Elle est insensible à la concentration en ions divalents mais peut être inhibée par une concentration en NaCl de 0,5 M (179,181,399).

Enfin, un troisième site de fixation a été mis en évidence dans la région centrale de la molécule (155). Il coïncide avec un domaine spécifique de la fibrine (Fig. 4; p. 21). Il présente une très faible affinité pour l'héparine (155) et la fixation est inhibée par une concentration physiologique en ions divalents (180,181).

Pour le moment, on ne connaît pas encore la nature des interactions qui régissent l'association de la fibronectine avec l'héparine. Il semble que la fixation soit fonction de la masse moléculaire et du degré de sulfatation du polysaccharides (346). Cependant, la présence de trois sites de fixation distincts laisse supposer l'existence d'un mécanisme complexe pouvant avoir une influence sur la conformation de la fibronectine.

## 2. Association avec les protéoglycannes à chondroïtines sulfates.

La fibronectine se fixe aux protéoglycannes à chondroïtines sulfates (260,261,351,397) mais n'a pas d'affinité détectable vis-à-vis des

polysaccharides libres (351,531). Ces interactions sont capables d'inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine (260,261,397).

### 3. Association avec l'acide hyaluronique.

La fibronectine s'associe à l'acide hyaluronique (201,230,415,531) par l'intermédiaire d'un site distinct de ceux de l'héparine, la saturation de l'un des sites ne modifiant pas la fixation de l'autre molécule. En outre, les cinétiques de fixation sont différentes. Ce site possède une haute spécificité pour la séquence oligosaccharidique [GlcUA( $\beta$ 1-3)-GlcNAc( $\beta$ 1-4)]<sub>4-5</sub>. La liaison entre fibronectine et acide hyaluronique est peu sensible à la force ionique du milieu et elle est stable à une concentration de 2 M en NaCl (223,531). A fortes concentrations, l'acide hyaluronique diminue l'affinité de la fibronectine pour le collagène et la surface cellulaire, vraisemblablement par un effet de masquage des sites (230).

### G. SITES DE FIXATION DE LA FIBRINE.

La fibronectine interagit avec la fibrine et, à un degré moindre, avec le fibrinogène. Comme nous le verrons au chapitre VII-B (p. 54), la fibronectine intervient dans la formation du caillot sanguin et permet la migration des cellules fibroblastiques lors de la cicatrisation du tissu. Le complexe fibronectine-fibrine est stabilisée par des liaisons de covalence sous l'effet de la transglutaminase du facteur XIIIa (327,328). Cette réaction s'effectue entre un résidu de glutamine du domaine N-terminal de la fibronectine et un résidu de lysine de la chaîne  $\alpha$  de la fibrine (225,327,331). Ces liaisons permettent d'augmenter la rigidité du caillot (237). La fibronectine peut se lier à un gel de fibrine dans lequel les chaînes  $\alpha$  et  $\tau$  sont totalement polymérisées. Ceci implique que le site de liaison fibronectine-fibrine est différent de celui qui permet la polymérisation des molécules de fibrine.

La fibronectine présente vraisemblablement trois domaines de fixation à la fibrine. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le domaine

N-terminal possède une forte affinité pour la fibrine (203,431) et permet la polymérisation du complexe.

Un deuxième site a été identifié dans la partie centrale de la molécule (128,431), entre le domaine d'adhésion cellulaire et le domaine de fixation au collagène (Fig. 4; p. 21).

Enfin, un domaine de faible affinité a été caractérisé dans la région C-terminale de la molécule (183,431). Du fait de la variabilité de cette zone de la molécule, ce domaine n'est pas toujours été identifié. par exemple, la fibronectine plasmatique de hamster ne possède ce site que sur l'un de ses monomères (183,431,433).

#### H. AUTRES INTERACTIONS.

La fibronectine est capable d'interagir avec un certain nombre d'autres macromolécules. En particulier, elle se fixe au ADN par l'intermédiaire d'un site localisé dans le fragment tryptique de 75 kDa, porteur du domaine de fixation cellulaire (181,541). Enfin, elle s'associe également à la thrombospondine (282), protéine contenue dans les granules  $\alpha$  des plaquettes sanguines et libérée lors de la dégranulation.

### V. HETEROGENEITES STRUCTURALES DES FIBRONECTINES.

#### A. ETUDE COMPARATIVE DES DEUX SOUS-UNITES DE LA FIBRONECTINE.

En électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, réalisée en présence d'un agent réducteur des ponts disulfures, la fibronectine apparaît sous la forme d'un doublet rapproché. Ceci provient du fait que les deux monomères possèdent une masse moléculaire légèrement différente (273). Hayashi et Yamada (183), Richter et Hörmann (398) et Sekiguchi et Hakomori (433) ont comparé la structure de ces deux sous-unités. L'étude des domaines obtenus par une protéolyse ménagée de la molécule leur a

permis de montrer que les différences de structure se situaient dans la partie C-terminale (Fig. 6; p. 34). Une hydrolyse de la fibronectine par la cathepsine D génère deux fragments C-terminaux différents, de 60 kDa pour la chaîne  $\beta$  et de 70 kDa pour la chaîne  $\alpha$ . Malgré cette différence de masse moléculaire de 10 kDa, les deux fragments renferment chacun un site de fixation à l'héparine (domaine Hep II) et un site de fixation à la fibrine (domaine Fib II). Le domaine Fib II peut être obtenu par l'action de la thermolysine. Il est identique dans les deux sous-unités et a une masse moléculaire avoisinant 20-22 kDa. Par contre, il apparaît une différence de masse moléculaire de 5 kDa entre les domaines Hep II des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Enfin, l'hydrolyse trypsique montre qu'il existe entre les domaines Hep II et Fib II de la sous-unité  $\alpha$ , un fragment peptidique d'environ 10 kDa qui n'a pu être identifié dans la sous-unité  $\beta$  (433).

Récemment, Storstengaard et al. (444) ont publié la structure primaire complète de la fibronectine plasmatique bovine. Les deux sous-unités de cette molécule diffèrent au niveau d'un fragment désigné IIIICS ("type III connecting segment"), situé dans la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique. Ces auteurs, en compilant leurs résultats avec les séquences de la fibronectine d'hépatocytes de Rat (430) et de la fibronectine de fibroblastes humains (46,263,480), déduites toutes deux de la séquence des ARNm correspondants, ont montré qu'il existait au moins cinq variants de cette région IIIICS dont la taille peut varier de 0 à 120 acides aminés (Fig. 7; p. 35). Il est à noter que tous les variants n'ont pas été identifiés dans la fibronectine plasmatique bovine, la répartition étant fonction de l'origine de la molécule. Selon certains auteurs, cette zone de la molécule pourrait être porteuse de la spécificité d'espèces et/ou de la spécificité tissulaire de la fibronectine (46,144). En outre, ces auteurs ont montré que ce fragment était glycosylé (Fig. 7; p. 35).

#### B. DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE FIBRONECTINES PLASMATIQUE ET CELLULAIRE.

Hormis les variations observées au niveau du sous-domaine IIIICS, les structures primaires des fibronectines plasmatique et cellulaire

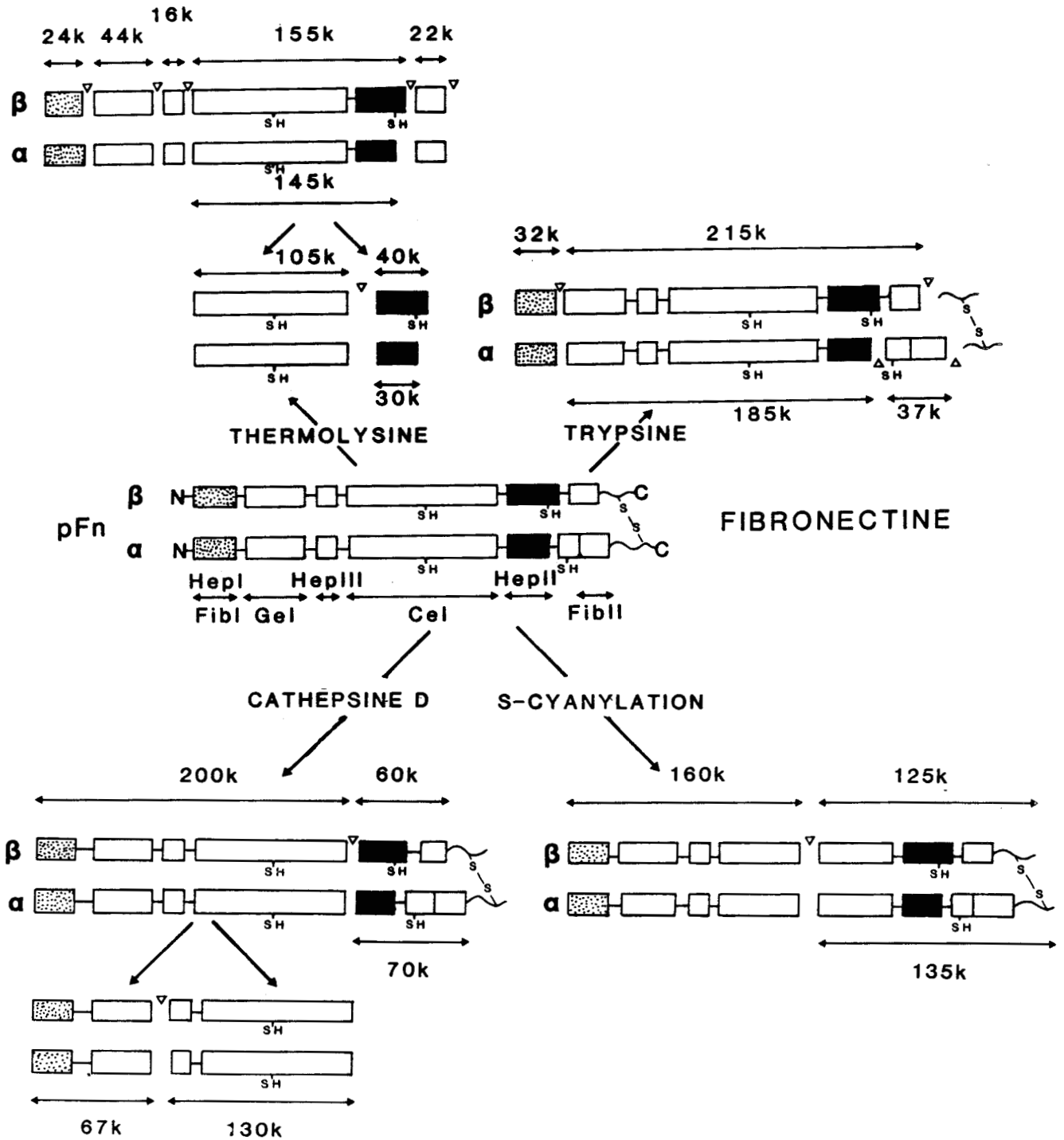
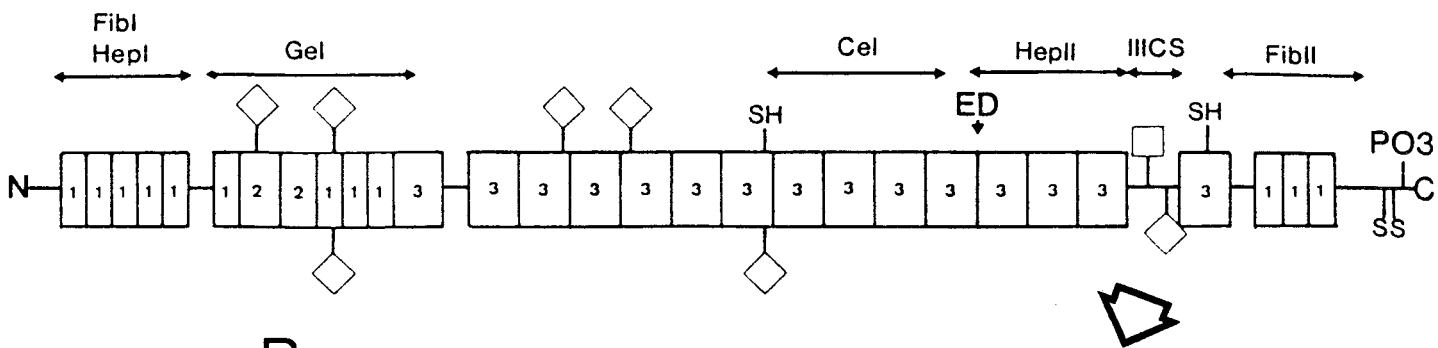


Fig. 6. Modèle de la fragmentation protéolytique de la fibronectine plasmatique humaine (433).

Ce schéma indique la nature des principaux fragments obtenus par hydrolyse ménagée de la fibronectine plasmatique humaine par la cathépsine D, la thermolysine et la trypsine. Des différences de structure entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ont été observées dans la partie C-terminale de la molécule. Les masses moléculaires sont exprimées en kDa.

Cel : domaine de fixation cellulaire; Fib I et Fib II: domaines de fixation à la fibrine; Gel: domaine de fixation au collagène; Hep I, Hep II et Hep III: domaines de fixation à l'héparine.

A



B

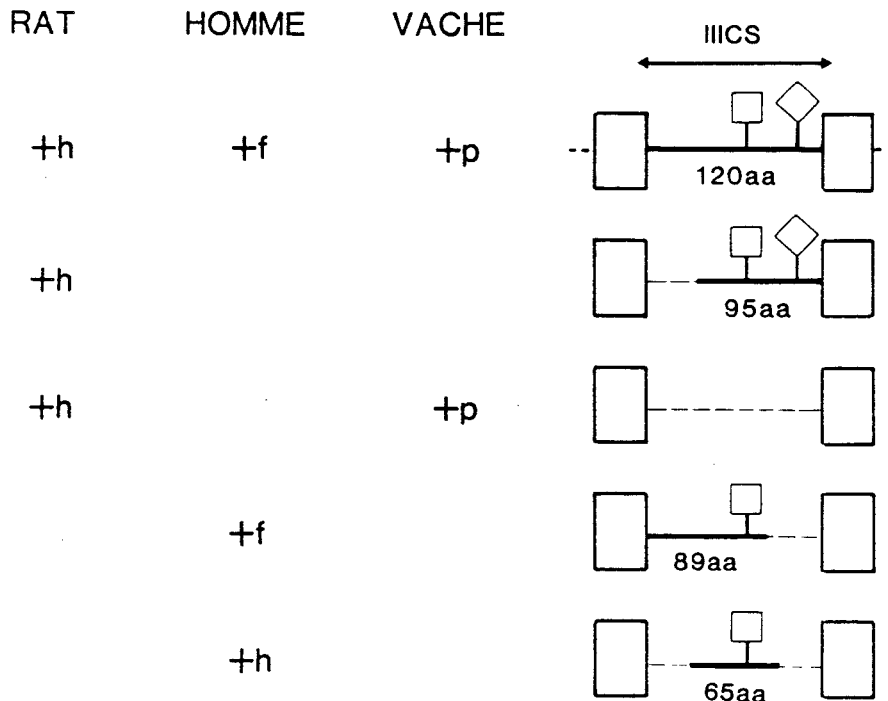


Fig. 7. Schéma d'une sous-unité de la fibronectine plasmatique bovine, montrant l'organisation des sous-domaines homologues décrits par Petersen et al. (373) et la position des domaines variables.

**A.** Chaque symbole représente un sous-domaine homologue, identifié 1, 2 ou 3 selon le type d'homologie (voir Fig. 3; p. 17). **ED** indique la position du sous-domaine de type III ("extra domain") présent dans certaines fibronectines cellulaires (264). Le sous-domaine variable **IIIICS** est situé à l'extrémité C-terminale, entre les domaines **Hep II** et **Fib II**.

**B.** Schéma des différents variants du sous-domaine **IIIICS**. A gauche sont indiquées les espèces dans lesquelles chaque variant a été identifié.

◊ , glycanes liés N-glycosidiquement; ◻ , glycanes liés O-glycosidiquement (la glycosylation est celle de la fibronectine plasmatique bovine).

h, hépatocytes; f, fibroblastes; p, plasma.

différent dans une région située à environ 70 kDa de l'extrémité C-terminale. En effet, Kornblihtt et al. (264) ont pu isoler à partir de fibroblastes humains deux RNAm codant pour la fibronectine. L'un de ces RNAm possède un chaînon supplémentaire, désigné ED ("extra domain"), codant pour un domaine de 90 acides aminés (Fig. 7; p. 35). Ce domaine surnuméraire semble être absent de la fibronectine plasmatique (264) et apparaît comme l'une des différences structurales majeures observées entre les fibronectines solubles et insolubles de la molécule.

A la suite de ces observations, ces mêmes auteurs ont montré que les deux RNAm provenaient apparemment d'un même gène et que la disparition du domaine ED était le résultat de l'excision d'un exon spécifique (265).

La comparaison des fragments protéolytiques obtenus à partir de la fibronectine plasmatique humaine et de la fibronectine de fibroblastes humains (434) a confirmée les observations effectuées au niveau des RNAm. En particulier, comme le montre la figure 8 (p. 37), la fibronectine cellulaire humaine présente un domaine C-terminal de fixation à l'héparine (Hep II) de masse moléculaire plus élevée que la fibronectine plasmatique (95,434).

Pour le moment, les relations existant entre cette hétérogénéité structurale et les propriétés physico-chimiques et biologiques des fibronectines restent encore inconnues.

### C. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES FIBRONECTINES.

#### 1. Phosphorylation.

La fibronectine plasmatique humaine possède vraisemblablement deux sites de phosphorylation (16,364). Le premier est situé au niveau de l'extrémité C-terminale, dans la région où les deux sous-unités sont associées par deux ponts disulfures. Un second site a été caractérisé au niveau du domaine C-terminal de fixation à la fibrine (Fib II). Les groupements phosphates substituent des résidus de sérine et le taux de phosphorylation est variable. En particulier, il semble augmenter dans les fibronectines synthétisées par les cellules transformées (14,17).

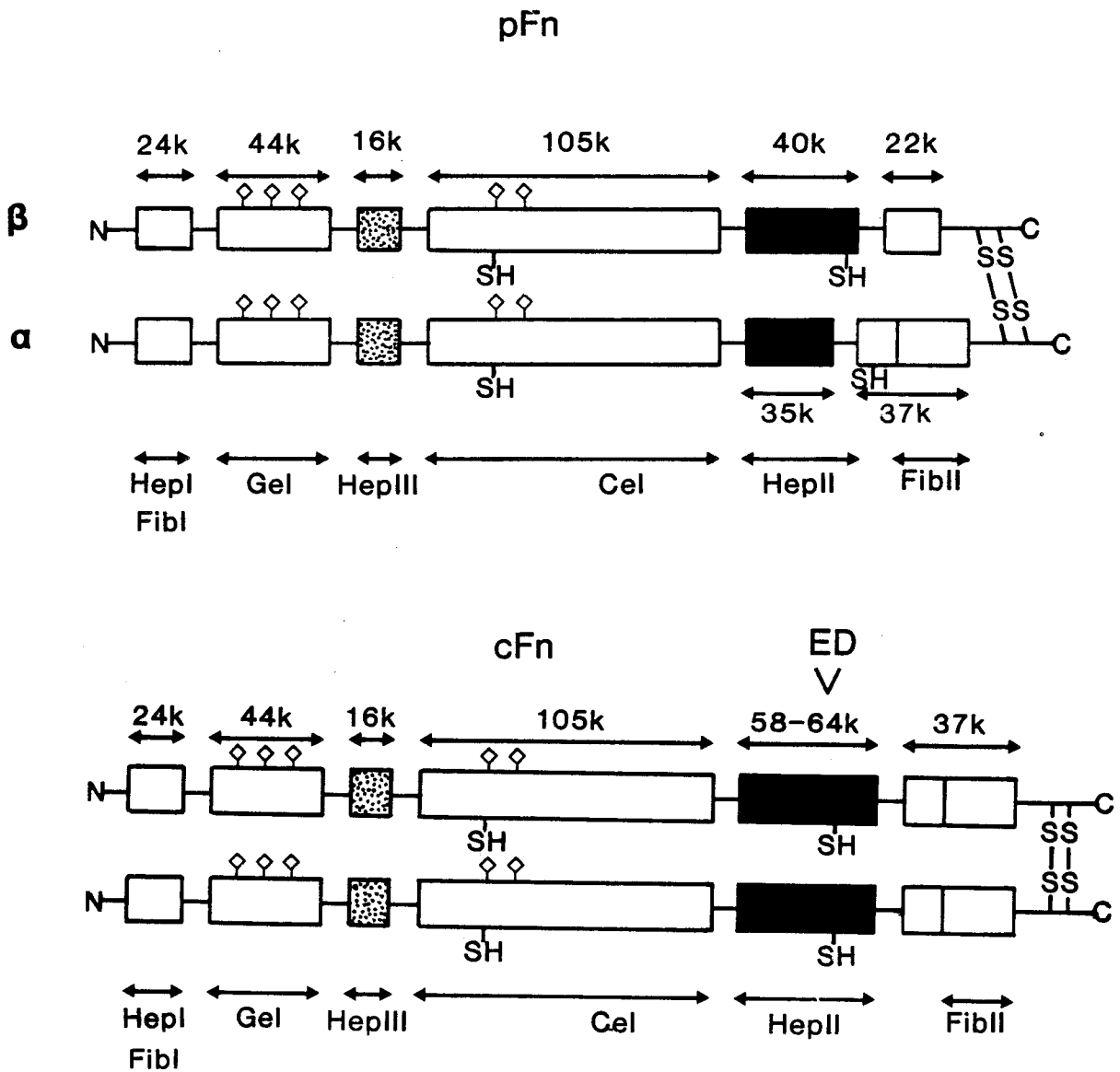


Fig. 8. Comparaison des domaines structuraux des fibronectines plasmatique et cellulaire humaines (434).

Les masses moléculaires des domaines, obtenus par protéolyse ménagée, sont indiquées en kDa. Les  $\diamond$  représentent les unités glycaniques substituant la chaîne polypeptidique. ED: "extra domain".



## 2. Sulfurylation.

La fibronectine peut être "sulfatée", apparemment au niveau d'un résidu de tyrosine situé dans la région C-terminale variable de la molécule (sous-domaine IIICS), ce qui expliquerait le fait que toutes les chaînes polypeptidiques ne soient pas sulfatées (364).

## 3. Acylation.

La fibronectine pourrait s'associer de manière covalente à des résidus d'acides gras, comme l'acide palmitique. Ce type d'association a été mis en évidence dans la matrice extracellulaire de fibroblastes humains (337).

## 4. Glycosylation.

La partie glycanne des fibronectines est très hétérogène. Elle varie en fonction du nombre de glycannes par sous-unité, la nature et le degré de sialylation des glycannes. Seul point commun entre les différentes formes, elles renferment essentiellement des glycannes de type N-acétyllactosaminique, les structures oligomannosidiques et O-glycaniques étant soit absentes, soit en très faible proportion.

### a. Structure primaire des glycannes de la fibronectine.

#### - La fibronectine plasmatique.

La fibronectine plasmatique est essentiellement substituée par des glycannes de type N-acétyllactosaminique biantenné non fucosylé (34,131, 223,297,336,416,466,523,545). La fibronectine plasmatique humaine renferme au moins cinq glycannes par sous-unité, trois au niveau du domaine de fixation au collagène (155,432,503), et deux dans le domaine central (359), porteur du site de fixation cellulaire (voir Fig. 8; p. 37). Ces glycannes sont sialylés en  $\alpha$ -2,6 sur les résidus de galactose terminaux (Fig. 9; p. 39). Laine et al. (131,272,545) ont montré qu'il existait une fraction non-retenue sur Concanavaleine A. Cette fraction,

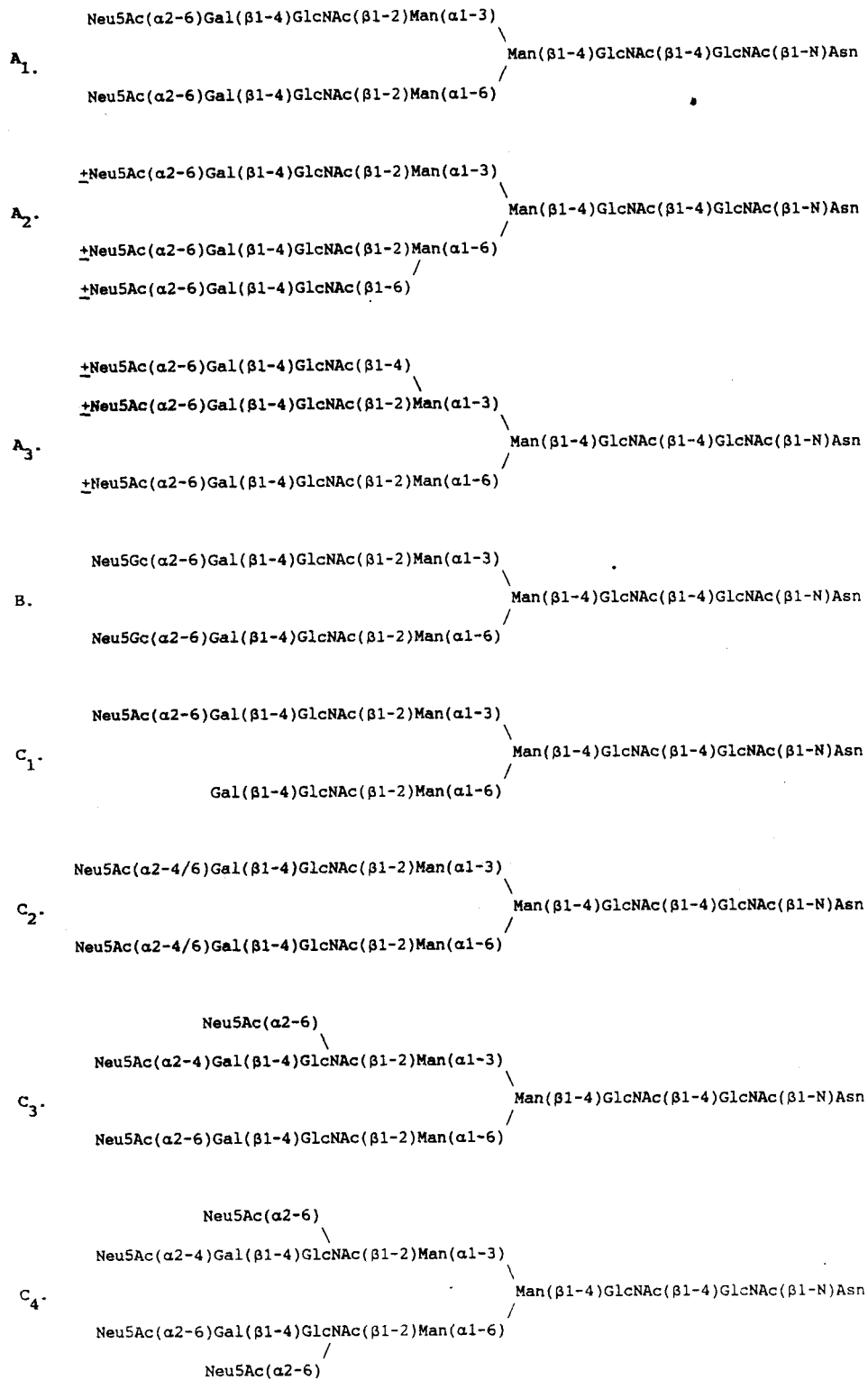


Fig. 9. Structure des glycanes des fibronectines plasmatiques de différentes espèces.

A<sub>1</sub>: Glycane majeur de la fibronectine plasmatique humaine (297,336).

A<sub>2</sub> & A<sub>3</sub>: Glycanes mineurs de la fibronectine plasmatique humaine (297).

B: Glycane majeur de la fibronectine plasmatique de hamster (137).

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> & C<sub>4</sub>: Glycanes de la fibronectine plasmatique bovine (465).

correspondant à moins de 20% des glycanes totaux, a été caractérisée par Magallon et al. (297). Il s'agit de structures triantennées sialylées et non-fucosylées (Fig. 9; p. 39). La présence de glycanes de type O-glycosidique a été suspectée (272) mais, jusqu'à présent, ils n'ont pas été caractérisés, vraisemblablement en raison de leur très faible proportion. Ces derniers pourraient être situés au niveau du domaine variable IIICS (444).

La structure glycanique majeure de la fibronectine plasmatique de Hamster (137) est pratiquement identique à celle de la fibronectine humaine. Seul différence, les résidus de galactose sont substitués en  $\alpha$ -2,6 par l'acide N-glycolylneuraminique. Ces structures sont tout à fait classiques et se retrouvent au sein de nombreuses glycoprotéines circulantes (319,320).

Les structures des glycanes majeurs de la fibronectine plasmatique bovine (465) sont également présentées à la figure 9 (p. 39). Il faut noter la présence de résidus de galactose liés en  $\beta$ -1,3 sur la N-acétylglucosamine, cette dernière pouvant être substituée par un résidu d'acide N-acétylneuraminique lié en  $\alpha$ -1,6. En outre, l'analyse de la structure primaire de la fibronectine plasmatique bovine a permis de mettre en évidence huit chaînes glycaniques par sous-unité (444).

Enfin, à l'inverse des autres fibronectines plasmatiques étudiées, la fibronectine plasmatique porcine est substituée par des chaînes oligosaccharidiques fucosylées (222).

#### - La fibronectine cellulaire.

Comme l'ont montré Murayama et al. (336), la majorité des glycanes de la fibronectine de fibroblastes humains est de type biantenné, monosialylé, l'acide N-acétylneuraminique étant lié en  $\alpha$ -2,3 sur le résidu de galactose terminal, et fucosylée en  $\alpha$ -1,6 sur le premier résidu de N-acetylglucosamine du noyau pentasaccharidique (Fig. 10; p. 41). Une structure identique a été identifiée dans la molécule de fibronectine sécrétée dans le milieu de culture de fibroblastes de Hamster (77,136). De même, Hannan et al. (174) ont montré que la partie glycanique de la fibronectine de cellules endothéliales bovines était tout à fait identique à celle de la fibronectine plasmatique bovine.

Il apparaît donc que les fibronectines plasmatique et cellulaire diffèrent essentiellement par la présence de fucose et par le nombre et

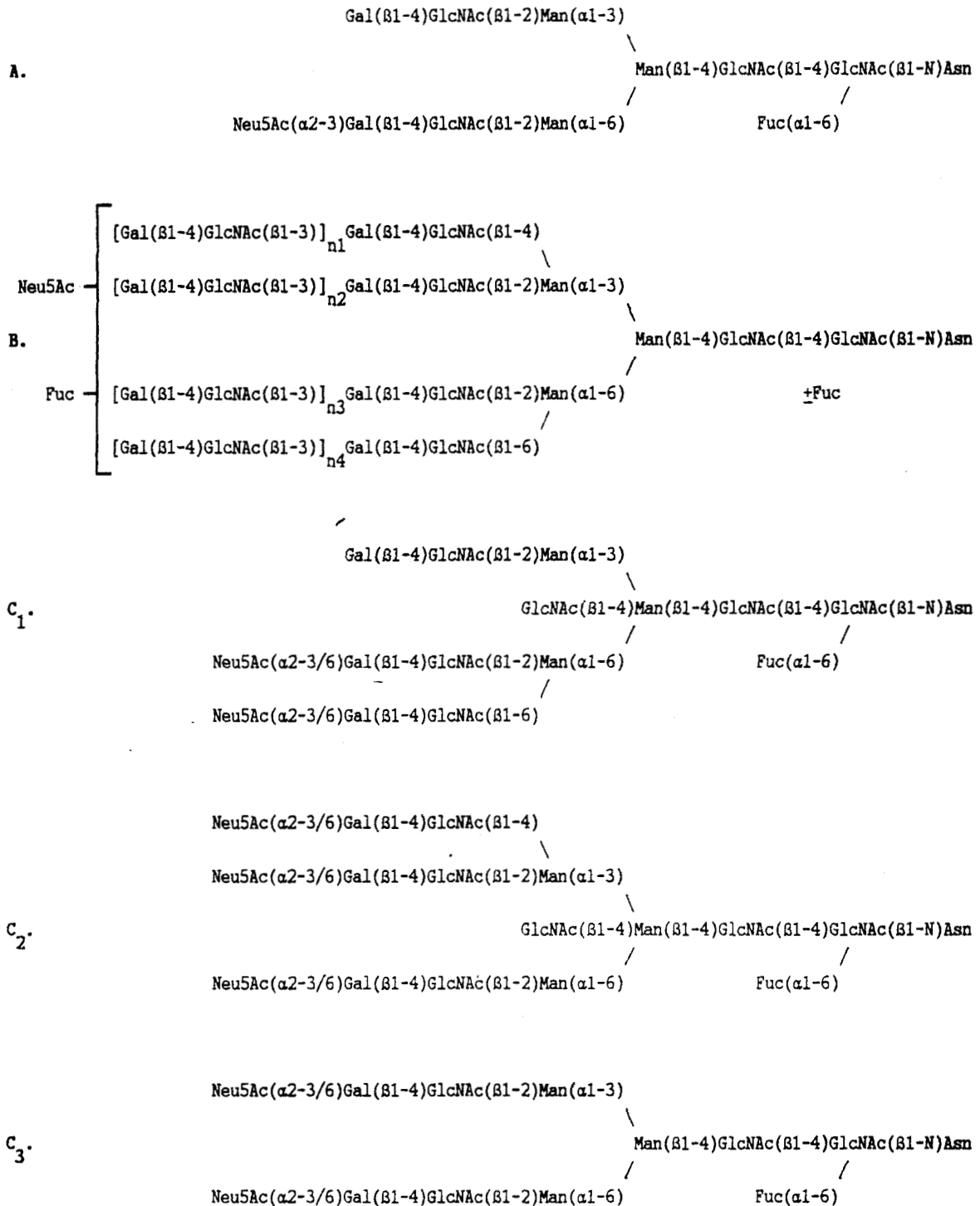


Fig. 10. Structure des glycanes majeurs des fibronectines cellulaires humaine et de hamster et des fibronectines amniotique et placentaire humaines.

- A: Glycane majeur de la fibronectine de fibroblastes humains (336) et de fibroblastes de hamster (77,136).
- B: Glycane de la fibronectine placentaire humaine (545).
- C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>: Glycanes de la fibronectine du liquide amniotique (272).

la nature de la liaison des résidus d'acides sialiques qui substituent les chaînes oligosaccharidiques. De plus, dans tous les cas, la fraction tri- et tétraantennée de la fibronectine cellulaire est sensiblement plus importante.

- La fibronectine placentaire.

La structure des glycanes de la fibronectine placentaire humaine a été déterminée par Zhu et Laine (545). Ces glycanes sont de type poly-N-acétyllactosaminique tétraantenné, partiellement sialylé comme le montre la structure représentée dans la figure 10 (p. 41). En outre, ces auteurs ont montré que cette structure était également fucosylée et sialylée, sans cependant préciser la position des résidus de fucose.

- La fibronectine du liquide amniotique.

La fibronectine amniotique humaine présente une plus grande diversité de structure (272). En effet, elle est substituée par des glycanes biantennés et triantennés, ces derniers pouvant posséder un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire, lié en  $\beta$ -1,4 sur le  $\beta$ -mannose du noyau pentasaccharidique (Fig. 10; p. 41). 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.

Apparemment, les fibronectines humaines d'origine embryonnaire, quelles proviennent du liquide amniotique ou du tissu placentaire, possèdent des structures glycaniques plus complexes que la fibronectine plasmatique ou la fibronectine de fibroblastes en culture. Parallèlement, il existe une certaine hétérogénéité de la partie glycanique des fibronectines plasmatiques d'espèces différentes. Hormis le fait que cette microhétérogénéité puisse être, au même titre que les délétions observées au niveau de la séquence peptidique, un marqueur de l'origine cellulaire des fibronectines, il n'a pas encore été possible de déterminer les conséquences de ces modifications structurales sur les propriétés biologiques de la molécule. En particulier, les structures complexes caractérisées dans la molécule de fibronectine placentaire pourraient moduler les propriétés immunologiques de cette glycoprotéine.

b. Rôle des glycanes de la fibronectine.

Cette question faisant l'objet d'une partie de nos travaux personnels, sera abordée au cours de la discussion de nos résultats. De ce fait, nous ne présenterons ci-après que les travaux antérieurs à notre étude.

Olden et al. ont tenté de déterminer le rôle de la partie glycanique en purifiant une fibronectine non glycosylée du milieu de culture de fibroblastes embryonnaires de Poulet traités par la tunicamycine (352). Cet antibiotique bloque la formation du dolicholpyrophosphate-N-acétylglucosamine et, par voie de conséquence, la biosynthèse des glycanes des N-glycosylprotéines. Selon ces auteurs, la déglycosylation ne semble pas affecter les propriétés de la fibronectine. En particulier, la fibronectine déglycosylée permet l'adhérence et l'étalement des fibroblastes en culture, que ce soit sur le plastique ou sur un film de collagène. Bernard et al. (45) ont poursuivi cette étude et montré que la fibronectine déglycosylée était beaucoup plus sensible à l'action des protéinases et que les glycanes stabilisaient plus particulièrement le domaine de fixation au collagène et retardaient la protéolyse de la molécule. En outre, le traitement par la tunicamycine ne semble pas affecter la sécrétion de la molécule (352). Il en est de même lorsque l'on modifie les structures des glycanes en traitant les cellules par la monensine (288) ou la swainsonine (25).

Parallèlement, Zhu et al. (544) ont montré que les glycanes poly-N-acétyllactosaminiques de la fibronectine placentaire augmentaient considérablement la résistance aux protéinases de son domaine de fixation au collagène lorsqu'on la compare à la fibronectine plasmatique.

Ces résultats font apparaître que les glycanes ne semblent pas être impliqués directement dans les mécanismes de reconnaissance de la fibronectine. Cependant, nous verrons que les glycanes peuvent agir indirectement sur les propriétés de la molécule et que l'augmentation de la masse moléculaire peut affecter l'affinité de la glycoprotéine pour certains ligands.

## VI. BIOSYNTHESE ET REGULATION.

### A. LE GENE DES FIBRONECTINES.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, les fibronectines plasmatiques et cellulaires, quoique très similaires, présentent des différences de structure au niveau de leur extrémité C-terminale. La question de l'origine génétique de cette hétérogénéité n'est pas pour le moment complètement élucidée, mais les résultats obtenus jusqu'alors sont un faveur d'un seul gène codant pour les formes plasmatique et cellulaire de la fibronectine.

#### 1. Hypothèse d'un ou deux gènes.

L'existence de deux gènes différents codant l'un pour la fibronectine plasmatique, l'autre pour la fibronectine cellulaire, et ayant évolués séparément aurait due conduire à une importante similitude de chacune des formes de la fibronectine isolées de différentes espèces animales. De plus, les différences entre fibronectines plasmatique et cellulaire auraient du aller en s'amplifiant chez les animaux supérieurs.

A l'inverse, Akiyama et Yamada (7) ont montré, grâce à un anticorps dirigé contre la fibronectine cellulaire de Poulet, que la fibronectine plasmatique de cet animal était immunologiquement plus proche de son homologue cellulaire que de la forme plasmatique de la fibronectine d'autres espèces animales. Parallèlement, l'analyse des cartes peptidiques effectuée par Yamada et al. (528) indique que la fibronectine de fibroblastes humains diffère moins de la fibronectine plasmatique humaine que de la fibronectine cellulaire de Souris ou de Poulet. Enfin, comme nous l'avons précédemment indiqué, la séquence codant pour le domaine ED, spécifique de la fibronectine cellulaire, semble pouvoir être éliminée lors de la maturation de l'ARNm, engendrant une fibronectine dans laquelle ce domaine est absent.

Ces résultats tendent donc à prouver que fibronectines plasmatique et cellulaire sont issues du même gène et que l'hétérogénéité observée provient de modifications post-transcriptionnelles des ARNm et post-traductionnelles de la protéine néosynthétisée.

## 2. Origine du gène des fibronectines.

Il est peu probable que le gène d'une glycoprotéine de la taille de la fibronectine soit le résultat d'une évolution unique et on considère actuellement que cette molécule proviendrait de la fusion de plusieurs gènes. Sur la base des données structurales actuellement acquises, deux hypothèses ont été émises.

En s'appuyant sur la structure de la molécule, Gilbert (150) a envisagé que le gène de la fibronectine puisse être le produit de la fusion de plusieurs gènes ancestraux, chacun codant pour un domaine fonctionnel particulier. Cependant, cette hypothèse n'est pas en mesure d'expliquer les résultats obtenus par Petersen et al. (373) lors de l'étude de la structure primaire de la fibronectine bovine, mettant en évidence la présence de trois types d'homologies internes. Selon ces auteurs, le gène de la fibronectine pourrait donc provenir de la multiplication de petites unités génomiques, chaque groupe d'unités ayant par la suite évolué pour donner les domaines fonctionnels actuels. Cette dernière hypothèse a, d'ailleurs, déjà été envisagée pour d'autres protéines ou glycoprotéines comme l'albumine (63), le plasminogène (451) et l'ovomucoïde (284).

## 3. Isolement et caractérisation du gène de la fibronectine.

Le gène de la fibronectine humaine a été localisé au niveau des régions p14-p16 et q34-q36 du chromosome 2 (228,391). En 1983, Hirano et al. (194) ont isolé et caractérisé l'ADN génomique de la fibronectine à partir d'une bibliothèque de fragments d'ADN de Poulet. Ce gène est constitué d'environ 48 kilobases (Fig. 11; p. 46), plus de cinq fois la longueur de l'ARNm correspondant. Ce gène contient au moins 48 exons



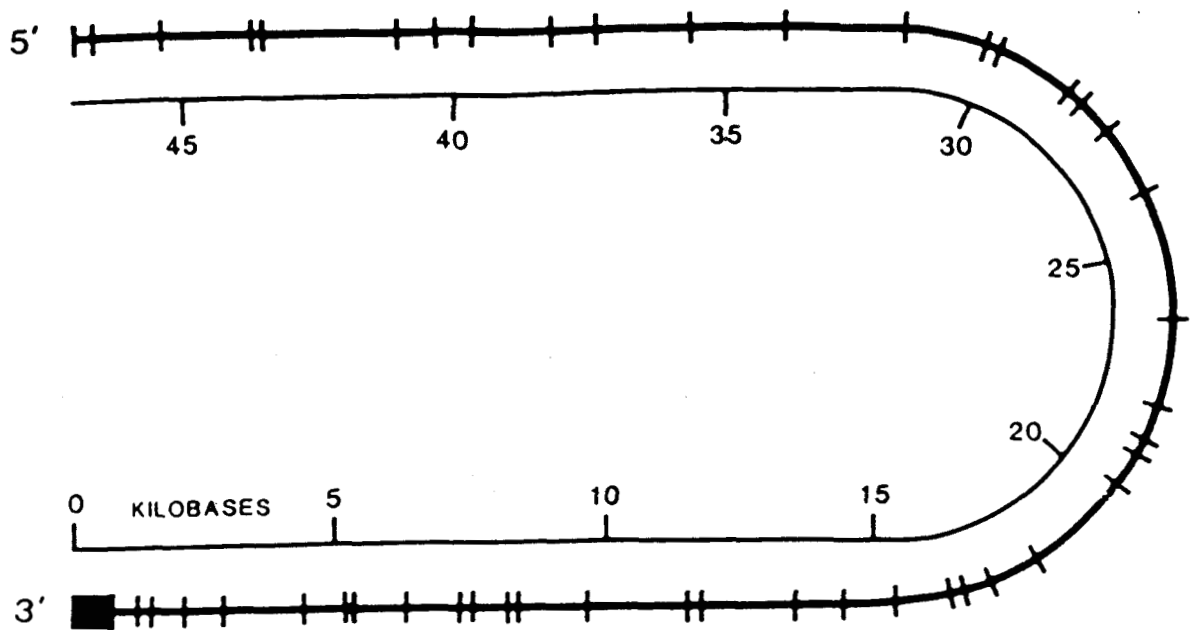


Fig. 11. Gène de la fibronectine cellulaire de Poulet (194).

Le gène de la fibronectine de Poulet est constitué de 48 kilobases. Les segments verticaux représentent les 48 exons, au total 8 kilobases. A l'exception de ceux situés aux extrémités du gène, ces exons sont de taille à peu près constante et codent pour des fragments peptidiques d'environ 150 acides aminés. Les introns, qui correspondent à plus de 80% du gène, sont de tailles extrêmement variables.

dont le total correspond à 8 kilobases. A l'exception de ceux situés aux extrémités du gène, les exons ont une taille à peu près constante et codent en moyenne pour un chaînon de 50 acides aminés. Par contre, la taille des introns est extrêmement variable. En outre, les auteurs n'ont mis en évidence qu'un seul gène confortant l'hypothèse d'un gène unique pour les différentes formes de la fibronectine. Kornblihtt et al. (262) ont obtenu des résultats tout à fait similaire pour le gène de la fibronectine cellulaire humaine. Ils ont estimé la taille de l'ARNm à 7900 bases environ. Ces mêmes auteurs ont pu montrer qu'il existait plusieurs ARNm codant pour la fibronectine et issus du même gène du fait d'une maturation différente (263). Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par Schwarzbauer et al. pour le gène de la fibronectine isolé d'une souche d'hépatocytes de Rat (430).

#### B. MATURATION DE L'ARNm.

Six clones d'ADNc, trois provenant d'hépatocytes de Rat (430), trois provenant de lignées cellulaires humaines (46,263,480) ont été isolés. Ces clones ont permis de caractériser cinq ARNm qui diffèrent dans une région codant pour la partie C-terminale de la molécule, région dans laquelle ont été identifiées des différences entre les deux sous-unités de la fibronectine (183,398,433). Selon Tamkun et al. (468), les différences détectées au niveau de cette région IIICS proviendraient de différentes excisions et épissages d'un ARNm précurseur. De même, comme l'ont montré Kornblihtt et al. (263), l'élimination du domaine se ferait par excision d'un exon spécifique de l'ARNm précurseur.

#### C. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE.

Un certain nombre de types cellulaires synthétisent et sécrètent de la fibronectine (voir Tableau VII; p. 48). La quantité de fibronectine varie considérablement en fonction du type cellulaire et de l'état de différenciation. Les fibroblastes (93) et les cellules endothéliales (48) synthétisent la fibronectine de type cellulaire. La forme

Tableau VII. Cellules synthétisant de  
la fibronectine in vitro (219).

Type cellulaire	Commentaires
Fibroblastes	Diminution de la synthèse après transformation maligne.
Cellules endothéliales	Taux de synthèse élevé. Pourcentage important sécrété <u>in vitro</u> .
Chondrocytes	Synthèse variable en fonction de l'état de différenciation.
Myoblastes	Arrêt de la synthèse lors de la différenciation en myotubes.
Macrophages	Fibronectine essentiellement sécrétée.
Hépatocytes	Synthétisent la fibronectine plasmatique, sécrétée dans le milieu de culture.
Cellules amniotiques	Produisent la fibronectine du liquide amniotique.
Cellules épithéliales	Synthèse dépendante du type cellulaire.
Cellules embryonnaires	Synthèse dépendante de l'état de différenciation.
Entérocytes	En très faible quantité.
Cellules astrogliales	En très faible quantité. Pas de fibronectine <u>in vivo</u> .

plasmatique de la fibronectine est synthétisée et sécrétée par les hépatocytes (21,467). En effet, la fibronectine synthétisée par des hépatocytes en culture est de type plasmatique et essentiellement relarguée dans le milieu de culture. De plus, les cellules endothéliales et les macrophages produisent de la fibronectine *in vitro* (490,498) et sont donc susceptibles d'en relarguer une partie dans le sang.

Gutman et al. ont récemment montré qu'elle était tout d'abord synthétisée sous la forme d'un pré-propolypeptide (168). La fibronectine possède un peptide signal de 26 acides aminés à son extrémité N-terminale. Ce peptide subit une dégradation protéolytique et une pro-séquence de 5 acides aminés est éliminée. Le rôle de cette séquence est toutefois pour le moment inconnu. La fibronectine est tout d'abord monomérique. Elle se dimérise rapidement et la molécule néosynthétisée est exportée à l'extérieur de la cellule après avoir été glycosylée, trente minutes après la début de la synthèse (93). Elle s'intègre dans la matrice extracellulaire ou se retrouve dans les liquides biologiques. La vitesse de renouvellement de cette glycoprotéine est relativement lente, sa demi-vie étant de 30-36 heures (353).

La synthèse de fibronectine peut être modulée par un certain nombre de facteurs. En particulier, il semble qu'au niveau des cellules en culture, la synthèse soit diminuée pendant la mitose (458). La production de fibronectine est régulée par l'action d'hormones. L'addition de glucocorticoïdes comme la dexaméthasone dans le milieu de culture d'hépatocytes stimule la synthèse de fibronectine (22,37). Il semblerait que ce composé est un effet sur le taux d'ARNm codant pour la protéine (394) mais le mécanisme moléculaire reste obscur. Cette observation pourrait expliquer l'augmentation de la concentration en fibronectine plasmatique observée lors des phénomènes inflammatoires. La sécrétion de fibronectine est également augmentée sous l'effet du 12-O-tétradécanoyl-13-acétyl-phorbol (542,543) sans que celle-ci puisse s'intégrer à la matrice extracellulaire.

## VII. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES FIBRONECTINES.

Du fait de leurs interactions spécifiques avec la membrane cellulaire et avec des macromolécules constitutives de la matrice extracellulaire telles que le collagène et les protéoglycannes, les fibronectines jouent un rôle primordial dans l'organisation de l'architecture tissulaire et interviennent dans de nombreux processus biologiques. Le Tableau VIII (p. 51) qui résume la plupart de leurs activités biologiques, fait apparaître que le rôle de ces molécules ne se limite pas à l'ancrage des cellules au réseau fibrillaire de la matrice conjonctive, mais qu'elles agissent aussi sur la morphologie et sur la migration cellulaire, sur la différenciation cellulaire et qu'elles interviennent dans les mécanismes de la phagocytose et de la cicatrisation.

### A. L'ADHERENCE CELLULAIRE.

#### 1. In vivo.

La fibronectine permet l'adhérence de nombreux types cellulaires. On la retrouve autour des vaisseaux sanguins et des cellules musculaires, autour des cellules mésenchymateuses, dans le stroma du tissu lymphatique. Toutefois, c'est, à l'évidence, au niveau du tissu conjonctif qu'elle est la plus répandue (voir les revues générales suivantes: 138, 160, 199, 493). Par contre, elle est absente du tissu cartilagineux. En effet, les chondrocytes ne se fixent pas à la fibronectine mais interagissent avec leur matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'une autre protéine adhésive, la chondronectine (471, 524). Dans les membranes basales, la fibronectine se retrouve préférentiellement au niveau de la lamina densa où elle se fixe au collagène de type IV permettant ainsi l'adhérence de l'épithélium au tissu conjonctif sous-jacent (471). Les cellules épithéliales se fixent aux protéoglycannes de

Tableau VIII. Différentes activités biologiques des fibronectines.

<b>ACTIVITES BIOLOGIQUES</b>	
<b>A</b>	<u>Adhésion cellule-cellule</u>  <u>Adhésion cellule-substratum</u>  1 - Attachement et étalement des cellules sur le plastique et le verre.  2 - Attachement des cellules au collagène et à la fibrine  <u>Morphologie cellulaire</u>  1 - Maintien de la forme des fibroblastes et d'un nombre minimum de microvillosités  2 - Alignement des fibroblastes en arrangements parallèles  3 - Induction de l'arrangement des microfilaments d'actine
<b>B</b>	<u>Migration cellulaire et chimiotactisme</u>  1 - Migration des cellules embryonnaires  2 - Cicatrisation
<b>C</b>	<u>Propriétés opsonisantes</u>
<b>D</b>	<u>Stimulation ou inhibition de la différenciation cellulaire</u>

la *lamina lucida* par l'intermédiaire de la laminine ou de la fibronectine (524).

Au niveau du tissu conjonctif, la fibronectine est organisée en un réseau fibrillaire dense dans lequel ses molécules s'associent aux autres molécules de la matrice extracellulaire; fibres de collagène et protéoglycannes. Ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre IV-E (p. 24), la fixation des cellules sur la fibronectine s'effectue par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire. Au sein de la matrice, les cellules peuvent par ailleurs interagir directement avec les autres molécules qui la compose. Par exemple, les fibroblastes s'associent également à la laminine (103, 239) et au collagène de type I (165,428). De même, les hépatocytes se fixent à la fibronectine, à la laminine et à différents types de collagène (233,413).

## 2. In vitro.

La fibronectine permet aux cellules en culture d'adhérer à différents supports. Il est possible de distinguer l'adhérence des cellules au collagène et l'attachement et l'étalement des cellules sur les polymères synthétiques utilisés pour la fabrication des boîtes de culture.

### a. Association avec le collagène.

Nous avons vu que la fibronectine s'associait aux différents types de collagène (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 (127,157,252,368). De plus, l'acide hyaluronique et l'héparine semblent augmenter l'affinité de la fibronectine pour le collagène (230,417). Des expériences d'inhibition ont, en effet, montré que l'héparine pouvait augmenter l'affinité des hépatocytes pour le complexe collagène-fibronectine (232). Ces résultats pourraient être le reflet d'un changement de conformation de la

fibronectine sous l'effet de l'héparine (134) se traduisant par une augmentation de son affinité pour le collagène.

b. Association avec les matériaux plastiques.

L'attachement et l'étalement des cellules sur les matériaux plastiques des boîtes de culture nécessitent la présence de fibronectine. Certaines cellules utilisent la fibronectine ainsi que d'autres facteurs d'adhérence cellulaire tels que la vitronectine (186) du sérum ajouté dans le milieu de culture. Höök et al. (198) ont montré que l'addition de fibronectine exogène était nécessaire à la fixation des hépatocytes de Rat en culture. Par contre, les cellules fibroblastiques synthétisent leur propre fibronectine en quantité suffisante et ne nécessitent pas l'addition de fibronectine exogène (162).

Dans une deuxième phase, la fibronectine permet également l'étalement de ces cellules ce qui entraîne un changement de leur morphologie: les cellules initialement sphériques reprennent une forme polyédrique. Les mécanismes qui régissent ces changements de conformation ne sont pas encore élucidés. Ce phénomène nécessite une réorganisation complète du cytosquelette ce qui sous-entend un échange d'informations entre les molécules de la matrice extracellulaire et les molécules cytoplasmiques sub-membranaires. Certaines estimations suggèrent que 45.000 molécules de fibronectine sont nécessaires à l'étalement d'un seul fibroblaste (208). Dès les premiers stades de l'adhérence et de l'étalement des cellules, il semble que la fibronectine interagisse avec des molécules du cytosquelette comme la taline, l'actine, la vinculine et l' $\alpha$ -actinine par l'intermédiaire d'un ou plusieurs récepteurs transmembranaires et ceci au niveau des plaques d'adhésion (71,190,204,216,344,438,440,441). En outre, des observations en microscopie électronique de cellules étalées révèlent un co-alignement des filaments d'actine submembranaires et du réseau de fibronectine extracellulaire (190,216,438). Récemment, Singer et al. ont montré que le fragment peptidique Arg-Gly-Asp-Ser, séquence minimale reconnue par le récepteur membranaire de la fibronectine, pouvait induire la formation de ces plaques d'adhésion (439). Ce résultat semble indiquer que l'association du domaine de fixation cellulaire de la fibronectine avec son récepteur suffit à induire l'étalement des cellules en culture.



## B. MIGRATION CELLULAIRE ET CHIMIOTACTISME.

### 1. Etudes in vitro.

Parallèlement à l'adhérence et à l'étalement des cellules, certaines études ont montré que la fibronectine pouvait augmenter l'importance et le caractère directionnel de la migration des fibroblastes en culture (479). Ce chimiotactisme permettrait, à la fois, la migration de cellules isolées et la dispersion d'agrégats cellulaires (19,385). Mc Carthy et Furcht ont montré que la fibronectine stimulait et orientait la migration des cellules tumorales. Cet effet peut, en outre, être inhibé par l'addition dans le milieu de culture d'anticorps anti-fibronectine (306). Ces mêmes auteurs ont également montré que cette activité était portée par un domaine distinct du domaine de fixation cellulaire (306). Récemment, Mensing et al. (314) ont décrit un certain nombre d'expériences mettant en évidence une augmentation du chimiotactisme de fibroblastes embryonnaires humains transformés par le virus Simian 40 par rapport aux mêmes cellules non-transformées et ceci sous l'effet de la fibronectine. Selon ces auteurs, il est possible qu'il existe une relation entre ce phénomène et l'invasion tissulaire lors de la formation de métastases par les tumeurs malignes (10,314).

La fibronectine favorise également la migration des leucocytes polynucléaires neutrophiles (172,227,300) et des monocytes (345,529). Ces différentes observations effectuées *in vitro* peuvent être comparées à certains processus physiologiques qui nécessitent la migration de cellules au sein d'un organisme telle qu'elle se produit au cours du développement embryonnaire et de la cicatrisation des plaies.

### 2. Rôle de la fibronectine dans le développement embryonnaire.

La fibronectine joue un rôle primordial dans la migration des cellules au cours du développement embryonnaire. Sa présence a été caractérisée dès le début du stade blastula chez *Pleurodeles Waltii* (111,112) Dès lors, elle participe à la mise en place des feuilletts embryonnaires en favorisant la migration des cellules pendant la

gastrulation (305,473,515). Boucaut et al. ont montré que des anticorps anti-fibronectine inhibaient la migration des cellules de la crête neurale et la gastrulation d'embryons d'amphibiens (60). Un effet inhibiteur similaire est obtenu par micro-injection, dans le blastocèle, de fragments peptidiques contenant le site de fixation cellulaire Arg-Gly-Asp-Ser. Ce résultat prouve que les cellules de l'endoderme utilisent comme substrat de migration la fibronectine qui tapisse la paroi interne du blastocèle (61,177). Le récepteur membranaire de la fibronectine a d'ailleurs été récemment caractérisé à la surface de cellules embryonnaires (84,123,271). Toutefois, la fibronectine ne semble pas intervenir lors de la neurulation (60).

### 3. Rôle de la fibronectine dans le processus de cicatrisation.

La fibronectine participe aux différentes étapes de la cicatrisation des plaies où elle intervient à trois niveaux: elle participe à la formation du thrombus, favorise l'assainissement de la plaie et joue un rôle dans la reconstitution du tissu lésé.

#### a. Hémostase et formation du thrombus.

Dans le cas d'une lésion vasculaire, les plaquettes sanguines adhèrent rapidement au collagène du tissu conjonctif mis à nu. Cette fixation induit une activation des plaquettes qui subissent des modifications morphologiques (phénomène de "gonflement"), suivies de la dégranulation, entraînant la libération des facteurs de coagulation. Au cours de ce processus, les plaquettes se recouvrent rapidement de fibronectine (214). En effet, l'activation plaquettaire induit l'apparition de récepteurs membranaires de la fibronectine, récepteurs qui n'existent qu'en nombre très restreint au niveau des plaquettes circulantes (151,175,316,379). Ces interactions pourraient promouvoir la fixation et l'étalement des plaquettes sur les fibres de collagène du tissu conjonctif comme l'ont montré des expériences réalisées *in vitro* (32,41,164, 166,268).

La fibronectine participe également à la formation du thrombus en se liant de manière covalente à la fibrine sous l'action du facteur XIII activé (333). En outre, la dégranulation plaquettaire conduit à la libération de la fibronectine contenue dans les granules  $\alpha$  (547).

b. Assainissement des plaies.

Après la formation du caillot sanguin, la région lésée est envahie par des leucocytes polynucléaires neutrophiles. Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, la fibronectine favorise la migration de ces cellules (172,227,300) et leur adhésion aux cellules endothéliales (505).

Les débris cellulaires sont ensuite phagocytés par les monocytes. Là encore, la fibronectine semble en mesure de contrôler le chimiotactisme de ces cellules (345,539) et de favoriser la phagocytose des débris cellulaires par son action opsonisante (voir § VII-C).

c. Reconstitution du tissu lésé.

Lors de la cicatrisation, des cellules fibroblastiques se déplacent massivement en direction de la zone endommagée. Les fibroblastes migrent dans certaines zones du caillot sanguin, se multiplient et resynthétisent une matrice conjonctive. A ce niveau, la fibronectine intervient en favorisant la migration et l'adhérence des fibroblastes au collagène et à la fibrine (161,253). A cet égard, Knox et al. (258) ont montré que la fibronectine permettait la migration des fibroblastes à l'intérieur du caillot. Dans ce cas, l'adhérence des fibroblastes est maximale lorsque la fibronectine est liée de façon covalente à la fibrine (163).

Les fibroblastes reforment un tissu conjonctif revascularisé par des cellules endothéliales. La blessure est ensuite recouverte d'un nouvel épithélium formé par la migration de kératinocytes depuis les bords de la plaie. La migration de ces cellules épithéliales est là encore favorisée par une matrice de fibronectine (62,158,295,296,459).

### C. FIBRONECTINE ET PHAGOCYTOSE.

#### PROPRIETES OPSONISANTES DE LA FIBRONECTINE PLASMATIQUE HUMAINE.

Dans la plupart des cas, la phagocytose nécessite la présence de facteurs sériques capables de s'associer au substrat avant la fixation de ce dernier à la surface de la cellule phagocytaire. Ces facteurs sont regroupés sous le nom d'opsonines.

A plus d'un titre, la fibronectine plasmatique peut être considérée comme une opsonine. Elle est, en effet, capable d'induire la fixation et l'ingestion de certaines substances par les macrophages et d'autres cellules réticulo-endothéliales. De ce fait, elle semble jouer un rôle dans le système de défense de l'organisme (voir la revue générale de Hörmann 200). Par exemple, certaines études ont montré que des billes de latex recouvertes de gélatine étaient phagocytées par les macrophages sous l'action d'un facteur non-immun identifié à la fibronectine plasmatique (52,53,159,167,318,409,411,490). Ce phénomène nécessite la présence d'héparine dans le milieu d'incubation et il est possible que ces deux molécules aient une action synergique.

La fibronectine est également capable de se fixer à la paroi de plusieurs espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *sanguis*, *Treponema pallidum* et *Echerichia coli* (2, 29,38,132,193,274,304,332,387-389,422,489,490,495-497). En outre, Ouaissi et al. (358) ont montré que la fibronectine se fixait à la surface de *Trypanosoma cruzi* et que cette fixation était nécessaire à l'infestation de cellules 3T3. Le site de fixation de *Staphylococcus aureus* (304,332), caractérisé dans la partie N-terminale de la molécule, est nettement différencié du domaine d'adhésion cellulaire. Cette fixation peut être favorisée par la sous-unité C1<sub>q</sub> du complément (450). Plusieurs séries d'expériences semblent indiquer que la fibronectine favorise la fixation et l'infection de la cellule hôte par ces bactéries (455,474,496).

Parallèlement, la fibronectine permettrait également l'élimination de ces bactéries par son action opsonisante vis-à-vis des cellules phagocytaires (38,390). Cette hypothèse est confortée par des études montrant un effet opsonisant de la fibronectine vis-à-vis de cellules

lésées ou sénescents (167,301,425,490). Par exemple, la phagocytose des érythrocytes par les monocytes est augmentée par l'addition de fibronectine (101,106-109,383).

Enfin, Simpson et Boughton (437) ont montré que la fibronectine augmentait l'adhérence et l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae* par des monocytes humains.

#### D. ROLE DE LA FIBRONECTINE DANS LES PHENOMENES DE MORPHOGENESE ET DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE.

La fibronectine est susceptible de modifier la morphologie et de moduler la croissance des cellules en culture. En effet, elle stimule la croissance des fibroblastes alors qu'elle ralentit celle des cellules épithéliales. Les hépatocytes cultivés en présence de fibronectine ont la forme de cellules fibroblastiques, tandis que l'addition de laminine leur restitue une morphologie de cellules épithéliales (471).

Dans certains cas, l'addition de fibronectine à des cultures de cellules transformées provoque l'étalement de ces cellules et la réorganisation des microfilaments d'actine du cytosquelette (20,519,532). Les cellules retrouvent alors une morphologie de cellules normales sans pour cela perdre leur caractère malin.

Enfin, la fibronectine semble avoir un rôle inhibiteur de la différenciation de certains types cellulaires. La fibronectine cellulaire semble disparaître lors de la différenciation des cellules embryonnaires précurseurs des tissus musculaires et cartilagineux (81, 372). De plus, l'addition de fibronectine exogène induit la dédifférenciation des chondrocytes en culture, avec un retour à des caractères de cellules mésenchymateuses (372,514). A cet égard, il a été montré que la fibronectine devait être absente du cartilage pour que ce tissu ait un développement normal (463).

Un effet inhibiteur similaire a été observé *in vitro* lors de la formation du tissu musculaire: la fibronectine inhibe la fusion des myoblastes en myotubes (382). Cependant, la fibronectine est nécessaire

à l'adhérence des myoblastes à une matrice collagénique, phase d'attachement sans laquelle la différenciation ultérieure est impossible (91).

Inversement, la fibronectine permet la différenciation des cellules de la crête neurale (293,435). Elle favorise également leur migration, à la fois *in vitro* et *in vivo* (410). Pour terminer, notons que la fibronectine est capable d'induire *in vitro* la transformation blastique des lymphocytes (73,286).

Ces résultats font apparaître que la fibronectine cellulaire agit de manière très différente sur la différenciation des cellules. Les mécanismes biochimiques de cette régulation ne sont pas encore définis. Toutefois, ces phénomènes mettent en lumière l'influence considérable qu'ont les molécules de la matrice extracellulaire sur le métabolisme des cellules.

## VIII. FIBRONECTINE ET CANCER.

### A. INTRODUCTION.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la fibronectine jouait un rôle essentiel dans l'organisation de la matrice extracellulaire. Les nombreuses études entreprises ont permis de caractériser sa structure, son rôle et de mettre en évidence l'étroite relation qui existe entre structure et fonction, la fibronectine étant constituée d'une succession de domaines fonctionnels nettement différenciés.

Parallèlement, la transformation maligne induit de profondes altérations du métabolisme et du comportement cellulaire qui se manifestent par une diminution de l'adhésivité cellulaire (98), une perte de l'inhibition de contact (477), une perturbation de la perméabilité membranaire et des transports actifs (361). En outre, la transformation conduit à des modifications importantes des glycoconjugués membranaires. Ces modifications structurales, initialement mises en évidence par la microscopie électronique, permettent d'expliquer l'augmentation de

l'agglutinabilité des cellules cancéreuses par certaines lectines comme la lectine de germe de Blé (27) ou la Concanavaline A. Elles se traduisent par une simplification des structures glycolipidiques (173), par une augmentation de la proportion des structures oligomannosidiques (113) et par un "alourdissement" des structures N-acétyllactosaminiques, associé généralement à une augmentation de la sialylation de ces glycanes (67,114,116,313,446,506). Enfin, dans de nombreux cas, la transformation maligne est associée à une diminution, voire une disparition totale de la fibronectine entourant les cellules.

Dans la mesure où les glycoconjugués membranaires et, en particulier, la fibronectine sont directement impliqués dans les mécanismes qui régissent le comportement cellulaire, toute modification structurale de ces molécules peut être associée au comportement anarchique des cellules cancéreuses.

#### B. DIMINUTION DE LA FIBRONECTINE DE LA SURFACE DES CELLULES CANCEREUSES.

La mise en évidence par Hynes en 1973 (212) de la diminution de la quantité de fibronectine associée à la surface de fibroblastes viro-transformés a rapidement conduit à l'intensification des recherches et cette observation a été ensuite confirmée par de nombreux auteurs, en utilisant différentes techniques de marquage de la surface cellulaire. Cette diminution affecte aussi bien les cellules ayant subi une transformation virale, chimique ou spontanée *in vitro* que les cellules animales ou humaines isolées de tumeurs cancéreuses et établies en culture. Elle affecte de nombreux types cellulaires (voir les revues générales de Vaheri et Mosher 482 et de Yamada et Olden 533) et, à titre d'exemples, nous pouvons citer les cellules épithéliales hépatiques (401), des cellules mésenchymateuses rénales (176), certaines cellules mammaires (26,448,449), les myoblastes (217), les cellules gliales (484) et, bien entendu, les fibroblastes (212,482,483,533). Cependant, cette diminution du taux de fibronectine cellulaire n'est pas systématiquement associée à la transformation maligne. En effet, il existe un certain nombre de lignées cellulaires néoplasiques dont le taux de fibronectine reste normal (35,70,120,224,299,360,370,454,470,516). En outre, toutes

les cellules normales ne synthétisent pas de fibronectine, à l'exemple des chondrocytes et des cellules nerveuses.

La diminution de la fibronectine de la surface de la cellule tumorale est souvent associée au pouvoir métastasant de cette dernière, la fibronectine n'existant généralement qu'en très faible concentration dans les tumeurs métastasantes (82,414,449). En effet, du fait du rôle primordial que joue cette glycoprotéine dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans l'architecture tissulaire, sa diminution sensible se traduit par une désorganisation totale du réseau fibrillaire qui entoure normalement les cellules et par une absence de cohésion du tissu malin. L'apparition de tumeurs secondaires, par la multiplication de cellules tumorales au niveau d'organes cibles, s'opère par essaimage de cellules de la tumeur primaire. De fait, une désorganisation de la matrice extracellulaire ne peut que favoriser le départ de ces cellules et on conçoit aisément les conséquences de la diminution de la fibronectine cellulaire.

*In vitro*, la perte de fibronectine et la désorganisation de la matrice extracellulaire qui en découle se traduisent par des modifications morphologiques des cellules transformées. Les cellules cancéreuses en culture apparaissent sous la forme de petites cellules rondes, n'adhérant que faiblement au substrat et réparties anarchiquement, formant le plus souvent des agrégats cellulaires disposés en couches superposées (259). L'addition de fibronectine cellulaire purifiée dans le milieu de culture de fibroblastes transformés permet un réattachement spontané des cellules au substrat. De plus, les cellules ont tendance à s'étaler et à reprendre une forme polyédrique de cellule fibroblastique. Ceci sous-entend une réorganisation des filaments d'actine du cytosquelette (18,519). En outre, lorsque les cellules en culture parviennent à confluence, les fibroblastes ont tendance à plus ou moins s'aligner en arrangements parallèles comme le feraient des fibroblastes non transformés. L'addition de fibronectine exogène provoquant la réorganisation des microfilaments du cytosquelette, il s'ensuit une diminution du nombre de microvillosités affectant la surface membranaire des cellules transformées. Cependant, dans ce type d'expérience, bien que la cellule cancéreuse retrouve certains caractères morphologiques de la cellule normale, elle n'en reste pas moins tumorigène (18,519).

L'utilisation de mutants viraux thermo-sensibles dont l'expression peut être inhibée par une élévation de la température d'incubation, a



permis de montrer que la fibronectine péricellulaire, détectée par immuno-fluorescence, réapparaît une à deux heures après le début du processus, avec une cinétique comparable à celle observée lors de la remise en culture de cellules trypsinisées (508). Par contre, durant la transformation, le phénomène est beaucoup plus difficile à observer. Le réseau de fibronectine péricellulaire ne disparaît que très lentement et il est difficile d'apprécier de manière précise comment s'opère la dissociation de la matrice (218,508).

### C. CAUSES DE LA DIMINUTION DE LA FIBRONECTINE DES CELLULES CANCEREUSES.

Les causes de cette diminution sont encore mal connues et plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin de tenter d'expliquer ce phénomène.

#### 1. Diminution de la synthèse de fibronectine.

La synthèse de la fibronectine est en partie régulée par la quantité de ARNm codant pour cette glycoprotéine. Sa diminution de la surface cellulaire pourrait donc être partiellement expliquée par une diminution sensible du taux d'ARNm (3,214,353). Cependant, de nombreuses lignées cellulaires transformées sont en mesure de synthétiser des quantités normales ou légèrement sub-normales de fibronectine (139,140,184,185,343). La fibronectine synthétisée est alors relarguée dans le milieu de culture et ne s'organise pas en un réseau fibrillaire. La diminution de la synthèse ne peut, dans ce cas, expliquer la désorganisation de la matrice extracellulaire et d'autres mécanismes doivent être en cause.

#### 2. Dégradation protéolytique de la fibronectine.

Certains auteurs ont avancé l'hypothèse d'une dégradation protéolytique de la fibronectine des cellules malignes (298,349). En particulier, lors de sa purification, la fibronectine des cellules transformées semble plus sensible à l'action des protéinases que celle produite par

les cellules normales (502). Chen et al. (86) ont montré que la transformation de fibroblastes par le virus du sarcome de Rous (RSV) induisait une augmentation de la synthèse de protéinases. De plus, ces auteurs ont mis en évidence l'expression privilégiée de ces enzymes au niveau des zones de contact cellule-substrat. Récemment, il a été montré que la protéine kinase produite par le gène viral pp60<sup>scr</sup> permettrait la phosphorylation de résidus de tyrosine (97,291,520), phosphorylation qui aurait pour conséquence de stimuler certaines protéinases extracellulaires, entraînant une dégradation locale de la fibronectine cellulaire (83,85).

Parallèlement, Bartali et al. (36) ont envisagé la possibilité d'une inhibition de la fixation des cellules tumorales par des fragments de protéolyse de la fibronectine. Ce phénomène d'auto-inhibition, difficilement vérifiable *in vivo*, a cependant été mis en évidence *in vitro* par Yamada et Kennedy (529).

### 3. Modifications de la structure primaire de la protéine.

La désorganisation de la matrice extracellulaire pourrait également provenir de modifications structurales de la fibronectine synthétisée par les cellules cancéreuses. Ali et Hunter (17), Wagner et al. (502) et Sekiguchi et al. (434) ont comparé les fragments peptidiques obtenus à partir de fibronectine de fibroblastes normaux et transformés. Il ne semble pas que la structure primaire de la fibronectine des cellules transformées soit profondément modifiée. Toutefois, des différences mineures ont pu être détectées. En particulier, certains fragments obtenus après hydrolyse par la thermolysine ou par la trypsine ont des masses moléculaires différentes. Récemment, Castellani et al. (78,442) ont montré que les fibroblastes transformés par le SV40 produisaient des variants de la fibronectine différents de ceux des fibroblastes normaux, ces variations affectant principalement la région IIIICS. De même, Borsi et al. (55) ont démontré que la fibronectine produite par des fibroblastes humains transformés renfermait environ dix fois plus de structure possédant le sous-domaine ED ("extra domain") que la fibronectine des fibroblastes non-transformés. Enfin, dernièrement, Zardi et al. (552) ont caractérisé la présence dans la fibronectine de cellules humaines transformées d'un nouvel "extra domain" de type III (ED-B) qui

n'existe qu'en très faible proportion dans la fibronectine des cellules normales. Selon les auteurs, la présence de ce domaine est vraisemblablement due à un épissage différent du RNAm et rend la molécule très sensible à l'action des protéinases. Ces résultats suggèrent que les mécanismes qui régulent l'épissage des ARNm codant pour la fibronectine puissent être altérés sous l'effet de la transformation virale. En outre, la fibronectine sécrétée par les fibroblastes transformés est apparemment plus phosphorylée (135) et Cossu et Warren (102) ont montré que la fibronectine synthétisée par des cellules indifférenciées de tératocarcinome embryonnaire de Souris était associée par une liaison covalentielle à des structures de type héparane sulfate. Cependant, malgré ces observations, il est encore impossible d'associer de manière irréfutable ces modifications à la diminution de la fibronectine cellulaire et, en particulier, les conséquences de cette hétérogénéité structurale sur l'organisation de la matrice extracellulaire demeurent inconnues.

#### 4. Perte du récepteur de la fibronectine.

Certaines études ont mis en évidence la disparition ou l'inactivation du récepteur de la fibronectine de la surface des cellules cancéreuses (122,125,355). Cependant, il ne s'agit que cas particuliers et cette hypothèse est *a priori* en contradiction avec la réversion du phénotype malin obtenue par addition de fibronectine exogène dans les milieux de culture de cellules transformées. Toutefois, Hirst et al. (195) ont récemment mis en évidence la phosphorylation du récepteur de la fibronectine dans des fibroblastes de Poulet transformés par des oncogènes codant pour une protéine kinase. Selon ces auteurs, cette phosphorylation pourrait inhiber ou moduler l'activité du récepteur mais ceci reste encore du domaine purement spéculatif.

#### 5. Modification de la partie glycanique.

Enfin, comme nous en ferons la démonstration dans le chapitre I de l'exposé de nos travaux, la partie glycanique de la fibronectine des cellules transformées subit de profondes modifications à l'image des

autres glycoprotéines membranaires. Ces modifications apparaissent d'ailleurs comme plus importantes que celles observées lors de l'analyse des glycannes totaux des cellules normales et transformées. Ce phénomène pourrait être en relation avec la diminution de la fibronectine péricellulaire et une partie de nos travaux est consacrée à la vérification de cette hypothèse.

#### D. ETUDES AU NIVEAU DES TUMEURS IN SITU.

La diminution de la fibronectine péricellulaire observée *in vitro*, se retrouve également au niveau de la tumeur. *In vivo*, les cellules tumorales présentent généralement un taux de fibronectine plus faible que le tissu sain (26,277). Dans le cancer du sein, pour choisir cet exemple relativement bien documenté, la fibronectine disparaît de la surface du carcinome et de la membrane basale dans les zones d'infiltration (26,277,292). Ces observations sont d'ailleurs généralisables aux autres carcinomes infiltrants dans lesquels la fibronectine est généralement absente des membranes basales et de la surface des cellules tumorales (277,449,457). En outre, la diminution de fibronectine s'accroît au cours du développement et avec le degré d'invasion de la tumeur. Lors des premiers stades, la fibronectine est encore présente et ne disparaît que lorsque la tumeur se développe. Par opposition, dans le cas de tumeurs bénignes, la distribution de la fibronectine ne subit aucune altération, la quantité de fibronectine associée à la surface cellulaire demeurant pratiquement normale (449,457).

Malgré ces observations, la perte de fibronectine cellulaire ne peut être considérée comme directement associée à la tumorigénicité des cellules. En effet, certaines lignées cellulaires malignes conservent une matrice extracellulaire apparemment normale (120,241,247,339). De même, certaines lignées d'hépatocarcinome ne possèdent pas de fibronectine péricellulaire *in vitro*, alors qu'elles présentent une matrice extracellulaire apparemment normale au niveau de la tumeur (429,457). Dans ce dernier cas, les observations effectuées *in vitro* pourraient être le reflet d'une altération de l'adhérence cellulaire, indétectable *in vivo*. Enfin, il a été montré que lorsque des cellules tumorales possédaient une matrice de fibronectine, cette dernière était beaucoup

plus faible quand les cellules étaient prélevées au niveau des métastases plutôt qu'au niveau de la tumeur primitive (339,449).

Il apparaît donc que l'absence de fibronectine n'est pas systématiquement associée à la tumorigénicité des cellules transformées, mais que la disparition de cette glycoprotéine est un facteur favorisant la dissociation des cellules et l'apparition de métastases.

#### E. FIBRONECTINE ET METASTASE.

Le mécanisme de la métastase peut être schématiquement subdivisé en trois phases distinctes:

- 1 - Détachement des cellules cancéreuses de la tumeur primitive.
- 2 - Migration des cellules tumorales par voie sérique et fixation de ces cellules circulantes sur la paroi de l'endothélium vasculaire.
- 3 - Destruction de la membrane basale, passage au travers de la paroi vasculaire et invasion du tissu cible avant le développement de la tumeur secondaire (513).

Comme nous l'avons vu précédemment, la disparition du réseau de fibronectine et la désorganisation de la matrice extracellulaire favorise le déplacement et le départ des cellules de la tumeur primitive. D'un autre côté, la cellule cancéreuse circulante doit nécessairement traverser la paroi des vaisseaux sanguins pour pouvoir donner naissance à la tumeur secondaire. Ce phénomène débute vraisemblablement par la fixation des cellules métastasantes sur les cellules endothéliales des capillaires (Fig. 12; p. 67). A cet égard, certains modèles d'étude *in vitro* permettent de mettre en évidence la forte affinité des cellules malignes pour les cellules endothéliales en culture (270,342,500). Cette fixation fait apparemment intervenir des interactions spécifiques qui peuvent être inhibées par des peptides synthétiques déduits du domaine de fixation cellulaire de la fibronectine. En effet, Humphries et al. (210) ont montré que l'injection simultanée chez la Souris, du fragment

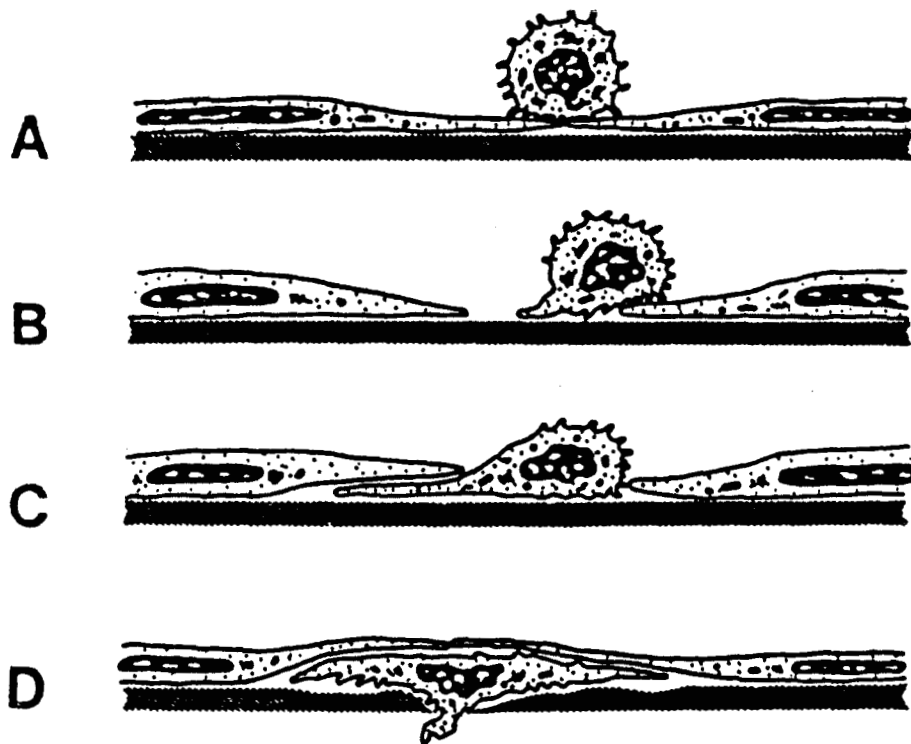


Fig. 12. Différentes phases de la fixation des cellules métastasantes sur l'endothélium vasculaire (342).

- (A) Attachement de la cellule tumorale circulante sur les cellules endothéliales.
- (B) Rétraction des cellules endothéliales et fixation de la cellule tumorale sur la membrane basale.
- (C) Etalement de la cellule tumorale sur la membrane basale et recouvrement par l'endothélium adjacent.
- (D) Destruction de la membrane basale et invasion du tissu sous-jacent.

peptidique Gly-Arg-Gly-Asp-Ser et de cellules de mélanome B16, diminuait de manière significative le nombre de métastases pulmonaires. Le mécanisme de cette inhibition reste encore à déterminer mais ces résultats font apparaître que la fibronectine et la laminine, molécules possédant cette séquence "adhésive", participent à la fixation des cellules tumorales sur l'endothélium. Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec l'inhibition de la fixation des cellules tumorales sur les cellules endothéliales obtenue par addition d'anticorps anti-fibronectine dans le milieu d'incubation (342). En outre, les cellules tumorales semblent posséder une affinité anormalement élevée pour la laminine qui est un constituant majeur des membranes basales (472).

Parallèlement, les cellules tumorales sont capables de dégrader les membranes basales (342), cette propriété leur permettant de traverser l'endothélium et de se fixer au niveau du tissu hôte.

#### F. ETUDE CLINIQUE DU PLASMA.

De nombreuses études ont démontré l'augmentation du taux de fibronectine ou de fragments protéolytiques de la molécule dans le plasma en cas de tumeurs malignes, chez l'animal ou chez l'Homme (92,362,424,478,540). Cette augmentation n'est toutefois que rarement proportionnelle au stade d'évolution de la tumeur (92) et il est impossible de considérer cette élévation de la concentration en fibronectine comme un marqueur de la cancérisation (105). En particulier, comme c'est le cas pour l'activité sialyltransférase du plasma, le taux de fibronectine peut augmenter sous l'effet d'autres mécanismes physiologiques. A cet égard, la concentration en fibronectine plasmatique augmente sous l'effet des glucocorticoïdes, en réponse à un phénomène inflammatoire (22).

## IX. CONCLUSIONS.

La diminution de la teneur en fibronectine de la surface membranaire des cellules cancéreuses, observée à la fois au niveau des tumeurs et dans les cultures cellulaires ne peut être que le résultat d'un processus complexe mettant en jeu la modification de plusieurs facteurs cellulaires. Dans tous les cas, la désorganisation de la matrice extracellulaire se traduit par un manque de cohésion du tissu cancéreux et par la perte d'adhésivité des cellules tumorales. En outre, la diminution de la fibronectine et la désorganisation de la matrice sont fonction de l'état de développement de la tumeur et de sa capacité de produire des métastases.

Parallèlement, la transformation maligne conduit à de profondes modifications des structures glycaniques qui se traduisent dans le cas des N-glycosylprotéines par une augmentation des structures tri- et tétraantennées et du taux de sialylation. L'augmentation de la sialylation a d'ailleurs été directement associée au pouvoir métastasant des cellules tumorales (96,250,538). De ce fait, il est parfaitement concevable que la modification des glycanes de la fibronectine soit l'un des facteurs conduisant à la perte d'adhésivité des cellules cancéreuses.

C'est dans cette perspective que nous avons entrepris d'étudier les structures glycaniques de la fibronectine sécrétée par des fibroblastes viro-transformés.



## **TRAVAUX PERSONNELS**

ETUDE STRUCTURALE DES GLYCANNES DES FIBRONECTINES  
DES CELLULES BHK21/C13 ET BHK21C13-HSV.

## I. INTRODUCTION.

### A. Modifications des structures des glycoprotéines de surface au cours de la transformation maligne.

Les premières études comparatives des structures des glycopeptides isolés de glycoprotéines de cellules normales et transformées sont dues à l'équipe de Warren (67-69). La méthodologie employée était la suivante:

1. Marquage métabolique des cellules en culture à l'aide de monosaccharides radioactifs (essentiellement le fucose, la glucosamine ou le mannose).

2. Traitement de la surface cellulaire par la trypsine et hydrolyse pronasique des glycopeptides tryptiques.

3. Analyse par co-chromatographie de tamisage moléculaire des glycopeptides marqués.

Ces études ont permis, d'une part, de montrer que les glycopeptides ainsi obtenus sont pour la majeure partie de type N-acétyllactosaminique (154,506) et, d'autre part, de mettre en évidence l'augmentation de la proportion des glycopeptides "lourds" dans le cas des cellules transformées (506). Ces travaux, initialement réalisés à partir de fibroblastes de Hamster transformés par différents virus, ont ensuite été étendus à d'autres types cellulaires comme les cellules d'hépatome de Rat (485), les cellules leucémiques humaines (486) ou des cellules uro-épithéliales humaines (116).

Dans un premier temps, Warren et al. ont associés cette augmentation de la masse moléculaire des glycanes à une augmentation de la sialylation, les profils de gel filtration obtenus après désialylation des glycopeptides des deux types cellulaires étant apparemment identiques et ils proposèrent l'existence d'une sialyltransférase spécifique des cellules cancéreuses (506). Cependant, l'amélioration de ce procédé de fractionnement, en particulier par l'utilisation de la chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées, a permis de montrer que, parallèlement à l'hypersialylation, on pouvait observer la présence de résidus de N-acétyllactosamine supplémentaires, conduisant à une proportion plus élevée de glycanes tri- et tétraantennés. Ces résultats

furent obtenus à la fois dans notre laboratoire et dans des laboratoires étrangers (51,114,321,347,464,551). Plus récemment, Yamashita et al. (537) montrèrent, en comparant les glycanes de fibroblastes de rein de Hamster normaux et transformés par le virus du polyome, que l'on retrouvait les mêmes structures glycaniques dans les deux types cellulaires, mais avec une augmentation très nette de la proportion des structures tétraantennées et poly-N-acétyllactosaminiques pour les cellules transformées.

Ces altérations de la taille des glycopeptides accompagnant la transformation maligne des cellules peuvent être généralisées quelle que soit l'origine des membranes (plasmiques, microsomiques, mitochondriales ou nucléaires) (66,335). Elles semblent correspondre à des modifications des activités glycosyltransféraïques des cellules transformées et sont vraisemblablement associées au pouvoir tumorigène de ces cellules. En particulier, il semble que l'augmentation de l'antennarisation et de la sialylation soient associées à la capacité des cellules de produire des métastases. Le taux de sialylation paraît, en effet, associé à l'activité métastatique des cellules tumorales (96,538). En outre, le traitement des cellules tumorales à haut pouvoir métastasant par des inhibiteurs de la glycosylation tels que la tunicamycine (221) ou la swainsonine (209), ou encore la sélection de mutants résistants à certaines lectines, comme la lectine de germe de Blé (240), permettent de diminuer sensiblement le pouvoir métastasant des cellules. Très récemment, Dennis et al. (119) ont associé directement l'apparition de métastases à l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V qui permet de lier la N-acétylglucosamine en  $\beta$ -1,6 sur le résidu de mannose  $\alpha$ -1,6 du noyau pentasaccharidique.

#### B. Etude des cellules BHK21/C13 normales et transformées.

L'analyse comparée des glycanes de fibroblastes de rein de Hamster (cellules BHK21/C13) normales et transformées par le virus du sarcome du Hamster (cellules BHK21/C13-HSV) fut entreprise au laboratoire dans le but de rassembler un maximum d'informations sur ces structures et, d'autre part, de mettre en évidence d'éventuelles modifications dans les cellules transformées.

Cette étude, fondée sur la préparation de glycopeptides radioactifs par marquage métabolique et hydrolyse pronasique des cellules délipidées, et le fractionnement de ces glycopeptides par gel filtration, par chromatographie d'affinité sur colonnes de Concanavalline A et de lectine de *Lens culinaris* immobilisées et par HPLC d'échange d'ions, a permis de caractériser l'enrichissement des cellules transformées en glycanes tri- et tétraantennés, s'accompagnant d'une augmentation du taux de sialylation (114,116,321).

Sur la base de ce schéma de fractionnement, il nous a été confié l'étude comparative des fibronectines sécrétées dans le milieu de culture de ces cellules.

. . .

Le mémoire suivant rapporte l'essentiel des résultats que nous avons obtenus. Il a été publié en 1985 dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. En outre, une étude préliminaire a fait l'objet d'une communication au VIIème Symposium International sur les Glycoconjugués à Lund-Roneby (Suède) en Juillet 1983.

. . .

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 301, Série III, n° 17, 1985

**BIOCHIMIE GÉNÉRALE.** — *Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation de cellules BHK21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster. Hypothèse concernant l'essaimage métastatique par masquage des sites lectiniques de la fibronectine.* Note de **Philippe Delannoy, Henri Debray et Jean Montreuil**<sup>(1)</sup>, présentée par Paul Mandel.

La transformation de cellules BHK21/C13 par le virus du sarcome du Hamster induit de profondes modifications de la structure des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique de la fibronectine sécrétée dans le milieu de culture. En effet, le rapport glycanes tri + tétraantennés/glycanes biantennés passe de 0,73 à 2,46. Tandis que le taux de sialylation s'accroît en raison de l'augmentation de la proportion de glycanes di-, tri- et tétrasialylés. Sachant que les glycanes tri- et tétraantennés adoptent une conformation étalée « en parapluie » qui est maintenue par des liaisons ioniques associant des résidus d'acide sialique et d'acides aminés basiques et qui couvre de larges superficies de la protéine, une hypothèse relative à la disparition de la fibronectine des tissus cancéreux et à l'essaimage métastatique est proposée sur la base d'un masquage, par les glycanes, des sites lectiniques des fibronectines issues des cellules néoplasiques.

**GENERAL BIOCHEMISTRY.** — Structural modifications of fibronectin glycans related to the transformation of BHK 21/C13 cells by the hamster sarcoma virus. Hypothesis concerning the metastatic diffusion based on the masking of lectin-sites of fibronectin.

*Transformation of BHK21/C13 cells by the hamster sarcoma virus induces dramatic modifications of glycans of the N-acetyllactosaminic type from fibronectin secreted in the culture medium. In fact, the ratio tri + tetraantennary glycans/biantennary glycans increases from 0.73 to 2.46. Moreover, the fibronectin is enriched in sialic acid due to the increase of di-, tri- and tetrasialylated glycans.*

*An hypothesis is proposed concerning the mechanism of metastasis on the basis of the knowledge we have now of the spatial conformation of glycans. In fact, tri- and tetraantennary glycans, in adopting an extended conformation called "umbrella-conformation", firmly maintained by ionic bonds between sialic acid and basic amino acid residues, cover large area of the protein. The enrichment of fibronectin from cancerous cells in tri- and tetraantennary glycans and, in the same time, in sialic acid could be related: (i) to the decrease or loss of reactivity of the protein moiety of fibronectin by masking the lectin sites and (ii) to the disappearance of fibronectin from cancer tissues and, consequently, (iii) to the mechanism of the metastasis itself.*

**INTRODUCTION.** — Les modifications profondes que connaissent les glycanes des glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses, ont été récemment définies. Elles concernent essentiellement les *N*-glycosylprotéines dont la proportion des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés augmente de façon très nette au détriment des structures biantennées ([1]-[6]). Ces transformations pourraient être en partie responsables des perturbations du « comportement social » que présente la cellule cancéreuse et, en particulier, de la diffusion métastatique ([7], [8]). A cet égard, le fait que la fibronectine, glycoprotéine extracellulaire qui joue un rôle fondamental dans l'association des cellules, diminue en quantité et disparaît même de certains tissus cancéreux [9], nous a incités à entreprendre l'étude de la structure des glycanes de fibronectines sécrétées par des cellules en culture ayant subi une transformation maligne viro-induite.

Dans la présente Note, nous démontrons que, dans le cas de la fibronectine de cellules BHK 21/C13 transformées par le virus du sarcome du Hamster (cellules BHK 21/C13-HSV), le rapport glycanes tri + tétraantennés/glycanes biantennés est inversé et que, en outre, la sialylation est très fortement augmentée. Sur la base de ces observations, nous formulons l'hypothèse que ces modifications pourraient être impliquées dans la diffusion métastatique.

**MATÉRIELS ET MÉTHODES.** — Les cellules ont été cultivées pendant 72 h en milieu de Eagle modifié [10] et additionné de [<sup>3</sup>H] glucosamine (4 μCi/ml) dans le cas des cellules BHK 21/C13 et de [<sup>14</sup>C] glucosamine (1 μCi/ml) dans le cas des cellules BHK 21/C13-HSV.

La fibronectine a été isolée des milieux de culture par chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Sepharose 4-B (Pharmacia, France) [11].

Les glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique ont été isolés en mélange par chromatographie sur Ultrogel AcA-202 (I.B.F., France), puis fractionnés [4] par chromatographie sur colonne (1 × 10 cm) de Con A

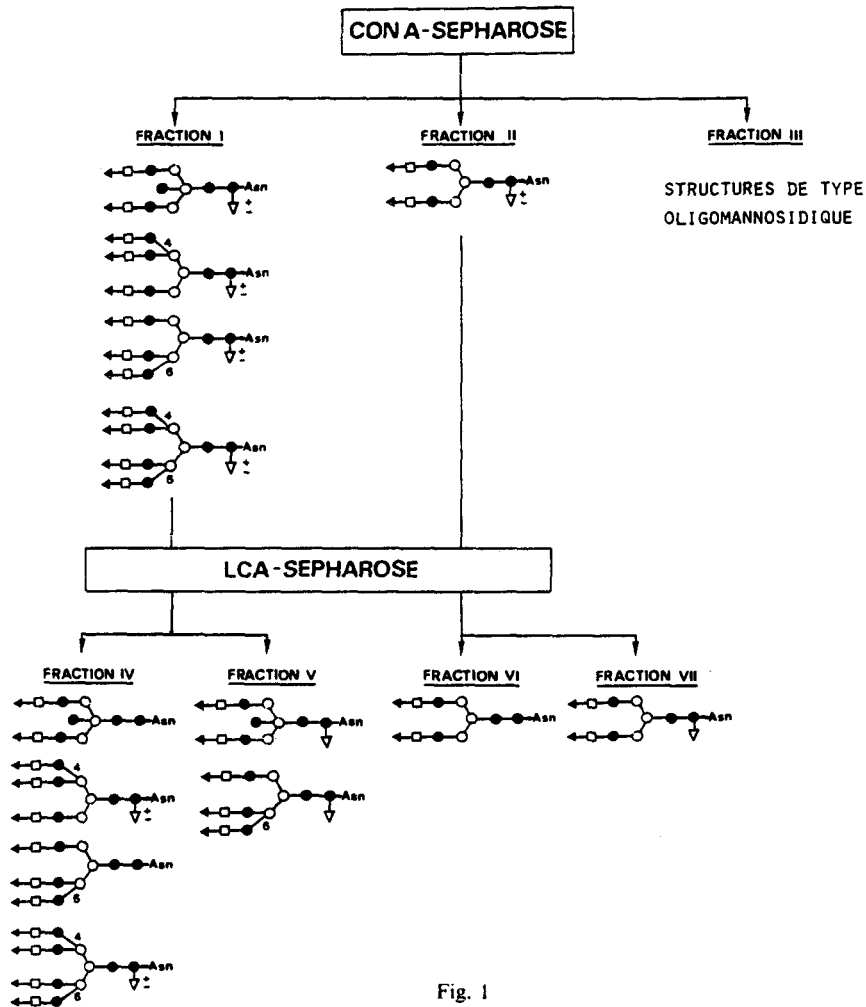


Fig. 1

TABLEAU I

Répartition (en pour cent de la radioactivité totale des glycopeptides) des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonnes de Con A et de LCA immobilisées des glycopeptides pronasiques des fibronectines de cellules BHK 21/C13 et BHK 21/C13-HSV.

Repartition (in percent of total glycopeptide radioactivity) of the fractions obtained by affinity chromatography on immobilized Con A and LCA columns of pronase glycopeptides from BHK21/C13 and BHK21/C13-HSV fibronectins.

	Fractionnement sur Con A			
	Fraction I	Fraction II	Fraction III	
BHK 21/C13 . . . . .	40	55	3	
BHK 21/C13-HSV . . . . .	69	28	2	
	Sous-fractionnement sur LCA			
	de la Fraction I		de la Fraction II	
	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI	Fraction VII
BHK 21/C13 . . . . .	29	11	11	44
BHK 21/C13-HSV . . . . .	63	6	6	22

PLANCHE II/PLATE II

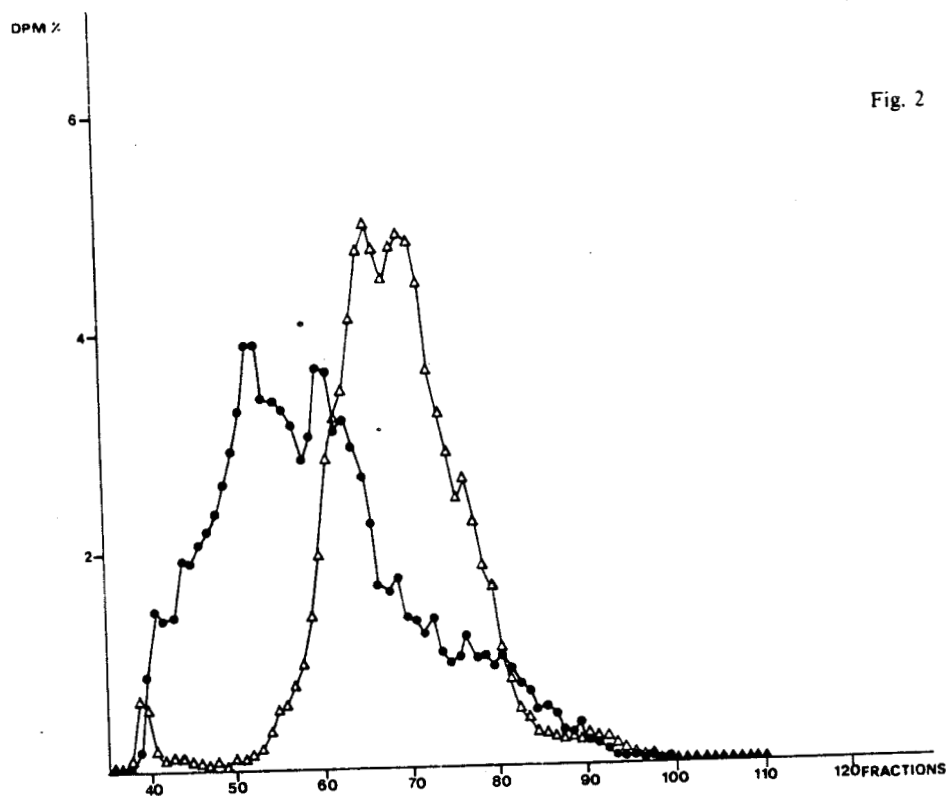


Fig. 2

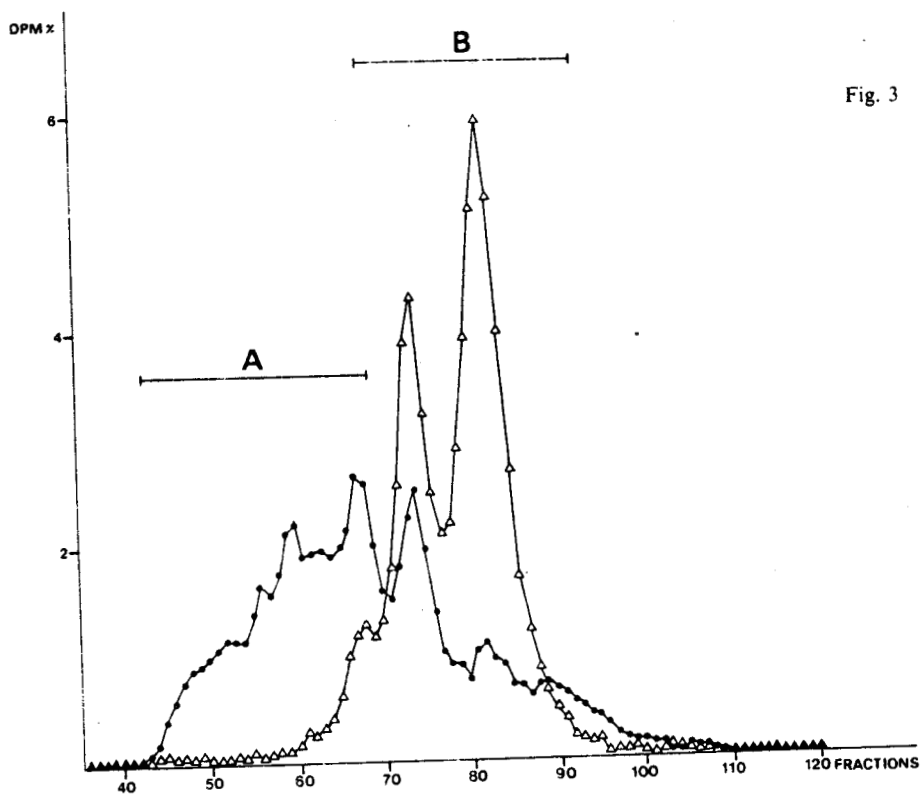


Fig. 3



pourraient compter parmi les facteurs de dissociation spontanée du tissu cancéreux, prélude à la diffusion métastatique. En effet, la construction de modèles moléculaires [17], puis des résultats expérimentaux [18] ont montré que les glycanes tri- et tétraantennés adoptaient une conformation étalée dite « en parapluie » couvrant des superficies importantes de la protéine, variant de 2000 à 3000 Å<sup>2</sup>. Cette conformation est maintenue par les liaisons ioniques que contractent les résidus d'acide sialique et d'amino-acides basiques. Elle pourrait être à l'origine d'un masquage des sites lectiniques de la fibronectine qui, en diminuant ou en abolissant l'affinité de ces derniers, pourrait être à l'origine de la disparition de la fibronectine du tissu cancéreux et expliquer en partie l'aptitude que présentent les cellules néoplasiques à se dissocier spontanément.

*Abbréviations.* — Asn, L-asparagine; Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; GlcNAc, N-acétyl-D-glucosamine; Man, D-mannose; NeuAc, acide N-acétylneuraminique; Con A, concanavoline A; LCA, lectine de *Lens culinaris*.

(<sup>1</sup>) Avec la collaboration technique de Myriam Coniez.  
Ce travail a bénéficié de l'aide de l'I.N.S.E.R.M. (CRE n° 832.029), du M.I.R. (Contrat 82-L-1099), de la Fondation pour la Recherche médicale et du C.N.R.S.

Le docteur L. Montagnier nous a aimablement fourni les lignées cellulaires.

Reçue le 21 août 1985, acceptée le 16 septembre 1985.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] U. V. SAUTER et M. C. GLICK, *Biochemistry*, 18, 1979, p. 2533-2540.
- [2] S. I. OGATA, T. MURAMATSU et A. KOBATA, *Nature*, 259, 1979, p. 580-582.
- [3] S. TAKASAKI, M. IKEHIRA et A. KOBATA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 1980, p. 735-742.
- [4] H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, G. SPIK et J. MONTREUIL, in *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, T. C. BØG-HANSEN et G. A. SPENGLER éd., De Gruyter, Berlin, 1983, p. 335-350.
- [5] J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE et P. DELANNOY, in *Structural carbohydrates in the liver*, M. POPPER, W. REUTTER, E. KÖTTGEN et F. GUDAT éd., M.T.P. Press, England, 1983, p. 239-258.
- [6] H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE et J. MONTREUIL, in *Proc. VIIth International Symposium on Glycoconjugates*, Lund, M. A. CHESTER, D. HEINEGARD, A. LUNDBLAD et S. SVENSSON éd., Rahms, Suède, 1983, p. 172.
- [7] H. DEBRAY, *Bull. Cancer*, 66, 1979, p. 353-372.
- [8] L. A. SMETS, *Biochim. Biophys. Acta*, 605, 1980, p. 93-111.
- [9] K. M. YAMADA, in *Glycoconjugates*, M. I. HOROWITZ éd., Acad. Press, New York, 3, 1982, p. 331-362.
- [10] I. MACPHERSON et M. STOKER, *Virology*, 16, 1962, p. 147-151.
- [11] E. ENGVALL et E. RUOSLAHTI, *Int. J. Cancer*, 20, 1977, p. 1-5.
- [12] B. BAYARD et J. MONTREUIL, in *Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve-d'Ascq, 20-27 juin 1973*, J. MONTREUIL éd., C.N.R.S., Paris, 1974, p. 209-218.
- [13] J. U. BAENZIGER et M. NATOWICZ, *Anal. Biochem.*, 112, 1981, p. 357-361.
- [14] D. D. WAGNER, R. IVATT, A. T. DESTREE et R. O. HYNES, *J. Biol. Chem.*, 256, 1981, p. 11708-11715.
- [15] K. MURAYAMA, E. J. NICHOLS, S. B. LEVERY, W. G. CARTER et S. I. HAKOMORI, *Glycoconjugate J.*, 1, 1984, p. 155-169.
- [16] M. FUKUDA et S. I. HAKOMORI, *J. Biol. Chem.*, 254, 1979, p. 5451-5457.
- [17] J. MONTREUIL, in *Comprehensive Biochemistry*, A. NEUBERGER et L. L. M. VAN DEENEN éd., Elsevier, Amsterdam, 19B, Part II, 1982, p. 1-188; *Pure and Appl. Chem.*, 56, 1984, p. 859-877.
- [18] Z. Q. LI, S. K. PERKINS et M. H. LOUCHEUX, *Eur. J. Biochem.*, 130, 1983, p. 275-279.

Université des Sciences et Techniques de Lille-I,  
Laboratoire de Chimie biologique et Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217,  
59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex.

### III. DISCUSSION.

Un des problèmes majeurs de l'analyse comparative des structures glycaniques des cellules transformées réside dans le choix de la cellule "normale" de référence. En effet, ces cellules sont pour la plupart établies en lignées continues et peuvent se révéler parfois tumorigène. L'idéal serait d'utiliser comme cellule de référence une lignée en culture primaire. Cependant, il est souvent difficile de maintenir ces cellules en vie, tout au moins pour un temps suffisamment long pour permettre une expérimentation approfondie.

Dans tous les cas, une question reste toujours en suspens. Quelle est l'influence de la mise en culture et de l'obtention de lignées continues sur la structure des glycanes? La mise en culture peut induire des modifications des activités enzymatiques cellulaires, conduisant à un changement de la partie glycanique des glycoconjugués de la surface cellulaire. A cet égard, il est possible de comparer la structure des glycanes de la fibronectine de cellule BHK21/C13 à celle de fibroblastes embryonnaires de Hamster. Comme le montre le Tableau IX (p. 81), la cellule embryonnaire possède une proportion de glycanes biantennés plus élevée que la cellule BHK21/C13. De même, la sialylation des glycanes de la fibronectine des cellules embryonnaires apparaît comme nettement plus faible, le taux de sialylation passant de 0,61 à 0,89 pour la fibronectine de BHK21/C13. Bien que ces deux cellules soient à des stades de différenciation différents, il est possible que ces modifications des glycanes de BHK21/C13 soient associées au fait que cette cellule soit en lignée continue.

Notre fractionnement a permis de montrer que les glycanes majeurs isolés de la fibronectine de fibroblastes non transformés possédaient une structure N-acétyllactosaminique biantennée et fucosylée, essentiellement neutre et monosialylée. Ce résultat est en accord avec ceux de Fukuda et Hakomori (136) et montre la fiabilité de cette méthode d'analyse des glycopeptides cellulaires.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence au niveau de la fibronectine, l'augmentation de l'antennarisation et de la sialylation préalablement caractérisée par divers laboratoires pour les glycopeptides des cellules transformées. D'autre part, dans le cas de la

Tableau IX.

A. Comparaison des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de Con A immobilisée des glycopeptides pronasiques des fibronectines de cellules BHK21/C13 et de fibroblastes embryonnaires de Hamster (résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale).

	FRACTION I	FRACTION II	FRACTION III
BHK21/C13.....	40	55	3
Fibroblastes embryonnaires.	30	64	6

B. Comparaison de la sialylation des glycanes libérés par hydrazinolyse des glycopeptides pronasiques de cellules BHK21/C13 et de fibroblastes embryonnaires de Hamster par HPLC d'échange d'ions (résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale).

Nombre de résidus acide sialique.....	0	1	2	3	4
BHK21/C13.....	36	45	14	4	1
Fibroblastes embryonnaires.	51	38	10	1	-

fibronectine, ces modifications de la glycosylation sont sensiblement plus importantes que lorsqu'on s'intéresse aux glycoprotéines cellulaires totales. A cet égard, il faut noter que lors de leurs expérimentations, l'équipe de Warren a comparé les glycopeptides obtenus par traitement tryptique de la surface des cellules. Dans ce cas, il est concevable que ces fractions soient constituées en grande partie de glycopeptides provenant de la fibronectine, cette dernière étant une des glycoprotéines majeures de la surface cellulaire et relativement sensible à la protéolyse.

Nos résultats, faisant suite à la première observation faite par Wagner et al. (502) sur les cellules NIL8, ont été confirmés par les travaux Murayama et al. (336) sur les fibroblastes humains. Il semble donc que ce phénomène soit généralisable, tout au moins en ce qui concerne les cellules fibroblastiques.

Récemment dans notre laboratoire, T. Magallon a mis en évidence un tel phénomène au niveau de la fibronectine isolée des plasmas d'individus cancéreux. Les analyses effectuées par électrophorèse d'immunoaffinité bidimensionnelle ont permis de montrer que, dans la majorité des cas, les patients atteints de cancer des voies digestives présentaient une fibronectine plasmatique enrichie en glycanes tri- et tétraantennés. Cependant, dans le cas de la fibronectine plasmatique, l'origine de ces modifications est encore incertaine. Ou bien la fibronectine présente dans le plasma est d'origine tumorale et révèle les modifications des activités enzymatiques des cellules cancéreuses, ou bien il s'agit de fibronectine plasmatique, synthétisée par le foie. Dans ce cas, les modifications de la glycosylation feraient suite à un dérèglement des activités glycosyltransférasiques hépatiques. A cet égard, Spik et al. (548) ont observé une nette augmentation des glycanes triantennés de la sérotransferrine lors de l'hépatite virale ou de la cirrhose et ont également retrouvé ce phénomène lors de la grossesse, montrant que la glycosylation des protéines sériques peut être modifiée dans le cas de troubles hépatiques, mais aussi lors de certains processus physiologiques n'affectant pas directement cet organe. En outre, les glucocorticoïdes semblent responsables de l'activation de certaines glycosyltransférases hépatiques telles que la sialyltransférase (285,491).

Dans tous les cas, ces résultats sont le reflet de modifications des activités glycosyltransférasique cellulaires et il nous a semblé

utile de comparer ces activités au niveau des cellules BHK21/C13 et BHK21/C13-HSV. En particulier, nous nous sommes orienté vers l'étude des activités sialyltransférasiques du fait de l'augmentation considérable de la sialylation que nous avons mise en évidence dans les cellules transformées.

En outre, à la suite de cette étude nous avons envisagé la possibilité d'un masquage des sites de fixation de la fibronectine par les glycannes "lourds". Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris de déterminer l'influence de la glycosylation sur l'affinité de la molécule pour le collagène. Cette étude sera détaillée dans le chapitre III.

ETUDE COMPAREE DES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES  
DES CELLULES BHK21/C13 ET BHK21/C13-HSV.

## I. INTRODUCTION.

Avant de présenter nos travaux sur les activités sialyltransférases des cellules BHK21/C13 et BHK21/C13-HSV, il nous a semblé utile de faire le point des connaissances actuelles des sialyltransférases des cellules normales et transformées.

La sialylation est, avec la fucosylation, une des étapes ultimes de la synthèse de la partie glycanique des N-glycosylprotéines. Ce transfert est catalysé par des sialyltransférases (CMP-Neu5Ac: glycoprotéine sialyltransférases; EC 2.4.99.1) spécifiques. La spécificité porte à la fois sur l'anométrie de la liaison et sur la nature de l'accepteur. C'est ainsi que des sialyltransférases spécifiques des liaisons  $\alpha$ -2,3,  $\alpha$ -2,6 et  $\alpha$ -2,8 ont été purifiées et que les sialyltransférases actives sur les structures glycopeptidiques sont inactives vis-à-vis de structures glycolipidiques. Des études par immuno-fluorescence ont permis de montrer que les activités sialyltransférases étaient localisées au niveau du Trans-Golgi (43,334). Dès 1972, Hudgin et Schachter montraient que des extraits de foie de Rat catalysaient la synthèse de sialyl $\alpha$ -2,3- et de sialyl $\alpha$ -2,6-lactose (207). L'activité  $\beta$ -galactosyl-(1-4)-N-acétylglucosaminyl  $\alpha$ -2,3-sialyltransférases a été caractérisée dans différents tissus animaux et humains (488) et, plus récemment, Weinstein *et al.* (511) ont réussi à purifier deux sialyltransférases du foie de Rat. La première est une  $\alpha$ -2,6-sialyltransférases qui transfère l'acide sialique sur le motif Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R (où R = H ou une chaîne oligosaccharidique liée N-glycosidiquement). La seconde permet l'incorporation d'acide sialique en  $\alpha$ -2,3 sur le chaînon Gal( $\beta$ 1-3/4)GlcNAc-R, les O-glycosides n'étant pas accepteurs de ces enzymes (510).

Paulson *et al.* (366) ont comparé les cinétiques d'incorporation d'acide sialique catalysée par l' $\alpha$ -2,6-sialyltransférases du foie de Rat, sur l'asialo-orosomucoïde et l'asialo-transferrine. A faible concentration, l'enzyme est capable de sialyler totalement l'asialotransferrine mais seulement 50% des sites de l'asialo-orosomucoïde, la saturation nécessitant des concentrations en enzyme vingt fois plus élevées. Un enzyme similaire a été purifié du colostrum de Vache (192,365,487) et Paulson *et al.* (367) ont montré que cet enzyme répondait à un mécanisme

bi-bi aléatoire. Van den Eijnden et al. (487) et Joziasse et al. (235), en utilisant des glycopeptides bi-, tri- et tétraantennés, ont montré la sialylation préférentielle de la branche GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man liée en  $\alpha$ -1,3 sur le  $\beta$ -mannose, quel que soit l'accepteur utilisé. Cette spécificité d'action disparaît lorsque le di-N-acétylchitobiose du noyau central est éliminé (236). En outre, l'activité enzymatique apparente diminue lorsque le nombre des antennes augmente. Enfin, selon Bendiak et Cook (39,40), l' $\alpha$ -2,6-sialyltransférase purifiée du foie d'embryon de Poulet répondrait également à un mécanisme bi-bi aléatoire mais, contrairement aux observations faites par Joziasse et al., la fraction glycopeptidique de l'orosomucoïde désialylé serait son meilleur accepteur. Ces différents résultats nous montrent à quel point les sialyltransférases possèdent une haute spécificité d'accepteur et les difficultés rencontrées lorsqu'on s'attache à définir les interactions qui régissent la formation du complexe enzyme-substrat.

En 1972, Warren et al. (507) montraient l'enrichissement en acide sialique des glycopeptides isolés de cellules cancéreuses et suggéraient qu'une sialyltransférase spécifique des cellules transformées pourraient être responsable de cette augmentation de la sialylation. Consécutivement, Bosmann et al. (57) montraient qu'une lignée cellulaire murine à haut pouvoir métastasant avait une activité ectosialyltransférasique sensiblement plus élevée que son homologue à faible pouvoir métastasant et associaient ces différences d'activités au pouvoir métastasant des tumeurs. Depuis, de nombreuses études ont porté sur la comparaison des activités sialyltransférasiques des cellules normales et cancéreuses (31,58,59,248,386,408,423,507,512). Cependant, quelques équipes seulement ont tenté de définir avec précision les conditions expérimentales optimales de mesure de ces activités. En particulier, dans la plupart des cas, les études ont été effectuées avec des concentrations non saturantes en CPM-Neu5Ac radioactif. Dans ces conditions, il est difficile de comparer les activités sialyltransférasiques de deux ou plusieurs lignées cellulaires. Le choix de l'accepteur est également primordial. De nombreuses équipes ont utilisé l'asialofétuine comme accepteur. La fétuine renfermant à la fois des structures O- et N-glycosidiques (30), plusieurs sialyltransférases peuvent utiliser ce substrat ce qui rend les résultats difficilement interprétables. De plus, certaines erreurs expérimentales ont été commises. En particulier, Klohs et



al. (256) ont montré que l'activité sialyltransférasique ne nécessitait pas l'addition d'ions divalents et que des concentrations supérieures à 2 ou 5 mM ( $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  respectivement) diminuaient l'activité enzymatique. Le Triton X-100, ajouté à des concentrations supérieures à 0,5 %, inhibe également l'enzyme. Enfin, les sialyltransférases cellulaires sont relativement peu stables. Les congélations-décongélations, les fortes concentrations en détergents, méthodes utilisées pour lyser les cellules, induisent une diminution importante de certaines activités sialyltransférasiques. Cependant, et malgré toutes ces réserves, il apparaît généralement une augmentation sensible de l'activité sialyltransférasique dans les cellules tumorales. Quelques études ont pourtant amené les auteurs à des conclusions plus nuancées, voire opposées. Ces exemples sont toutefois trop peu nombreux pour être pris en compte (13,79).

La plupart des études effectuées ont montré une élévation des activités sialyltransférasiques dans le sang des patients cancéreux (80,141,191,245-246,436,460,512). Cependant, l'activité sialyltransférasique sérique reste sensiblement voisine de la normale lorsque la tumeur maligne est aux premiers stades de son développement. L'augmentation de l'activité n'est en fait réellement significative que lorsque la tumeur est nettement développée et lors de l'apparition de métastases (44,79,220,436,460). L'origine tissulaire des sialyltransférases sériques reste incertaine. Certains auteurs ayant observé une augmentation simultanée de l'activité sialyltransférasique dans le sérum et dans les tissus cancéreux, ont émis l'hypothèse d'une "fuite" des activités enzymatiques membranaires des cellules néoplasiques (110,220). Malgré ces observations, le foie, source principale des glycoprotéines circulantes, semble être à l'origine de l'activité sialyltransférasique sérique (79,549,550). Dans tous les cas, la détermination des activités sialyltransférasiques sériques demeure d'un intérêt limité du point de vue clinique (1,124,405,406,426). L'élévation de l'activité enzymatique n'est, en effet, significative et interprétable qu'après un développement important de la tumeur primitive et lors de l'apparition de métastases. De plus, les faibles augmentations d'activités peuvent être provoquées par des infections bénignes (407). A cet égard, les activités sialyltransférasiques hépatiques peuvent être multipliées par trois dans le sérum 72 h après le début du phénomène inflammatoire (285) et il a été montré que la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique augmentait l'activité

et la sécrétion de la sialyltransférase des hépatocytes en culture (491).

L'augmentation de la sialylation des glycanes des glycoprotéines membranaires et de la fibronectine des cellules BHK21/C13-HSV nous a amené à étudier les activités sialyltransférasiques de ces cellules vis-à-vis de différents accepteurs. En particulier, nous nous sommes attaché à mesurer les activités enzymatiques des deux lignées cellulaires pour le lactose et pour des glycopeptides biantennés (purifiés de la sérotransferrine) et tri- et tétraantennés (purifiés de l'orosomucoïde). Au préalable, nous avons mis au point les conditions d'incubation optimales afin d'éliminer les différentes causes d'erreurs. A cet égard, il nous a été nécessaire d'inhiber les activités  $\beta$ -galactosidasiques et neuraminidasiques présentes dans les fractions microsomiques utilisées pour nos mesures d'activités

Le mémoire suivant rapporte l'essentiel des résultats de cette étude. Il est accepté pour publication au périodique European Journal of Biochemistry. Il a fait l'objet d'une communication au Colloque International sur la Biosynthèse des Glycoprotéines à Aussois (France) en mars 1986.

HIGH SIALYLATION OF VIRUS-TRANSFORMED BABY HAMSTER KIDNEY  
CELLS FIBRONECTIN IS ASSOCIATED TO THE INCREASE OF  
**α**-2,3-SIALYLTRANSFERASE ACTIVITY IN RELATION TO TRI- AND  
TETRAANTENNARY N-GLYCOPEPTIDIC ACCEPTORS.

Delannoy Philippe<sup>\*</sup>, Debray Henri and Montreuil Jean.

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Associée au CNRS n°217 et  
Laboratoire Pilote du Ministère de l'Education Nationale), Université  
des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve  
d'Ascq Cedex, France.

\* : To whom all correspondence should be addressed.

Abbreviations. BHK21/C13: baby hamster kidney fibroblast cell line; HSV: hamster sarcoma virus; Fn: fibronectin; Neu5Ac: N-acetylneuraminic acid; Gal: galactose; Glc: glucose; GlcNAc: N-acetylglucosamine; Lac: lactose; ASSTF: asialotransferrin glycopeptides; ASOR: asialoorosomucoid glycopeptides; ConA: concanavalin A.

Enzymes. Galactose oxidase (D-galactose: oxygen 6-oxidoreductase; EC 1.1.3.9);  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23); neuraminidase (acylneuraminyl hydrolase; EC 3.2.1.18); sialyltransferase (CMP-N-acetylneuraminic acid: glycoprotein sialyltransferase; EC 2.4.99.1).

SUMMARY

Transformation of BHK21/C13 cells by the hamster sarcoma virus induces dramatic modifications of the N-acetyllactosaminic type glycans of fibronectin secreted in the culture medium. In fact, the ratio tri- and tetraantennary glycans/ biantennary glycans increases from 0.73 to 2.46. Moreover, the fibronectin is enriched in sialic acid, due to the increase of di-, tri- and tetrasialylated glycans (Delannoy et al. 1985, C. R. Acad. Sci. 301, 767-772).

On the basis of these results, we have undertaken the study of the sialyltransferase activities of these cells. Assays were performed using desialylated biantennary glycopeptides from serotransferrin and desialylated tri- and tetraantennary glycopeptides from orosomucoid as acceptors. BHK cell extracts catalysed the incorporation of [<sup>14</sup>C]-Neu5Ac only in  $\alpha$ -2,3- linkage into both acceptors. Comparison of relative acceptor activity ( $V_{max}/K_m$ ) of ASSTF (respectively 38.3 pmol/mg.h.mM for control and 63.9 pmol/mg.h.mM for transformed BHK) and of ASOR (respectively 64.1 and 189.6 pmol/mg.h.mM) indicates that the increase of sialylation activity affected especially high-branched glycan structures. From these data, we can correlated the high sialylation rate of Fn (Delannoy et al. 1985, C. R. Acad. Sci. 301, 767-772) and others cellular glycoproteins from transformed BHK cells (Montreuil et al. 1983, in "Structural Carbohydrates in the Liver", Popper et al. eds., M.T.P. Press, England, pp. 239- 258) and the activity of sialyltransferase, significantly enhanced for high-branched glycans which exist in highest proportion in tranformed cells.

## INTRODUCTION.

Transformation of BHK21/C13 cells by hamster sarcoma virus induces important modifications of glycans of the N-acetyllactosaminic type [1-3]. In particular, fibronectin, a high molecular weight glycoprotein from the extracellular matrix [4,5], seems to be very sensitive to viral transformation. The modifications of glycan structure of Fn isolated from the culture medium have been described for several cell types [6-8]. In all of the cases, the proportion of tri- and tetraantennary glycans is increased to the prejudice of biantennary structures. Moreover, we have showed that Fn from transformed cells (BHK21/C13-HSV) is enriched in sialic acid due to an increase of di-, tri- and tetrasialylated glycans [8].

Sialic acid has been demonstrated to play an important role in biological processes, including cellular adhesiveness, binding of virus to cells, activation of lymphocytes, synaptic transmission and protection of circulating glycoproteins and cells against blood clearance system (for reviews see Ref. 9,10). Elevated levels of sialic acid and/or sialyltransferase activities have been observed in plasma of humans and animals bearing malignant tumors [11,12]. In addition, the sialic acid content of tumor cells appears to correlate with metastatic ability [13].

Knowing that Fn plays an important role in cellular adhesion, we recently proposed an hypothesis concerning the mechanism of metastasis based on the partial or total loss of biological properties of Fn by a masking of the binding sites by tri- and tetraantennary glycans [8]. Additional sialic acid residues might be associated to this process. In this regard, a better knowledge of the factors which control the content

of glycoprotein sialic acid could lead to a better understanding of tumorigenesis and metastasis mechanism.

In this paper, we present further studies on sialylation of transformed cells Fn and we compare sialyltransferase activities of normal and transformed BHK21/C13 using asialoglycopeptides as acceptors.

#### MATERIALS AND METHODS.

##### Chemicals:

All reagents were of analytical grade. [6-<sup>3</sup>H]-GlcNAc (35 Ci/mmol), [U-<sup>14</sup>C]-GlcNAc (300 Ci/mol) and CMP-[U-<sup>14</sup>C]-Neu5Ac were purchased from Amersham Lab. (Amersham, U.K.). [<sup>3</sup>H]-potassium borohydride (60 Ci/mmol) was obtained from CEA (Saclay, France). Gelatin-Sepharose 6B and ConA-Sepharose 6B were from Pharmacia (Uppsala, Sweden), pronase from Calbiochem., anhydrous hydrazine from Pierce Chem. Comp. (Rockford, USA) and D-galactono-1,4-lactone and p-nitrophenyl-β-D-galactoside from Sigma Chem. Comp. (St Louis, USA).

CMP-Neu5Ac, prepared according to Haverkamp et al. [14] and 2,3-dehydro-Neu5Ac were gifts of Dr J-C. Michalski. Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)-Glc, Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc, both isolated from human milk, and Neu5Ac were gifts of Dr G. Strecker. [<sup>14</sup>C]-Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc was isolated by paper chromatography from the incubates we used in our experiments.

### Cell culture.

Normal cells (BHK21/C13) and transformed cells (BHK21/C13-HSv) were grown at 37°C in modified Eagle's medium [15], supplemented with NaHCO<sub>3</sub> 33 mM, L-glutamine 2 mM, 0.3 % (v/v) bactotryptose, aureomycin 5 µg/ml, fungizone 25 µg/ml and 10 % (v/v) new-born calf serum.

### Metabolic labeling and purification of Fn.

For radioactive labeling, [6-<sup>3</sup>H]-GlcNAc (4 µCi/ml) for BHK21/C13 and [U-<sup>14</sup>C]-GlcNAc (1 µCi/ml) for BHK21/C13-HSv were added in the medium. After 72h of culture, Fn was purified from the culture medium by affinity chromatography on Gelatin-Sepharose 6B [16]. The purity of the preparations was verified by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis [17] and by autoradiography.

### Fractionation of glycans from labeled fibronectin.

Labeled Fn was submitted to an extensive pronase digestion as previously described [18] and the obtained [<sup>3</sup>H]-glycopeptides from BHK21/C13 and [<sup>14</sup>C]-glycopeptides from BHK21/C13-HSv were mixed in equal proportion and the radioactivity was measured by dual label counting. Labeled glycopeptides were purified on a AcA 202 column (IBF, France) equilibrated in Tris/HCl 50 mM / NaCl 0.154 M pH 7.4 buffer and, for one part, fractionated on ConA-Sepharose column according to Debray *et al.* [1].

Glycans were released from glycopeptidic fractions by hydrazinolysis [19]. Lyophilised samples were dissolved in 0.5 ml of anhydrous hydrazine and heated at 105°C during 20 h. The residue was freed from



hydrazine by repeated evaporation with toluene under nitrogen flow. The resulting glycans were N-reacetylated with acetic anhydrid after prior dissolution in 300 µl of saturated sodium hydrogenocarbonate solution and purified by gel permeation on Bio-Gel P-2 column (BioRad Lab., München, West-Germany) equilibrated in water.

Glycans have been fractionated in terms of number of sialic acid residues by HPLC on Micropak AX-10 ion-exchange column (Varian Associates, USA) according to Baenziger and Natowicz [20]. Neutral, mono-, di-, tri, and tetrasialylated glycans isolated from orosomucoid were used as markers.

#### Preparation of cell homogenates.

Cells ( $0.6-1 \times 10^8$ ) were harvested at confluency, washed three times in cold 10 mM sodium phosphate / NaCl 0.154 M pH 7.4 buffer (PBS) and scraped off in buffer. The total amount of cells was centrifuged at 1500 x g for 5 min and washed twice in sodium cacodylate 50 mM / NaCl 0.154 M pH 6.5 buffer (buffer A). The cell pellets were resuspended in buffer A to obtain about  $5 \times 10^7$  cells/ml and homogenized during 30 sec with a M.S.E. 150 Watt Ultrasonic desintegrator using an exponential titanium probe (amplitude 10 µm peak to peak). The insoluble particles were removed by centrifugation at 4°C and 10,000 x g for 10 min. The pellets were discarded and the supernatants were either used immediately in the transferase assays or deep-frozen at -20°C for no more than two weeks. The protein concentration was determined with the BioRad Protein Assay (BioRad Lab., München, West-Germany) and was about 10-15 mg/ml [21].

Preparations of the acceptors.

Glycopeptides of the N-acetyllactosaminic type were obtained by an extensive pronase digestion of human serotransferrin and of orosomucoid ( $\alpha_1$ -acid glycoprotein). Orosomucoid was prepared from pathological human serum according to Schmid et al. [22]. Biantennary glycopeptides from serotransferrin, purified by ion-exchange chromatography, paper chromatography and by affinity chromatography on ConA-Sepharose [1], were a generous gift of Pr G. Spik. The fraction eluted with  $\alpha$ -D-methylglucoside 10 mM was desalted on Bio-Gel P-2 column equilibrated in water. Tri- and tetraantennary glycopeptides were also purified by affinity chromatography on ConA-Sepharose to eliminate the biantennary fraction. The unbound material was desalted on Bio-Gel P-2 column equilibrated in water.

Glycopeptides were desialylated by mild acid hydrolysis with trifluoroacetic acid 0.1 N, at 80°C for 35 min, according to Zanetta and Gombos [23]. Trifluoroacetic acid was eliminated by evaporation under vacuum and Neu5Ac was eliminated by ion-exchange chromatography on Dowex 1 x 2 (200-400 mesh, formate form), followed by gel permeation on Bio-Gel P-2 column equilibrated in water.

Sugar analysis of desialylated fractions was performed by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation [24]. Structures of major asialoglycopeptides from serotransferrin [25] and orosomucoid [26] are given in Fig.1.

Terminal galactose residues of asialoorosomucoid glycopeptides (ASOR) were labeled by galactose oxidase and reduction by [ $^3$ H]-potassium borohydride according to Morrel et al. [27]. Specific activity of the galactose labeled glycopeptides ([ $^3$ H]-ASOR) was equal to 1.5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol.

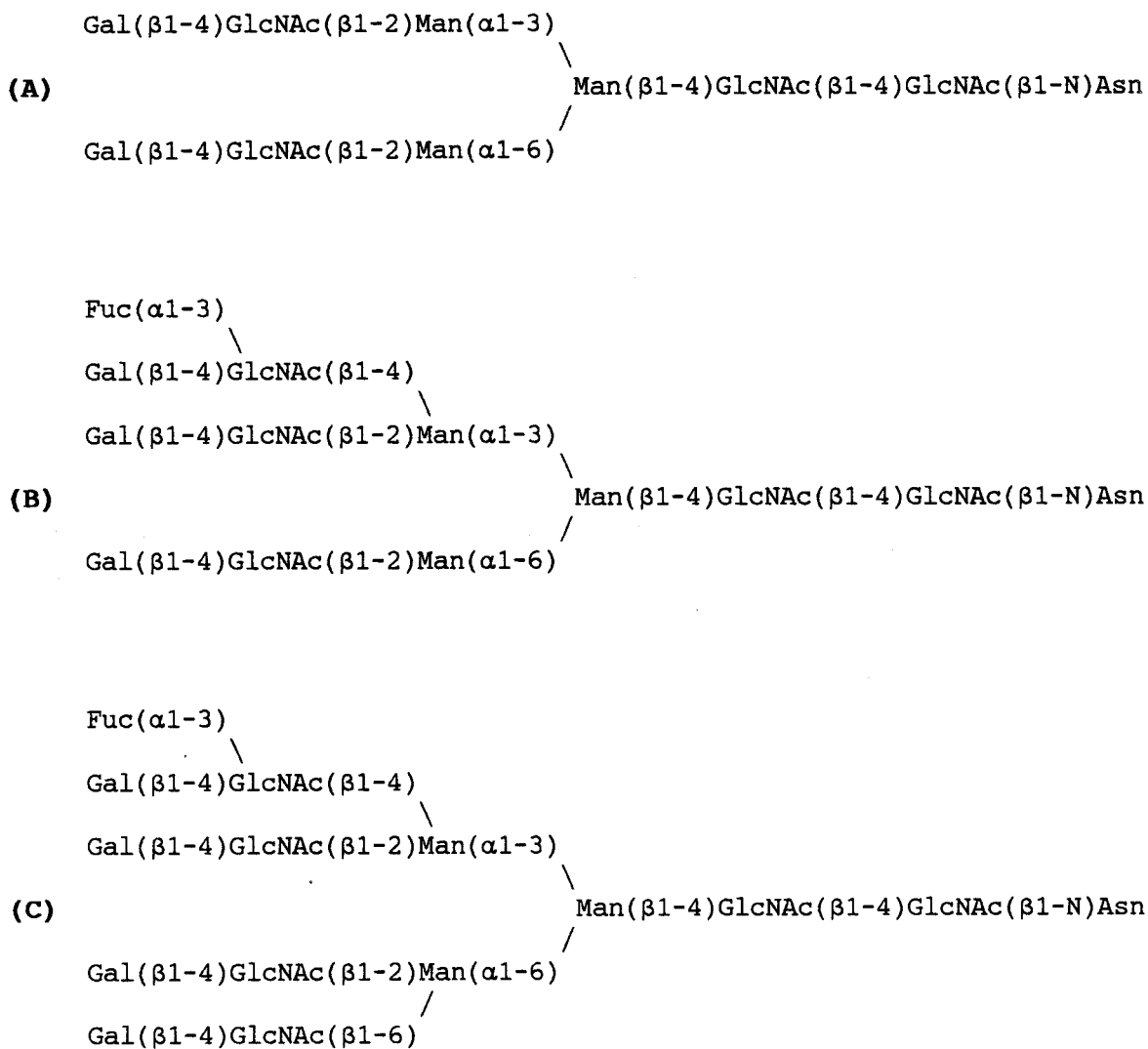


Fig.1. Structure of the asialoglycopeptides used as substrates.

**(A)**: biantennary glycopeptides from human serotransferrin (25); **(B)** and **(C)**: tri- and tetraantennary glycopeptides from orosomucoid (26).

CMP-Neu5Ac: glycoprotein sialyltransferase assays.

Each assay was performed with replicate samples of cell homogenates prepared on separate occasions. The results are expressed as average values.

The standard enzyme reaction mixture contained, in a final volume of 120  $\mu$ l, 50  $\mu$ l of cell homogenates (10-15 mg/ml of protein), 0.69 nmol of CMP-[U-<sup>14</sup>C]-Neu5Ac ( $4.4 \times 10^5$  dpm), 30 nmol of non-radioactive CMP-Neu5Ac (final concentration: 255  $\mu$ M), 0.1 M Gal as inhibitor of  $\beta$ -galactosidase, 1 mM 2,3-dehydro-Neu5Ac as inhibitor of neuraminidase, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>, sodium cacodylate 50 mM NaCl 0.154 M pH 6.5 buffer and acceptors. Asialotransferrin glycopeptides (ASSTF) were added to a final concentration of 2.5 mg/ml and asialoorosomucoid glycopeptides (ASOR) to a final concentration of 1.67 mg/ml to obtain a concentration of terminal galactose residues equal to 2.0 mM.

For the determination of endogenous activity, exogenous acceptors were omitted from the assay. Blank assays were also run with or without acceptors, substituting buffer A to cell homogenates. After 1-8 h incubation at 37°C, the reactions were stopped by refrigeration of samples in ice-cold water bath and samples were submitted to paper chromatography for 40 h in solvent mixture (A): ethyl acetate/ pyridine/ acetic acid/ water (5:5:1:3, by volume). The radioactivity was measured by cutting the paper strips into 1 cm pieces and counting in a toluene-based scintillation mixture.

All sialyltransferase activities were expressed as exogenous activities by calculating the difference between total (in the presence of acceptor) and endogenous activities. Assay results were expressed as pmol of Neu5Ac transferred per mg of protein per hour.



Assay of glycosidases.

Activities of  $\beta$ -galactosidase and neuraminidase were determined in cell homogenates in the standard conditions used for sialyltransferase assay.

The standard assay for  $\beta$ -galactosidase contained, in a final volume of 240  $\mu$ l, 100  $\mu$ l of cell homogenates, sodium cacodylate 50 mM / NaCl 0.154 M pH 6.5 buffer, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{CaCl}_2$  and 100  $\mu$ M of [ $^3\text{H}$ ]-ASOR ( $7.8 \times 10^6$  dpm). Blank assays were run without cell homogenates. To inhibit  $\beta$ -galactosidase activity, 10 mM of D-galactono-1,4-lactone, 10 mM of p-nitrophenylgalactoside or 0.2 M galactose were respectively added in the standard mixture. After 1-8 h of incubation at 37°C, the samples were separated by paper chromatography for 16 h in solvent (A). Results were expressed as nmol of [ $^3\text{H}$ ]-galactose liberated per mg of protein per hour.

The standard assay for neuraminidase contained, in a final volume of 120  $\mu$ l, 50  $\mu$ l of cell homogenates, 50  $\mu$ l of buffer A, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{CaCl}_2$  and either 36  $\mu$ M of [ $^{14}\text{C}$ ]-Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc ( $7.9 \times 10^3$  cpm). Blank assays were run without cell homogenates. Inhibition of neuraminidase was carried out by adding in the incubation mixture from 0.2 to 5 mM 2,3-dehydro-Neu5Ac [28]. After 1-4 h of incubation at 37°C, samples were submitted to paper chromatography for 16 h in solvent (A). Results were expressed as nmol of [ $^{14}\text{C}$ ]-Neu5Ac liberated per mg of protein per hour.

Identification of sialylated derivatives.

[ $^{14}\text{C}$ ]-sialyllactose was identified by paper chromatography using the following solvent mixtures: (A): ethyl acetate/ pyridine/ acetic

acid/ water (5:5:1:3, by volume) and (B): ethanol/ 1 M ammonium acetate pH 7.5 (7 : 3, by volume). Neu5Ac, Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Lac and Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Lac were used as markers and co-chromatographed with radioactive samples.

The determination of the linkage of Neu5Ac on glycopeptidic acceptors was performed according to Van den Eijnden et al. [29]. In a final volume of 240  $\mu$ l, 0.1 mM of [ $^3$ H]-ASOR ( $7.8 \times 10^6$  dpm) corresponding to 0.42 mM terminal galactose residues were incubated in the standard conditions of assays with 1 mM of CMP-Neu5Ac and without CPM-[ $^{14}$ C]-Neu5Ac. Blank assays were run without CMP-Neu5Ac. The reactions were stopped, after 7 h of incubation, by the addition of 240  $\mu$ l of ice-cold 10 % (w/v) trichloroacetic acid. The supernatant was collected after centrifugation, adjusted at pH 6 with NaOH 1 N and desalted on Bio-Gel P-2 columns equilibrated in water. The sialylated [ $^3$ H]-glycopeptides were further purified by ion-exchange chromatography on Dowex 1 x 2 and eluted with 2 M pyridine acetate.

Sialylated glycopeptides were methylated according to Finne et al. [30]. Permethylated glycopeptides were hydrolysed with 4 N trifluoroacetic acid at 100°C for 4 h and analysed by thin-layer chromatography on precoated Silicagel 60 plates (Merck, Darmstadt, West-Germany) using the following solvent mixture (C): acetone/ 4.5 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (500:9, by volume). The plates were dried, the Silicagel strips were scraped off by 0.5 cm fractions and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting. A mixture of non-radioactive methylated galactose derivatives (2,3,4-tri-O-methyl-; 2,4,6-tri-O-methyl-; 2,3,6-tri-O-methyl- and 2,3, 4,6-tetra-O-methyl-galactose) were used as markers, co-fractionated with methylated [ $^3$ H]-galactose derivatives and revealed with a 5 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution at 100°C.

## RESULTS

### Co-fractionation of fibronectin glycans by ion-exchange HPLC.

Analysis of Fn glycopeptides isolated from the culture medium of BHK21/C13 and BHK21/C13-HSV by affinity chromatography on immobilized ConA and *Lens culinaris* agglutinin was previously described [8]. We show that transformation induces dramatic modifications of glycans of the N-acetyllactosaminic type of secreted Fn. Indeed, the ratio tri- and tetraantennary glycans/biantennary glycans increases from 0.73 to 2.46. Such observations were also described by Wagner et al. [6] on NIL 8 cells and by Murayama et al. [7] studying human embryonic lung fibroblasts SV-40 transformed in which the same ratio increases from 1.74 to 5.07.

Co-fractionation on Micropak AX 10 column of total Fn glycans provides five families of glycans in variable proportions according to the number of sialic acid residues as indicated in Table 1. The data we obtained show that transformation induces an increase of the sialylation rate (defined as the mean number of sialic acid residue per glycan) of BHK21/C13 fibronectin which passes from 0.89 in normal cells to 1.78 in virus-transformed fibroblasts. For *normal cells*, glycans are chiefly distributed into 3 peaks corresponding to the non-sialylated, mono- and disialylated glycans, the non-sialylated fraction representing about 45 % of the total radioactivity. Significantly, tri- and tetrasialylated glycans represent less than 5 %. On the contrary, neutral fraction from *transformed cells* Fn represents only 12 % of the total radioactivity while glycans containing 2 and more sialic acid residues represent more than 60 %.

Table 1. Ion-exchange HPLC analysis of glycans isolated from BHK21/C13 and BHK21/C13-HSv fibronectins and fractionated by ConA affinity chromatography.

Results are given in percentage of total radioactivity of each fraction (For details, see Materials and Methods). ConA(-): ConA unbound fractions; ConA(+): ConA bound fraction, eluted with  $\alpha$ -D-methylglucoside 10 mM.

Number of sialic acid residues per glycan	Repartition of total radioactivity %					
	Total glycans		ConA(-)		ConA(+)	
	BHK	BHK-HSv	BHK	BHK-HSv	BHK	BHK-HSv
0	36	12	7.2	4.2	35.7	13.6
1	45	25	49.3	28	47.9	35.4
2	14	33	15	26.8	16.4	51
3	4	23	6.5	29.8	-	-
4	1	6	2	11.2	-	-
Sialylation rate	0.89	1.78	1.07	2.16	0.81	1.37



Secondly, both fractions obtained by ConA fractionation were co-fractionated in the same conditions (see Table 1). Analysis of biantennary fraction, eluted from ConA-Sepharose column with  $\alpha$ -D-methylglucoside 10 mM (corresponding to 55 % of normal and 28 % of transformed cells Fn glycans) shows a complete inversion of the proportion of non-sialylated, mono- and disialylated glycans, the sialylation rate increasing from 0.81 in control to 1.37 in transformed cells. The same observation can be done for the tri- and tetraantennary glycans in which the increase of sialylation rate appeared to be most important: 1.07 for control and 2.16 for transformed cells Fn glycans.

These results lead us to the conclusion that the transformation-associated increase of BHK21/C13 is due, at least, to the increase of the number of non-reducing galactose residues accessible to the sialyltransferase according to the high proportion of tri- and tetraantennary glycans in transformed BHK21/C13 Fn [8]. In the meantime, the presence of a large proportion of highly sialylated glycans in transformed cell Fn, whatever the glycan structure, could be explained by a misregulation of sialyltransferase activity in BHK 21/C13-HSv.

#### Study of sialyltransferase activities.

##### a. Determination of standard conditions of assays.

- Concentration of CMP-NeuAc. Assays were performed using CMP-Neu-5Ac with a low specific radioactivity, obtained by the addition of non-radioactive CMP-Neu5Ac prepared according [14] to the commercial CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac. High concentration minimizes the variation of apparent

substrate activity of the enzyme due to a decrease of CMP-Neu5Ac concentration, chemically degraded (about 10-15 % after 4h of incubation at 37°C). Moreover, the addition of non-radioactive CMP-Neu5Ac minimizes the possible isotopic dilution by the endogenous pool of CMP-Neu5Ac [31]. Finally, in the standard conditions, we used a concentration in CMP-Neu5Ac of 255  $\mu$ M.

- Inhibition of neuraminidase. We have determined the neuraminidase activity in cell homogenates in the standard conditions used for sialyltransferase assays. Degradation of sialylated substrates was effective only for transformed BHK cell homogenates. Hydrolysis of [ $^{14}$ C]-Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Lac was equal to 1.22 nmol/mg protein.h. The total inhibition of neuraminidase was obtained by the addition of 2,3-dehydro-Neu5Ac [28] in the incubation mixture as showed in Fig.2. Inhibition of neuraminidase is complete at a concentration of 0.5 mM and the standard mixtures were adjusted to 1 mM in 2,3-dehydro-Neu5Ac for the further experiments.

- Inhibition of  $\beta$ -galactosidase.  $\beta$ -galactosidase activity was tested in the cell homogenates using [ $^3$ H]-ASOR.  $\beta$ -galactosidase was present in both cell homogenates and active under standard conditions of sialyltransferase assay. After 8 h of incubation, more than 30 % of [ $^3$ H]-Gal was liberated from [ $^3$ H]-ASOR by transformed cell homogenate. Thus, it was necessary to inhibit the  $\beta$ -galactosidase, which degraded and modified sialyltransferase acceptors during the incubation, to be able to compare both cell line activities. We assayed different inhibitors and we observed that  $\beta$ -galactosidase was completely inhibited by galactose. In the following experiments, the standard mixtures were adjusted to a concentration of 0.2 M Gal. We also verified that 0.2 M Gal

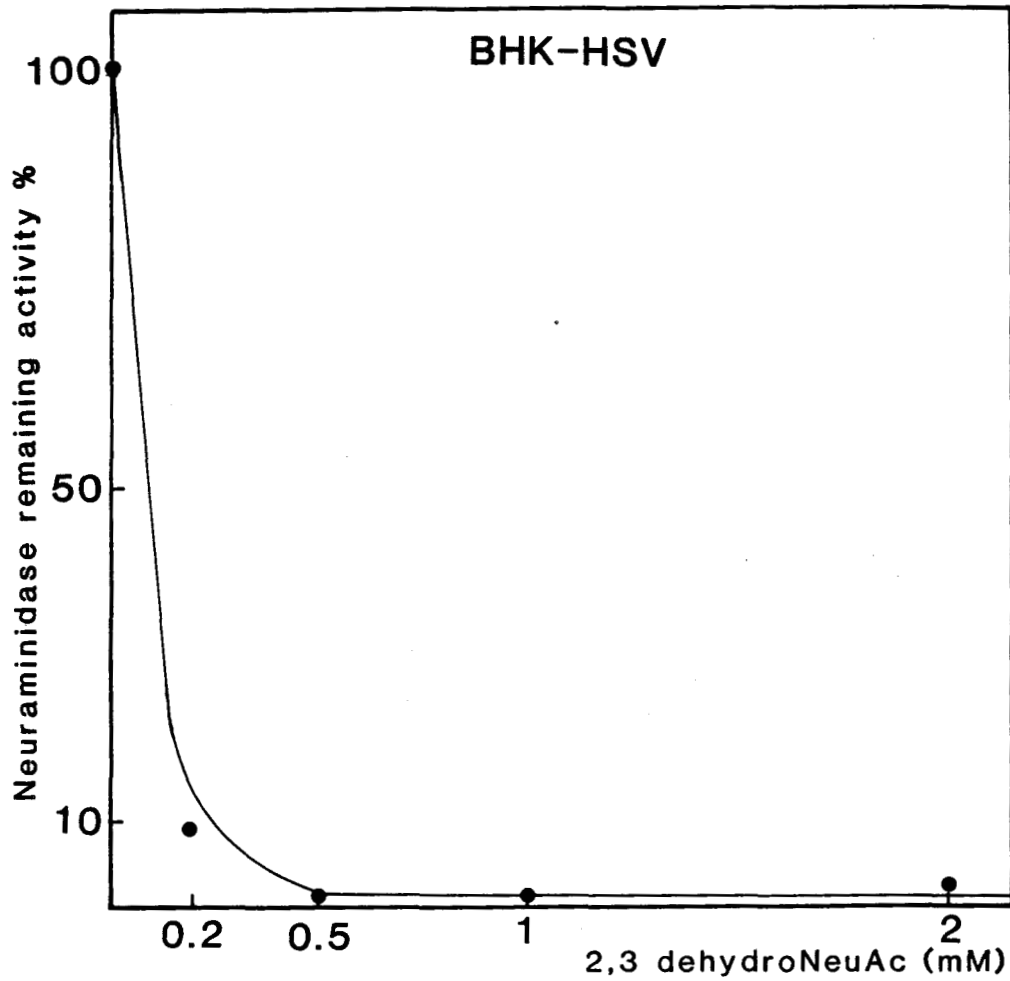


Fig.2. Inhibition of neuraminidase activity by 2,3-dehydro-Neu5Ac.

Inhibition of neuraminidase was assayed for 4 h at 37°C under standard conditions (For details, see Materials and Methods). [<sup>14</sup>C]-Neu5Ac(α2-3)Lac 36 μM was used as substrate. Results are expressed in percentage of remaining enzymatic activity as a function of inhibitor concentration (100 % activity in absence of inhibitor).

does not modified the sialyltransferase activity (data not showed).

b. Incorporation of Neu5Ac into glycopeptidic acceptors.

BHK21/C13 and BHK21/C13-HSv cell homogenates were tested with asialoglycopeptides from serotransferrin (ASSTF) and from orosomucoid (ASOR) as acceptors. Kinetics of incorporation show a significant enhancement of enzymatic transfer of [ $^{14}$ C]-Neu5Ac by transformed cell homogenates (Fig.3). Transfer appeared to be strongly increased for high branched glycopeptides as compared to biantennary glycopeptides.

We measured the effect of glycopeptides concentration on sialyltransferase activity in both cell lines. Assays were run with various concentrations of ASSTF and ASOR for 2 h under standard conditions. These experiments allow us to obtain an estimation of  $K_m$  and  $V_{max}$  for ASSTF and ASOR by an analysis of double-reciprocal V vs S plots (Fig.4). For ASSTF, apparent  $K_m$  values was about 0.65 mM for both cell homogenates and we calculated apparent  $V_{max} = 24.5$  pmol/mg protein.h for normal and 41.5 pmol/mg protein.h for transformed cell homogenates. It appeared that the enhancement of enzymatic activity is associated to the increase of  $V_{max}$ , the apparent affinity of the sialyltransferase remaining constant for asialo-biantennary glycopeptides.

When we measured the effect of the concentration of ASOR, we obtained different apparent  $K_m$  values for both cell homogenates: respectively 0.99 mM for BHK21/C13 and 0.67 mM for BHK21/C13-HSv. In the meantime,  $V_{max}$  was respectively 63.5 pmol/mg protein.h and 127 pmol/mg protein.h. The modification of the two parameters induces an important increase of enzymatic activity in BHK21/C13-HSv as indicated the

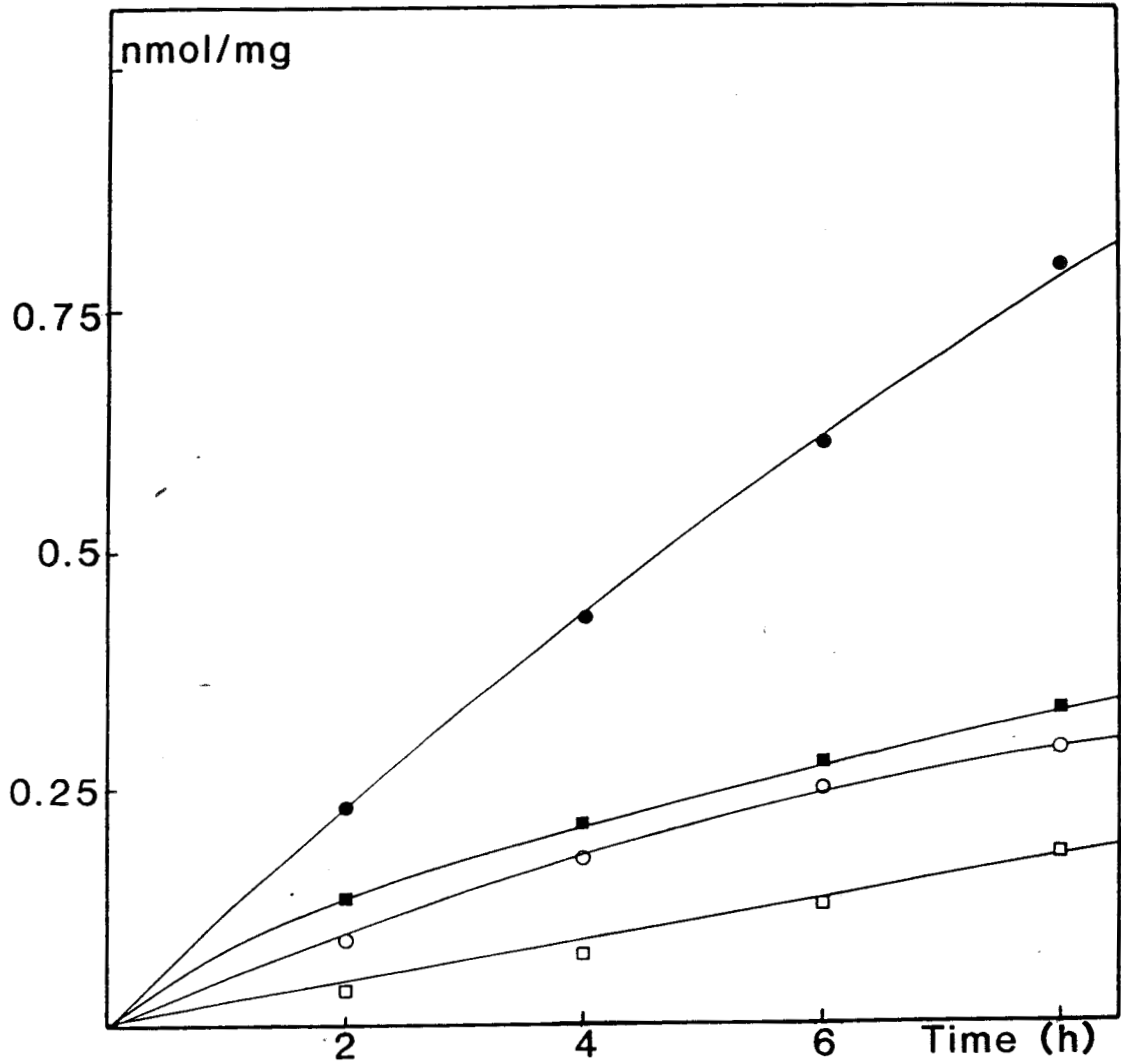


Fig.3. Kinetics of incorporation of [<sup>14</sup>C]-Neu5Ac into asialoglycopeptidic acceptors.

Experiments were carried out in the standard conditions for various amounts of time. ASSTF was added to a final concentration of 2.5 mg/ml and ASOR to a final concentration of 1.67 mg/ml to obtain in both cases 2.0 mM of terminal galactose residues.

(□-□-□): BHK21/C13 cell homogenate + ASSTF.

(■-■-■): BHK21/C13 cell homogenate + ASOR.

(○-○-○): BHK21/C13-HSv cell homogenate + ASSTF.

(●-●-●): BHK21/C13-HSv cell homogenate + ASOR.

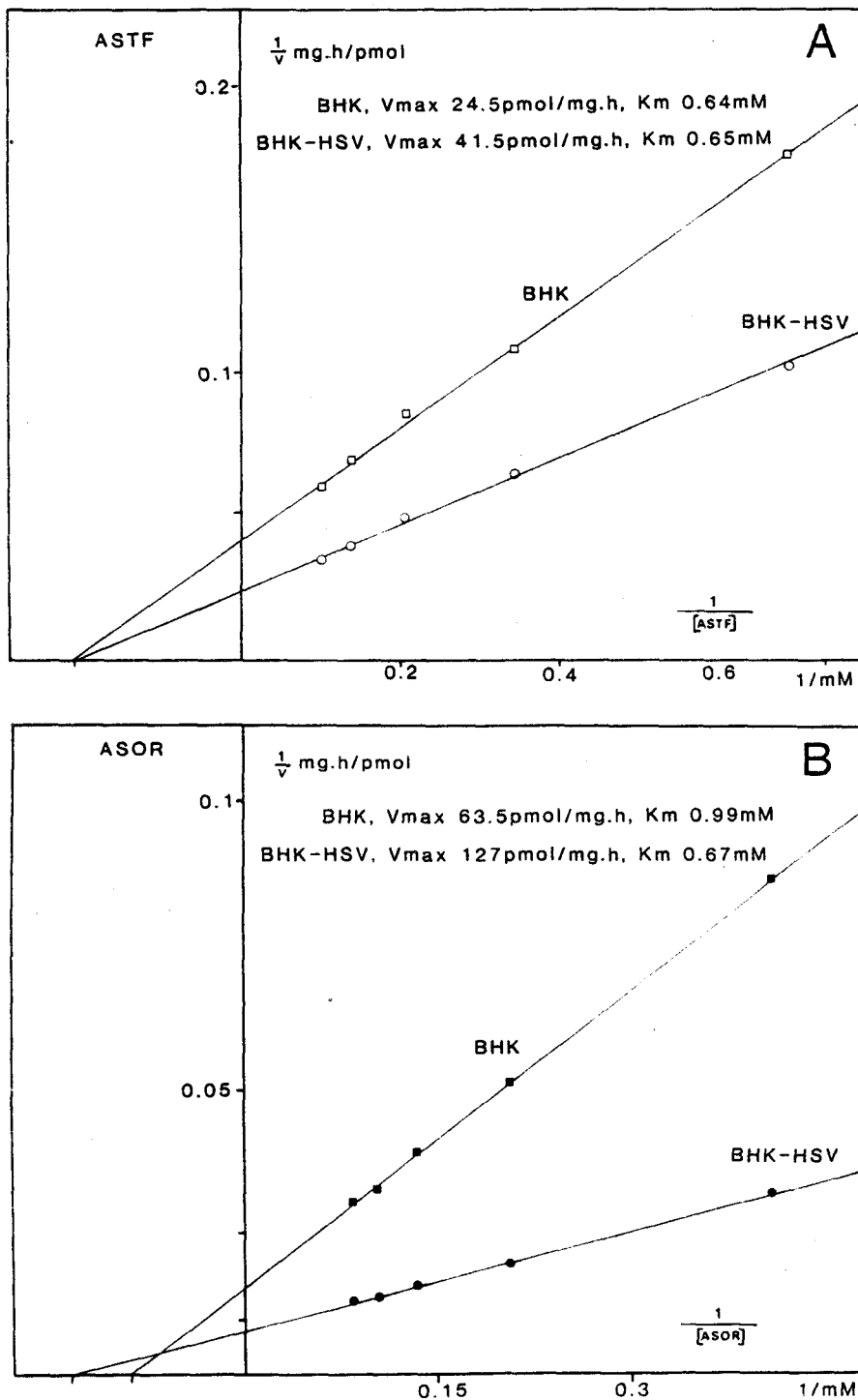


Fig.4. Effect of asialoglycopeptidic acceptors concentration on sialyltransferase activity.

Various concentrations of acceptors were added to reaction mixtures. Incubations were performed in cacodylate buffer pH 6.5 at 37°C for 2 h. We obtained an estimation of the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  by analysis of double-reciprocal  $V$  vs  $S$  plots.

A: effect of ASSTF concentration on BHK21/C13 cell homogenate (□-□-□) and BHK21/C13-HSV cell homogenate (○-○-○).

B: effect of ASOR concentration on BHK21/C13 cell homogenate (■-■-■) and BHK21/C13-HSV cell homogenate (●-●-●).

relative acceptor activity  $V_{max}/K_m$ . As showed in Table 2, relative acceptor activity is equal to 64.1 pmol/mg protein.h.mM for BHK21/C13 and 189.6 pmol/mg protein.h.mM for BHK21/C13-HSv. These results confirm the finding that, in transformed BHK cell homogenates, the incorporation of [ $^{14}C$ ]-Neu5Ac is strongly increased in kinetic experiments when ASOR was used as acceptor.

c. Determination of the linkage of Neu5Ac in glycopeptidic acceptors.

To determine the linkage of Neu5Ac, we incubated [ $^3H$ ]-ASOR with non-radioactive CMP-Neu5Ac. Sialylated glycopeptides were purified as described above. After methanolysis and hydrolysis, the O-methyl- [ $^3H$ ]-galactose derivatives were separated by thin-layer chromatography according to [29]. O-methylgalactose derivatives used as markers were co-chromatographed with radioactive products, eluted and analysed by gas-liquid chromatography to precisely identified the radioactive peaks. Fig.5 shows the thin-layer chromatography profiles we obtained and which allow us to characterize the presence of 2,3,4,6-tetra-O-methylgalactose and of 2,4,6-tri-O-methylgalactose showing that, as above indicated, when lactose was used as acceptor, Neu5Ac was transferred only in  $\alpha$ -2,3-linkage in both cell homogenates.

DISCUSSION.

Ion-exchange HPLC of BHK21/C13-HSv fibronectin glycans shows a significant increase of sialylation of these structures. Analysis of total glycans indicates that the sialylation rate shifted from 0.89 in

Table 2. Comparison of the relative acceptor activity  $V_{max}/K_m$  of ASSTF and ASOR for BHK21/C13 and BHK21/C13-HSv cell homogenates.

Values of apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  were obtained by analysis of double-reciprocal V vs S plots showed in Fig.4.

Acceptor	Cell homogenate	Apparent $K_m$ (mM)	$V_{max}$ (pmol/mg.h)	Relative acceptor activity ( $V_{max}/K_m$ ) (pmol/mg.h.mM)
ASSTF	BHK21/C13	0.64	24.5	38.3
	BHK21/C13-HSv	0.65	41.5	63.9
ASOR	BHK21/C13	0.99	63.5	64.1
	BHK21/C13-HSv	0.67	127	189.6



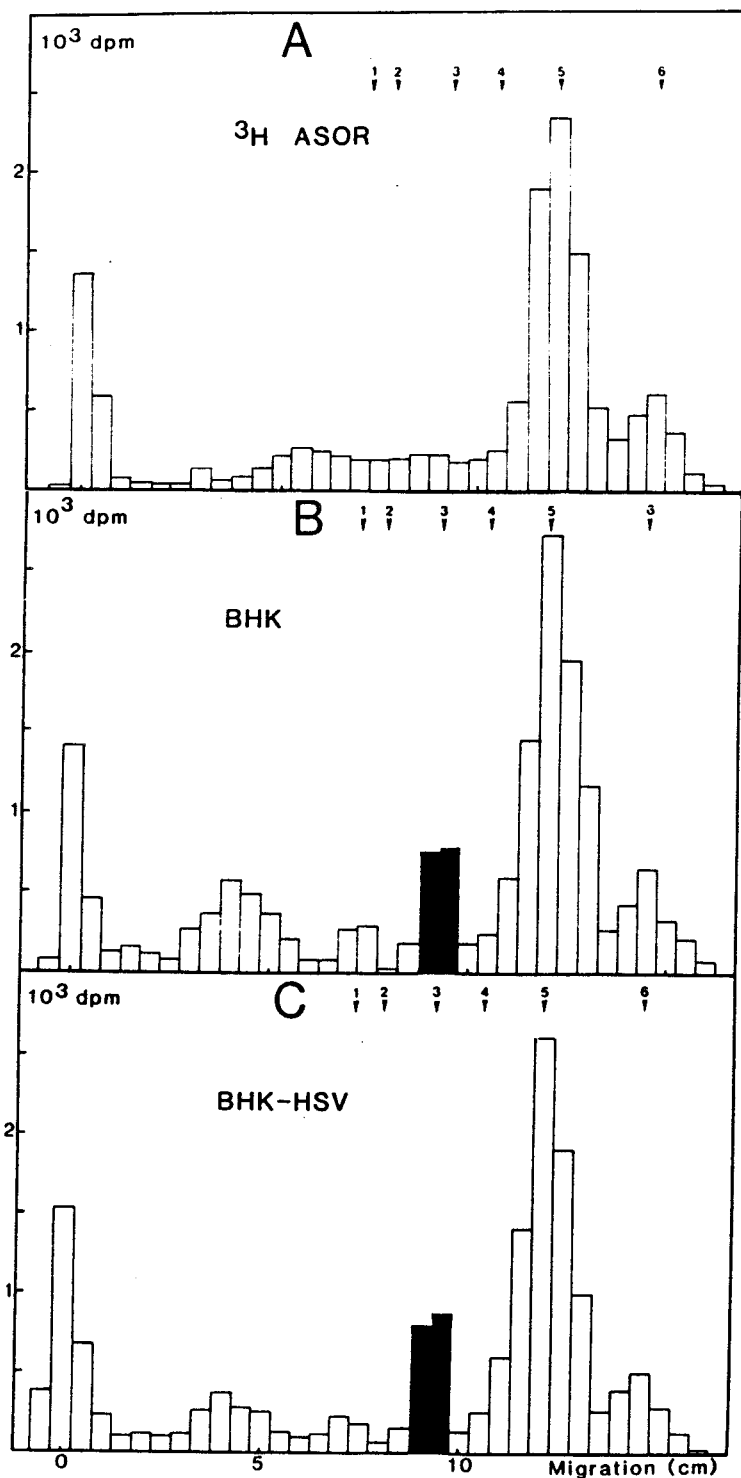


Fig.5. Separation by thin-layer chromatography of O-methyl- [ $^3\text{H}$ ]-galactose derivatives from [ $^3\text{H}$ ]-ASOR (A) and sialylated [ $^3\text{H}$ ]-ASOR with BHK21/C13 (B) or BHK21/C13-HSV (C) cell homogenates.

O-methyl- [ $^3\text{H}$ ]-galactose derivatives were separated using the following solvent mixture: acetone/ 4.5 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (500 : 9, by volume). Arrows indicate the position of non-radioactive standards: 1 and 3: 2,4,6-tri-O-methylgalactose; 2: 2,3,4-tri-O-methylgalactose; 4: 2,3,6-tri-O-methylgalactose; 5 and 6: 2,3,4,6-tetra-O-methylgalactose. Black strips indicated the migration of 2,4,6-tri-O-methyl- [ $^3\text{H}$ ]-galactose.

normal to 1.78 in transformed cells Fn. First, we consider that the enrichment in sialic acid was due to the high proportion of tri- and tetraantennary glycans and, consequently, to the enhancement of the number of terminal galactose residues accessible to sialyltransferase.

Analysis of glycans sialylation after fractionation by ConA affinity chromatography shows that both glycans fractions present a higher sialylation rate in transformed cell Fn as compared to control. In the biantennary fraction, the proportion of non-sialylated, mono- and disialylated glycans was completely reversed. This observation indicates a misregulation of N-linked glycan sialylation in BHK21/C13-HSv. Moreover, in the tri- and tetraantennary fractions, the sialylation rate increases significantly more than in biantennary fraction and we could see, in that result, the reflect of a modification of sialyltransferase activity for high-branched glycans. To confirm this hypothesis, we have compared sialyltransferase activities using ASSTF and ASOR to determine the effect of the antennarisation rate on the activity of the enzyme.

A major difficulty in assaying the levels of glycosyltransferases in cell extracts is the multiplicity of enzymes present in the homogenates. In particular, the homogenisation of cells liberates lysosomal enzymes like neuraminidase which can degradate new-sialylated products occurring in the incubation mixture, or like  $\beta$ -galactosidase which modified glycopeptidic acceptors during the assay and so decreasing the sialylation.

Transfer of sialic acid can occur in different linkages, especially  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6. Here, we only detected the transfer of Neu5Ac in  $\alpha$ -2,3-linkage in both cell lines. This finding is confirmed by the structure of total cellular glycans of BHK [32] in which sialic acid is present only in  $\alpha$ -2,3-linkage. These results indicate that  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase is absent or weakly expressed in BHK cells. Moreover, the

absence of  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase activity in the cell homogenates allows us to measure the enzymatic parameters of  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase.

Results obtained indicate that a misregulation of sialyltransferase activity of transformed BHK appeared at two different levels. First, we can observe a general increase of sialyltransferase activity whatever acceptors we used. Secondly, we characterize a decrease of apparent  $K_m$  for ASOR in transformed cell homogenates which enhanced its relative acceptor activity.

Several mechanisms may be involved in the regulation of sialyltransferase. Modifications of activity may occur by changes in the rate of *de novo* synthesis of the enzyme, changes in the intracellular concentration of co-factors required for enzyme activity, changes in soluble or membrane effectors - inhibitors or activators -, changes in concentration and transport of CMP-Neu5Ac or changes in glycosidases or CMP-Neu5Ac hydrolase activities in transformed cells [33]. In addition, sialyltransferase activity seems to be influenced by the lipid composition of the Golgi membranes [34-35].

Further studies are necessary to provide more informations about the regulation of sialyltransferases in transformed cells in relation to high branched glycans structure. Perhaps, an understanding of regulation could clarify the functional significance of high sialylation in transformed cells in order to elucidate the role of glycosylation of cancerous cell glycoproteins in metastasis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la

Technologie, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Associée n°217: Relations structure fonction des constituants membranaires, Director: Pr J. MONTREUIL), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, by the Ministère de l'Education Nationale and by the Fondation pour la Recherche Médicale. The authors wish to thank Mme M. Coniez for her expert assistance in the cell culture. They are indebted to Pr. A. Verbert and Dr R. Cacan for many helpful discussions.

REFERENCES.

1. Debray, H., Pierce-Cretel, A., Spik, G. and Montreuil, J. (1983) in **Lectins-Biology, Biochemistry, Chemical Biochemistry** (Bøg-Hansen, T.C. and Spengler, G.A., eds.) pp. 335-350, De Gruyter, Berlin.
2. Montreuil, J., Debray, H., Debeire, P. and Delannoy, P. (1983) in **Structural Carbohydrates in the Liver** (Popper, M., Reutter, W., Köttgen, E. and Gudat, F., eds.) pp. 239-258, M.T.P. Press, England.
3. Debray, H., Delannoy, P., Debeire, P. and Montreuil, J. (1983) in **Proc. VIIth International Symposium on Glycoconjugates, Lund** (Chester, M.A., Heinegard, D., Lundblat, A. and Svensson, S., eds.) pp. 172, Rahms, Sweden.
4. Hynes, R.O. and Yamada, K.M. (1982) **J. Cell Biol.** **95**, 369-377.
5. Yamada, K.M., Akiyama, S.K., Hasegawa, T., Hasegawa, E., Humphries, M.J., Kennedy, D.W., Nagata, K., Urushihara, H., Olden, K. and Chen, W.T. (1985) **J. Cell. Biochem.** **28**, 79-97.
6. Wagner, D.D., Ivatt, R., Destree, A.T. and Hynes, R.O. (1981) **J. Biol. Chem.** **256**, 11708-11715.
7. Murayama, K., Nichols, E.J., Levery, S.B., Carter, W.G. and Hakomori, S.I. (1984) **Glycoconjugate J.** **1**, 155-169.

8. Delannoy, P., Debray, H. and Montreuil, J. (1985) **C.R. Acad. Sci.** **301**, 767-772.
9. Jeanloz, R.W. and Codington, J.F. (1976) in **Biological Roles of Sialic Acid** (Rosenberg, A. and Schengrund, C.L., eds.) pp. 201-237, Plenum Press, New York.
10. Reutter, W., Eckart, K., Bauer, C. and Gerok, W. (1982) in **Sialic Acids** (Schauer, R., ed.) pp. 263-305, Springer-Verlag New York Inc., New York.
11. Silver, H.K.B., Karim, K.A., Archibald, E.L. and Salinas, F.A. (1979) **Cancer Res.** **39**, 5036-5042.
12. Weiser, M.M., Klohs, W.D., Podolsky, D.K. and Wilson, J.R. (1982) in **The Glycoconjugates, Vol IV** (Horowitz, M.I., ed.) pp. 301-333, Acad. Press, New York.
13. Yogeewaran, G. and Salk, P.L. (1981) **Science** **212**, 1509-1516.
14. Haverkamp, J., Beau, J.M. and Schauer, R. (1979) **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.** **360**, 159-166.
15. Mc Pherson, I. and Stoker, M. (1962) **Virology** **16**, 147-151.
16. Engvall, E. and Ruoslahti, E. (1977) **Int. J. Cancer** **20**, 1-5.
17. Laemmly, U.K. (1970) **Nature** **227**, 680-685.

18. Muramatsu, T., Atkinson, P.M., Nathenson, S.G. and Cerrarini, C. (1973) **J. Mol. Biol.** **80**, 781-799.
19. Bayard, B. and Montreuil, J. (1974) in **Actes du Colloque International n°221 du CNRS sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq** (Montreuil, J., ed.) pp. 209-218, CNRS, Paris.
20. Baenziger, J.U. and Natowicz, M. (1981) **Anal. Biochem.** **112**, 357-361.
21. Bradford, M. (1976) **Anal. biochem.** **72**, 248-254.
22. Schmid, K., Mc Nair, M.B. and Burgi, A.F. (1978) **J. Biol. Chem.** **253**, 853-864.
23. Zanetta, J.P. and Gombos, G. (1974) **FEBS-Lett.** **47**, 276-278.
24. Zanetta, J.P., Brenmenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) **J. Chromatogr.** **69**, 291-304.
25. Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975) **FEBS-Lett.** **50**, 296-301.
26. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J.F.G., Binette, J.P. and Schmid, K. (1978) **Biochemistry** **17**, 5206-5214.
27. Morell, A.G., Van den Hamer, C.J.A., Scheinberg, I.M. and Ashwell, G. (1966) **J. Biol. Chem.** **241**, 3745-3749.

28. Meindl, P. and Tuppy, H. (1974) **Virology** 58, 457-463.
29. Van den Eijnden, D.M., Stoffin, P., Stoffin, A. and Schiphorst, W.E.C.M. (1977) **Eur. J. Biochem.** 81, 1-7.
30. Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) **Carbohydr. Res.** 80, 336-339.
31. Hoflack, B., Cacan, R., Montreuil, J. and Verbert, A. (1979) **Biochim. Biophys. Acta** 568, 348-356.
32. Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. and Kobata, A. (1984) **J. Biol. Chem.** 259, 10834-10840.
33. Van Dijk, W., Lasthuis, A.M., Trippelwitz, L.A.W. and Muilerman, H.G. (1983) **Biochem J.** 214, 1003-1006.
34. Carruthers, A., Melchior, D.L. (1986) **TIBS** 11, 331-335.
35. Westcott, K.R., Wolf, C.C. and Hill, R.L. (1985) **J. Biol. Chem.** 260, 13109-13115.



### III. DISCUSSION.

Depuis l'hypothèse émise par Warren et al. en 1972 (507), peu de travaux ont porté sur l'étude des activités sialyltransférasiques des cellules BHK et ceci peut-être parce que l'activité est faible et relativement peu stable. Stojanovic et al. (461) ont détecté dans des homogénats de BHK une discrète activité sialyltransférasique en utilisant l'asialomucine de glande sous-maxillaire de Boeuf comme accepteur. Par contre, ils n'observèrent aucune activité de transfert sur le lactose ou sur la N-acétyllactosamine. Utilisant comme accepteur l'asialo-fétuine, Visher et Hugues (499) mirent en évidence une activité sialyltransférasique dans ces cellules, bien que celle-ci soit relativement faible. La méthode d'homogénéisation des cellules choisie par ces auteurs, utilisant une concentration de 2,5 % en Triton X-100 et quatre cycles de congélation-décongélation, pourrait expliquer les faibles activités observées du fait d'une inactivation de l'enzyme.

Notre étude a permis de montrer que les homogénats cellulaires de BHK21/C13 normales et transformées catalysaient l'incorporation de l'acide N-acétylneuraminique sur les différents accepteurs utilisés avec un pH optimum d'action de 6,5. En outre, l'acide N-acétylneuraminique est uniquement lié à son accepteur par une liaison  $\alpha$ -2,3. Par contre, il apparaît une augmentation importante de l'activité enzymatique dans les homogénats de cellules transformées. Cependant, le résultat le plus significatif concerne la diminution du Km apparent vis-à-vis des glycopeptides tri- et tétraantennés traduisant une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour ces structures dans les cellules transformées

Ces résultats font apparaître que l'hypersialylation des glycoprotéines des cellules cancéreuses pourrait être due à la fois,

- à une augmentation de l'antennarisation des glycanes,
- à l'élévation de l'activité sialyltransférasique globale de ces cellules,

- et à une plus grande affinité de l' $\alpha$ -2,3-sialyltransférase vis-à-vis des glycopeptides tri- et tétraantennés.

Les raisons de cette augmentation de l'affinité de l'enzyme pour les structures branchées peuvent être multiples. Il est possible, comme nous l'avons envisagé dans la discussion du mémoire que la perturbation affecte les systèmes de régulation de l'enzyme. On peut également envisager d'autres hypothèses comme, par exemple, un changement de conformation du site de fixation de la sialyltransférase conduisant à une modification de sa spécificité de substrat. Dans tous les cas, avant de pouvoir confirmer l'une de ces hypothèses, il est nécessaire de mieux connaître la régulation des glycosyltransférases membranaires des cellules normales.

. . .

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA GLYCOSYLATION SUR L'AFFINITE  
DE LA FIBRONECTINE POUR LE COLLAGENE.

## I. INTRODUCTION.

Les résultats obtenus au cours de l'étude de la partie glycanique de la fibronectine sécrétée par les cellules BHK21/C13 transformées, confortés par ceux de Wagner et al. (502) et de Murayama et al. (336), nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une modification des propriétés de la fibronectine sécrétée par les cellules cancéreuses. En effet, l'enrichissement en glycannes tri- et tétraantennés fortement sialylés, couvrant des superficies importantes de la protéine (319,320), peut conduire à une diminution de l'affinité de la fibronectine vis-à-vis des constituants de la matrice extracellulaire par masquage des sites de fixation. Cette troisième partie rassemble les travaux que nous avons effectués afin de vérifier cette hypothèse.

### A. Choix du modèle expérimental.

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler sur la fibronectine sécrétée par les cellules d'hépatocarcinome HepG2 et ceci pour plusieurs raisons:

1 - Il s'agit dans ce cas d'un modèle de cellules cancéreuses humaines que nous avons préféré aux cellules de rein de Hamster transformées par le virus HSV.

2 - La quantité de fibronectine produite par ces cellules est sensiblement plus importante que pour les cellules BHK21/C13-HSV.

3 - La fibronectine plasmatique, comme la majorité des protéines sériques, est produite par les hépatocytes (21,467). Il nous a donc été possible de comparer directement la fibronectine isolée du plasma humain et la fibronectine sécrétée par un hépatocyte cancéreux.

4 - Etant en possession d'un immunosérum monospécifique anti-fibronectine plasmatique humaine, nous avons pu effectuer une partie de cette étude en utilisant des méthodes immuno-chimiques.

## B. Le type cellulaire.

La lignée cellulaire humaine HepG2 a été établie en culture par Aden et al. (4) à partir d'une biopsie de la tumeur hépatique d'un enfant de 15 ans atteint d'un hépatocarcinome. Entre autres propriétés, ces cellules synthétisent un nombre important de protéines sériques qu'elles sécrètent dans le milieu de culture (257). Elles expriment également à leur surface le récepteur hépatocytaire à galactose. Par contre, elles ne synthétisent pas l'antigène de surface du virus de l'hépatite B - HB<sub>s</sub>Ag - (4) responsable présumé de la majorité des hépatocarcinomes. Enfin, ces cellules ont les caractères morphologiques des cellules parenchymateuses du foie mais possèdent un patrimoine génétique modifié.

## C. Rôle des glycanes dans les activités biologiques de la fibronectine.

L'influence de la partie glycanique de la fibronectine sur ses propriétés de fixation n'a pas encore été totalement clarifiée. En effet, les résultats publiés à ce sujet conduisent, dans une certaine mesure, à des conclusions différentes.

Selon Olden et al. (352), la partie glycanique n'est pas nécessaire aux différentes activités biologiques de cette glycoprotéine. Ayant purifié la fibronectine sécrétée par des fibroblastes d'embryon de Poulet cultivés en présence de tunicamycine (antibiotique bloquant la glycosylation des N-glycosylprotéines), ces auteurs ont montré que la fibronectine non-glycosylée avait la même capacité d'induire l'adhésion de cellules fibroblastiques au collagène, leur étalement et leur alignement en arrangements parallèles que la fibronectine glycosylée témoin. Cependant, l'absence de glycanes rendait la protéine deux fois plus sensible à l'attaque protéolytique. Bernard et al. (45) ont poursuivi cette étude en montrant que la partie glycanique semblait jouer un rôle dans la protection d'un domaine particulier de la molécule vis-à-vis des protéinases. Très récemment, Jones et al. (234) ont effectué une étude similaire sur la fibronectine sécrétée par des fibroblastes de peau humains. Contrairement à ceux de Olden et al., les résultats présentés semblent indiquer que l'absence de glycanes augmente de façon

significative l'affinité de la protéine pour la gélatine et favorise l'étalement des cellules. Par contre, la fixation à l'héparine apparaît insensible à la glycosylation. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Zhu et Laine (545) qui ont montré que les glycanes poly-N-acétyllactosaminiques de la fibronectine placentaire humaine diminuaient l'affinité de la molécule pour le collagène dénaturé.

L'ensemble de ces travaux semble indiquer que la partie glycanique de la fibronectine peut modifier certaines propriétés de la molécule. En particulier, l'affinité du domaine de fixation au collagène semble être modulée par la nature de sa copule glucidique.

De ce fait, dans notre étude, nous nous sommes attaché à mesurer l'influence de la glycosylation sur l'affinité des fibronectines plasmatique et purifiée du milieu de culture des cellules HepG2 et de leurs domaines spécifiques vis-à-vis du collagène.

## II. MATERIELS ET METHODES.

### A. Matériels.

Les produits radioactifs: D-[2-<sup>3</sup>H]-mannose (20 Ci/mmol.) et IMS 30 [<sup>125</sup>I] proviennent de la firme Amersham (Amersham, Royaume Uni). Les supports de chromatographie: ConA-Sepharose 4B, gélatine-Sepharose 4B, héparine-Sepharose 4B, Sepharose 4B et Sephadex G10 proviennent de Pharmacia (Uppsala, Suède), gélatine-Ultrogel, Ultrogel Aca 44, DEAE-Trisacryl M et Bio-Gel P2 de la firme IBF (Villeneuve la Garenne, France). L' $\alpha$ -chymotrypsine type II (48 unités/mg), le CAPS et la 1,10-phénanthroline viennent de Sigma Chem. Comp. (St Louis, USA), le PMSF de Eastman Kodak Co. (Rochester, USA), l'Iodo-Gen (1,3,4,6-tétrachloro-3 $\alpha$ -6 $\alpha$ -diphénylglycoluryl) de Pierce Chem. Comp. (Rockford, USA), la N-Glycanase (260 unités/ml) de Genzyme Corp. (Boston, USA), les membranes de nitrocellulose de la Société Schleicher & Schüll (Dassel, RFA) et les IgG de Chèvre anti-Ig de Lapin de Cappel Lab. (Cochranville, USA).

## B. Purification de la fibronectine plasmatique.

Nous avons purifié la fibronectine plasmatique humaine à partir de cryoprécipités humains lyophilisés (aimablement fournis par le Centre Régional de Transfusion Sanguine) par chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Sepharose 4B selon la méthode de Engvall et Ruoslahti (127). Le cryoprécipité est repris par un volume minimal de PBS additionné d'EDTA 5 mM et de PMSF 1 mM. La colonne de gélatine-Sepharose (volume total: 500 ml) est précédée d'une colonne de Sepharose 4B du même volume afin d'éliminer les protéines se fixant de façon non spécifique sur la matrice d'Agarose. Les deux colonnes sont équilibrées dans le même tampon. Après élimination des protéines non fixées, la colonne de gélatine-Sepharose est tout d'abord éluée par une solution de NaCl 4 M, urée 1 M dans le PBS. La fibronectine est ensuite éluée par une solution d'urée 4 M dans le PBS. Le fractionnement est effectué à 4°C et suivi par mesure de la densité optique à 280 nm. La pureté des différentes préparations est contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. La fibronectine purifiée est conservée en solution concentrée ( $\approx$  1 mg/ml) dans l'urée 4 M à -20°C.

## C. Préparation d'un immunosérum monospécifique anti-pFn et couplage des anticorps sur Sepharose 4B.

### 1. Préparation de l'immunosérum.

Un immunosérum anti-pFn a été préparé par injection intramusculaire chez le Lapin (espèce hybride de Nouvelle Zélande) de 1 ml de fibronectine plasmatique humaine purifiée (solution à 1 mg/ml) en présence d'adjuvant de Freund (1 ml). Les injections ont été répétées 3 fois à 2 semaines d'intervalle. Le sang, prélevé à l'oreille, est centrifugé après une nuit à 4°C. L'immunosérum est purifiée par injection sur une colonne de Sepharose 4B (25 ml, équilibrée dans le PBS) sur laquelle est fixé l'ensemble des protéines du plasma humain sauf la fibronectine, ce qui permet d'éliminer d'éventuels anticorps contaminants. L'antisérum est conservé par fractions aliquotes à -20°C.

## 2. Purification des anticorps et couplage sur Sepharose 4B.

La fraction IgG de l'immunsérum a été purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Trisacryl M selon la méthode décrite par Corthier et al. (100). Après dialyse contre un tampon bicarbonate 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8,5 les IgG sont couplées sur Sepharose 4B activé par la méthode au bromure de cyanogène (28).

## D. Culture cellulaire et purification de la fibronectine des milieux de culture des cellules HepG2.

### 1. Culture cellulaire.

Les cellules d'hépatocarcinome humains HepG2 sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco minimum Eagle's medium) complété par 10 % (v/v) de sérum de veau foetal, 0,2 % (p/v) de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM d' Hépés et enrichi en acides aminés (4). Ce milieu contient également 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. La culture s'effectue dans une étuve humide stabilisée à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37°C.

### 2. Purification de la fibronectine sécrétée par les cellules HepG2.

Le milieu de culture des cellules HepG2, après centrifugation à 2000 g pendant 10 mn dans le but d'éliminer les cellules en suspension, est concentré environ 10 fois par ultrafiltration sur membrane PM 10. 20 ml de ce milieu concentré - également utilisé pour les analyses par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle - sont injectés sur une colonne d'anticorps anti-pFn fixés sur Sepharose 4B (volume total: 5 ml) équilibrée dans un tampon PBS, 1 mM PMSF. Après lavage par le tampon, la colonne est rincée par une solution de NaCl 1 M dans le PBS, 1 mM PMSF. La fibronectine est ensuite dissociée de son anticorps par un tampon CAPS 0,1 M de pH 11. Ce fractionnement, effectuée à 4°C, est suivi par enregistrement de la densité optique à 280 nm et par immuno-diffusion radiale. Les échantillons sont conservés dans le tampon CAPS à



-20°C. La purification est ensuite poursuivie par chromatographie d'affinité sur gélatine. La fibronectine, partiellement purifiée par immuno-adsorption et éluée par le tampon CAPS 0,1 M de pH 11 est injectée sur une colonne de gélatine-Ultrogel (10 ml), après avoir ajusté le pH à 7,4. Les protéines non fixées sont éliminées par rinçage par un tampon PBS, 1 mM PMSF. La fibronectine est ensuite éluée par une solution d'urée 4 M dans le PBS et conservée en solution à -20°C. La pureté de la préparation a été caractérisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et coloration par le nitrate d'argent.

#### E. Marquage métabolique et isolement des glycanes marqués.

Le marquage métabolique a été effectué par addition dans le milieu de culture de 100 µCi de [2-<sup>3</sup>H]-mannose (20 µCi/ml de milieu) au moment du repiquage. Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, le milieu de culture est récupéré, centrifugé et injecté sur une colonne de gélatine-Sepharose (5 ml), équilibrée dans un tampon PBS, PMSF 1 mM. La fibronectine marquée est éluée par une solution d'urée 4 M dans le PBS. La purification est suivie par mesure de la radioactivité et par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et fluorographie.

Les glycanes marqués ont été libérés de la partie peptidique par hydrolyse alcaline selon la méthode de Lee et Scocca (289). La fibronectine, en solution dans l'urée 4 M, est précipitée par l'acide trichloracétique à 5 % (p/v) à 4°C en présence de SAB à 1 mg/ml. Après centrifugation, le culot est remis en suspension dans 500 µl d'H<sub>2</sub>O, ajusté à pH 7, puis redissout par addition de 500 µl d'une solution de NaOH 2 M, BH<sub>4</sub>Na 2 M. L'ensemble est porté au bain marie à 100°C pendant 6 h à reflux. L'hydrolysate est ensuite neutralisé par addition de Dowex 50 x 8, concentré sous pression réduite et dessalé sur colonne de Bio-Gel P2 équilibrée dans H<sub>2</sub>O.

#### F. Radio-iodation.

Le marquage des protéines a été effectué par la méthode à l'Iodo-Gen telle que l'ont décrit Fraker et Speck (133). 1 mg de fibronectine plasmatique humaine et 0,6 mg de fibronectine de cellules HepG2 en

solution dans l'urée 4 M, 1,5 mg d'IgG de Chèvre anti-immunoglobulines de Lapin en solution dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,3, NaCl 0,15 M (30 mg/ml) ont été marqués par addition de 0,1 mCi de [<sup>125</sup>I] en présence de 100 µg d'Iodo-Gen, préalablement adsorbé sur les parois du tube. Après 15 mn d'incubation à 0°C sous légère agitation, la réaction est arrêtée par addition de NaI à une concentration finale de 0,25 M. L'iode libre est éliminé par gel filtration sur une colonne de 10 ml de Sephadex G 10 équilibrée dans le TBS, SAB 0,1 %.

## G. Purification du domaine de fixation au collagène.

### 1. Hydrolyse chymotrypsique de la fibronectine.

Afin d'isoler le domaine de fixation au collagène, la fibronectine a été soumise à une hydrolyse par l' $\alpha$ -chymotrypsine (545). Les conditions optimales d'hydrolyse ont été préalablement déterminées sur la pFn. La fibronectine est tout d'abord équilibrée dans le TBS par gel filtration sur Sephadex G10. 1 mg de pFn à 0,28 mg/ml dans le TBS (la concentration de la solution étant estimée par mesure de la densité optique à 280 nm :  $\epsilon = 1,28$  ml/mg.cm) est hydrolysé à 20°C avec un rapport enzyme/substrat de 1/100 (p/p). Une première série d'expériences nous a permis de déterminer le temps d'hydrolyse nécessaire pour obtenir le fragment de 44 kDa avec le meilleur rendement. Pour la préparation, le temps d'hydrolyse a été fixé à 4 h. La réaction est arrêtée en ajustant la solution à une concentration finale de 1 mM en PMSF.

### 2. Purification du domaine de fixation au collagène.

Cette purification est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps est effectuée une chromatographie d'affinité sur colonnes d'héparine-sepharose et de gélatine-Sepharose montées en série (colonnes de 10 ml), équilibrées dans le TBS, 1 mM en PMSF. Après lavage par le tampon, la colonne de gélatine-Sepharose est éluée par l'urée 6 M dans le TBS. L'addition d'une pré-colonne d'héparine-Sepharose permet de diminuer sensiblement la concentration du matériel partiellement hydrolysé. La fraction éluée de la colonne de gélatine-Sepharose est repurifiée, après concentration sur membrane d'ultrafiltration PM 10, par "gel filtration"

sur colonne d'Ultrogel AcA 44 (1 x 100 cm) équilibrée dans le TBS. L'ensemble de la purification est effectué à 4°C et suivie par enregistrement de la densité optique à 280 nm (ou par comptage de la radioactivité) et électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Le domaine purifié est conservé à -20°C en solution dans le TBS.

#### H. Déglycosylation.

Les fragments chymotrypsiques de la pFn et de la HepG2Fn marqués par  $^{125}\text{I}$  ont été déglycosylés par l'action de la N-Glycanase dans des conditions non dénaturantes. Tout d'abord, les fragments glycopeptidiques sont équilibrés dans un tampon Tris-HCl 0,22 M de pH 8,6 par "gel filtration" sur Sephadex G 10. Le mélange réactionnel contient dans un volume final de 90  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{l}$  de la solution de glycopeptides ( $18\text{-}35 \cdot 10^3$  cpm/10  $\mu\text{l}$ ), 9  $\mu\text{l}$  d'une solution de 1,10-phénanthroline 100 mM dans l'éthanol et 1  $\mu\text{l}$  de la solution d'enzyme. Ce mélange réactionnel est incubé 48 h à 37°C. L'action de la N-Glycanase a été suivie par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et autoradiographie.

#### I. Méthodes d'analyse.

##### 1. Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle.

Cette analyse a été réalisée selon Bøg Hansen et al. (54) et Nicollet et al. (341).

##### a - Première dimension.

La première dimension est réalisée sur une plaque de verre (10 x 10 cm) recouverte de 15 ml de gel d'agarose à 1% dans un tampon Tris-HCl 72 mM véronal sodé 24 mM lactate de calcium 0,4 mM pH 8,6 en présence de  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{CaCl}_2$  1 mM respectivement et de ConA à 2 mg/ml (117). 5  $\mu\text{l}$  de la solution à analyser (plasma humain standard contenant 310  $\mu\text{g}$  de pFn/ml ou solution de pFn purifiée à 300  $\mu\text{g}$ /ml, ainsi que le milieu de culture des cellules HepG2 concentré 10 fois) sont déposés dans des puits pratiqués à l'emporte-pièce. L'électrophorèse s'effectue durant 2,5 h à 10 V/cm dans un appareil réfrigéré.

b - Deuxième dimension.

Le gel d'agarose utilisé pour la deuxième dimension contient 10 mg/ml d' $\alpha$ -Me.Glc et l'antisérum monospécifique à 1 % (v/v). Pour l'analyse des milieux de culture des cellules HepG2, la concentration en antisérum a été diminuée à 0,1 % (v/v). La migration est réalisée à 4°C pendant 16 h à 2 V/cm.

c - Visualisation des arcs de précipitation.

Les immuno-électrophorégrammes de pFn sont colorés par l'Amidoschwartz. Les arcs de précipitation obtenus avec la fibronectine des cellules HepG2 ont été caractérisés par incubation du gel d'Agarose, préalablement lavé dans une solution de NaCl à 9 g/l et partiellement déshydraté dans 10 ml d'une solution à 0,1 % de [ $^{125}$ I]-IgG de Chèvre anti-Ig de Lapin dans le tampon d'électrophorèse. Après 2 heures d'incubation, le gel est lavé dans la solution de NaCl à 9 g/l, séché et placé en autoradiographie.

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, électrotransfert et méthodes de coloration.

a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide-SDS ont été réalisées selon la technique de Laemmli (280,281) dans un gradient de polyacrylamide de 5 à 25 % en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, à 40 mA en courant constant pendant 2,5 h. Les masses moléculaires ont été estimées par rapport à un mélange de protéines témoins contenant ferritine (220.000), phosphorylase B (94.000), sérumalbumine (67.000), catalase (60.000), ovalbumine (43.000), lactate déshydrogénase (36.000), anhydrase carbonique (30.000), inhibiteur tryptique (20.100) et  $\alpha$ -lactalbumine (14.400).

b - Méthodes de coloration.

Les protéines sont révélées soit par coloration directe du gel par le Bleu de Coomassie ou par le nitrate d'argent selon la méthode de

Morrissey (322), soit par immuno-localisation après transfert sur filtres de nitrocellulose (153). Dans ce cas, les protéines sont transférées sur nitrocellulose dans un tampon Tris-glycine 20 mM pH 8,4 méthanol 20 % (v/v) à 4°C pendant 16 heures, à 40 mA. Après saturation par une solution de lait en poudre à 5 % (p/v) dans le PBS, le filtre de nitrocellulose est incubé avec l'immunsérum anti-pFn dilué à 0,1 % (v/v) dans la solution de lait en poudre. Il est ensuite lavé 3 fois par 200 ml de PBS, puis par 200 ml de PBS/Twinn-20 à 0,05 % et incubé avec les [<sup>125</sup>I]-IgG de Chèvre diluées à 0,1 % (v/v) dans la solution de lait en poudre. Après plusieurs lavages dans les mêmes conditions que précédemment, le filtre de nitrocellulose est séché et mis en autoradiographie.

### 3. Chromatographies d'affinité.

#### a - Chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B.

Les glycanes obtenus par hydrolyse alcaline sont fractionnés sur ConA-Sepharose 4B (colonne de 10 ml) équilibrée dans un tampon acétate de sodium 5 mM pH 5,2 NaCl 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub> 1mM respectivement (115). Après injection, la colonne est rincée par 30 ml de tampon et éluée par l' $\alpha$ -Me.Glc: tout d'abord, par 30 ml d' $\alpha$ -Me.Glc 10 mM, puis par 30 ml d' $\alpha$ -Me.Glc 0,3 M en solution dans le même tampon.

#### b - Chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel.

La fibronectine plasmatique humaine, la fibronectine sécrétée par les cellules HepG2, ainsi que leur domaine de fixation au collagène, natif ou déglycosylé, ont été chromatographiés sur une colonne de gélatine-Ultrogel (volume total 10 ml) équilibrée dans le PBS, 1 mM PMSF et éluée par 100 ml d'un gradient d'urée de 0 à 4 M dans le cas de la glycoprotéine native et par 400 ml d'un gradient de 0 à 6 M dans le cas des fragments chymotrypsiques.

III. RESULTATS.

A. Rôle des glycanes de la fibronectine plasmatique humaine dans la fixation au collagène.

Le mémoire suivant, accepté pour publication au périodique FEBS Letters décrit les effets de la déglycosylation enzymatique sur l'affinité du domaine de fixation au collagène de la fibronectine plasmatique humaine. Ce domaine, purifié par hydrolyse chymotrypsique de la glycoprotéine, possède une masse moléculaire apparente de 44 kDa. Nous avons mesuré son affinité pour le collagène dénaturé par chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel et élution de la colonne par un gradient linéaire d'urée.

**DEGLYCOSYLATION OF CHYMOTRYPTIC COLLAGEN-BINDING FRAGMENT OF HUMAN PLASMA FIBRONECTIN DOES NOT MODIFY ITS AFFINITY TO DENATURATED COLLAGEN.**

Delannoy Philippe\* and Montreuil Jean.

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Associée au CNRS n° 217), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

SUMMARY

N-glycanase deglycosylation of purified 44 kDa chymotryptic collagen-binding domain from human plasma fibronectin does not significantly modify its behavior on gelatin affinity chromatography. This indicates that carbohydrates do not play any role in the binding affinity of fibronectin to collagen. The influence of changes in the glycosylation on biological functions of fibronectin is discussed.

Keywords : fibronectin, collagen, N-glycanase, glycosylation.

\*: To whom all correspondence should be addressed.

Abbreviations : BSA: bovine serum albumin; Fn: fibronectin; pFn: human plasma fibronectin; kDa: kilodalton; PMSF: phenyl methylsulphonyl fluoride; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TBS: 10 mM Tris/HCl / NaCl 0.154 M, pH 7.2 buffer.

## 1. INTRODUCTION.

Plasma fibronectin (pFn) is a high molecular weight adhesive glycoprotein constituted of two similar subunits joined at the carboxy terminal ends by disulfide bonds [1]. pFn has been implicated in numerous biological phenomena including cellular adhesion and migration, embryonic differentiation, chemotaxis, wound healing and hemostasis. These functions are associated to the presence in pFn molecule of different binding domains for a variety of macromolecules including cell membrane receptors [2], collagen [3], heparin and other glycosaminoglycans [4], fibrin [5] and actin [6].

The role of carbohydrate residues in these binding functions is not yet well understood. Results of Olden et al. [7], suggesting that the carbohydrate moiety of Fn of chicken embryo fibroblasts is not required for the mediation of a number of biological activities played by this glycoprotein, have been recently re-examined by Jones et al. [8]. These authors gave evidence that carbohydrates weaken the binding affinity of human cellular Fn to gelatin and to cellular receptor. In the present paper, we show that enzymatic deglycosylation of pFn collagen-binding domain does not affect its affinity for denaturated collagen.

## 2. MATERIALS AND METHODS.

### 2.1. Reagents.

N-Glycanase (peptide: N-glycosidase F, peptide-N4 [N-acetyl- $\beta$ -glucosaminyl] asparagine amidase; EC 3.5.1.52) (260 units/ml) was purchased from Genzyme Corp. (Boston, MA, USA).  $\alpha$ -chymotrypsin type II (EC 3.4.21.1) (48 units/mg) was from Sigma (St Louis, USA), IMS.30-<sup>125</sup>I] was from Amersham Lab. (Amersham, U.K.). Iodo-Gen (1,3,4,6-



tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycoluryl) was obtained from Pierce Chem. Comp. (Rockford, USA), gelatin-Ultrogel and Ultrogel AcA 44 from IBF (Villeneuve la Garenne, France) and heparin-Sepharose 6B from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

## 2.2. Purification of pFn and preparation of the chymotryptic collagen-binding domain.

pFn was prepared from citrated human plasma by gelatin-Ultrogel affinity chromatography as previously described [3] and eluted by 4 M urea. Prior to digestion, purified pFn was dialysed against TBS. Hydrolysis was performed with  $\alpha$ -chymotrypsin (pFn concentration : 0.8 mg/ml; enzyme/substrate ratio : 1/100, w/w) for 3 h at 20°C [9]. Chymotryptic hydrolysate was applied to heparin-Sepharose 6B and gelatin-Ultrogel columns in serial (both 3 ml bed volume) equilibrated in TBS. After washing, gelatin-Ultrogel column was eluted with 6 M urea.

## 2.3. Radioiodination.

Chymotryptic collagen-binding domain was radioiodinated using IMS.30 [<sup>125</sup>I] by the Iodo-Gen method according to Fraker and Speck [10]. [<sup>125</sup>I]-labelled collagen-binding domain was further purified by gel-permeation on Ultrogel AcA 44 column (1.6 x 100 cm) equilibrated in TBS supplemented with BSA (1 mg/ml).

## 2.4. Deglycosylation.

[<sup>125</sup>I]-labelled collagen-binding domain was deglycosylated with N-glycanase without previous denaturation. First, labelled glycopeptides were equilibrated in 0.22 M Tris/HCl pH 8.6 buffer by gel-permeation on a Sephadex G25 column (10 ml bed volume). Reaction mixture containing, in a final volume of 90  $\mu$ l, 80  $\mu$ l of the glycopeptide solution (18,000

cpm/10  $\mu$ l), 9  $\mu$ l of 100 mM 1,10-phenanthroline hydrate (in methanol solution) and 1  $\mu$ l of the enzyme solution, was incubated 48 h at 37°C. Action of N-glycanase was analyzed by SDS-PAGE (5-25 % gradient gel run under reducing conditions) and autoradiography [11].

### 2.5. Gelatin affinity chromatography.

Native or deglycosylated collagen-binding fragments were applied to a 10 ml gelatin-Ultrogel column and eluted with 400 ml linear gradient from 0 to 6 M urea in TBS, supplemented with 0.1 mM PMSF.

## 3. RESULTS.

### 3.1. N-Glycanase treatment.

Affinity chromatography on heparin-Sepharose and gelatin-Ultrogel columns, followed by gel-permeation on Ultrogel AcA 44 column led to the isolation of the 44 kDa collagen-binding domain from chymotryptic hydrolysate of purified pFn. Fig.1 shows a SDS-PAGE of affinity purified pFn and of its native and deglycosylated chymotryptic collagen-binding domains. Electrophoresis was run under reducing conditions and the absence of lower molecular size band indicated that there is no internal cleavage of the 44 kDa glycopeptides. After N-glycanase treatment, we observed a shift of the apparent molecular size of about 6 kDa. Given that the collagen-binding domain of pFn is substituted by three biantennary N-glycans [12] with an expected mass of 5800 Da, the shift can therefore be attributed to a total deglycosylation of the fragment.

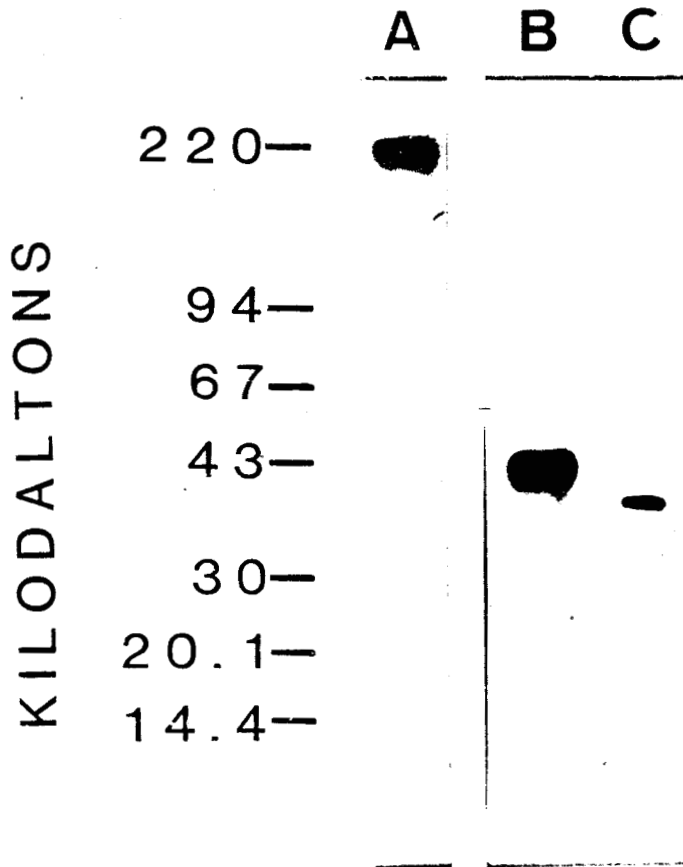


Fig.1. SDS-PAGE of purified pFn stained with Coomassie Blue (lane A) and of [ $^{125}$ I]-labelled native (B) and deglycosylated (C) collagen-binding fragments characterized by autoradiography. The left lane indicates the position of marker proteins for molecular weight estimation : ferritin (220,000); phosphorylase b (94,000); albumin (67,000); ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000); trypsin inhibitor (20,100);  $\alpha$ -lactalbumin (14,400).

### 3.2. Gelatin affinity chromatography.

Collagen-binding domains treated or not with N-glycanase, quantitatively bound to the gelatin-Ultrogel column and the elution profiles obtained with a linear gradient of 0-6 M urea are shown in Fig.2. The apex of the elution of native 44 kDa collagen-binding domain appeared at 2.95 M urea. We could notice that apparent affinity of the isolated domain is enhanced as compared to native pFn (data not shown). There is no significant difference in the profile obtained with deglycosylated fragment, eluted at the same concentration in urea. Experiments performed in duplicate after 2 or 6 days of incubation with the enzyme gave identical results.

### 4. DISCUSSION.

Most of the fibronectin carbohydrates are located on the gelatin-binding domain of the molecule and Bernard et al. [13] have clearly shown that they play an important role in the stabilization of this domain against proteolytic degradation. On the other hand, the role of carbohydrates in the binding function is not yet well established and contradictory results have been published [7-8]. Zhu and Laine [9] have recently shown that poly-lactosaminic glycosylation of human placental Fn weakens its affinity to gelatin. In this report, we show that removal of biantennary glycans by N-glycanase does not affect the binding capacity of the collagen-binding domain of pFn. From these results, it appears that the binding capacity of Fns to collagenous structures can be modulated by the nature of glycan. Several studies give evidence that Fns glycans can be modified under physiological [14,15] or pathological conditions as neoplastic transformation [16-19]. Knowing that, further work is needed to determine the effect of the enrichment in tri- and

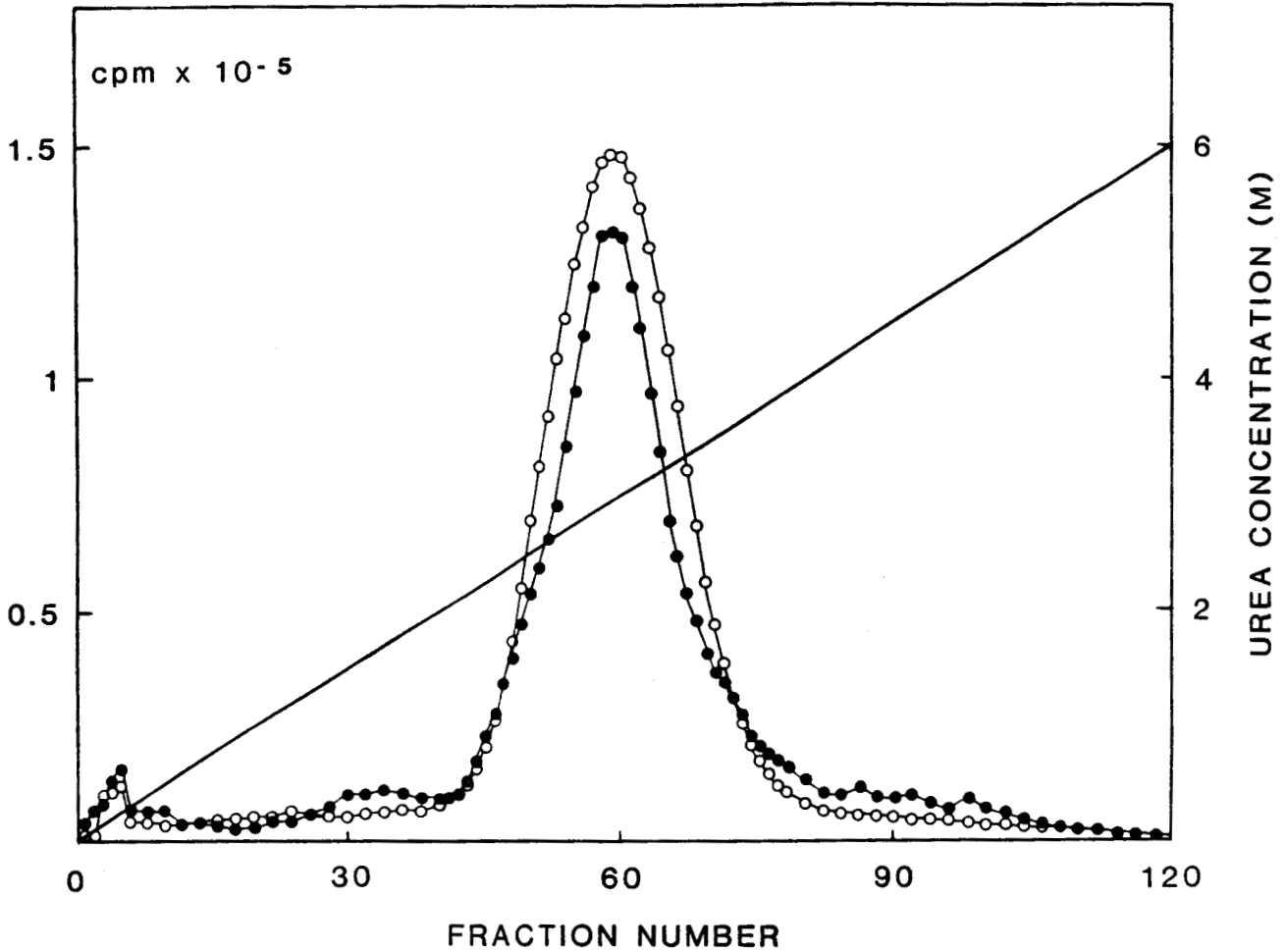


Fig.2. Elution profiles of chymotryptic collagen-binding fragment from gelatin-Ultrogel column. Both fragments, native (O—O—O) or deglycosylated (●—●—●) were eluted with 400 ml 0-6 M urea gradient. 3.35 ml fractions were collected. The apex of the elution of both fragments appeared at 2.95 M. (—), urea concentration.

tetraantennary glycans and of high sialylation on the binding capacity of Fns secreted by transformed cells.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Associée n° 217: Relations Structure-Fonctions des Constituants Membranaires), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, by the Ministère de l'Education Nationale and by the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- [1] Hynes, R.O. and Yamada, K.M. (1982) J. Cell Biol. 95, 369-377.
- [2] Pierschbacher, M.D., Hayman, E.G. and Ruoslahti, E. (1985) J. Cell. Biochem. 28, 115-126.
- [3] Engvall, E and Ruoslahti, E. (1977) Int. J. Cancer 20, 1-5.
- [4] Lark, M.W. and Culp, L.A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 6773-6782.
- [5] Steinberger, A. and Hörmann, H. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 367, 1003-1005.
- [6] Keski-Oja, J., Sen, A. and Todaro, G.J. (1980) J. Cell Biol. 85, 527-533.

- [7] Olden, K., Pratt, R.M. and Yamada, K.M. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3343-3347.
  
- [8] Jones, G.E., Arumugham, R.G. and Tanzer, M.L. (1986) J. Biol. Chem. 103, 1663-1670.
  
- [9] Zhu, B.C.R. and Laine, R.A. (1985) J. Cell Biol. 260, 4041-4045.
  
- [10] Fraker, P.J. and Speck, J.C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857.
  
- [11] Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
  
- [12] Hayashi, M. and Yamada, K.M. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3332-3340.
  
- [13] Bernard, B.A., Yamada, K.M. and Olden, K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8549-8554.
  
- [14] Zhu, B.C.R., Fisher, S.F., Pande, H., Calaycay, J., Shively, J.E. and Laine, R.A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3962-3970.
  
- [15] Krusius, T., Fukuda, M., Dell, A. and Ruoslahti, E. (1985) J. Biol. Chem. 260, 4110-4116.
  
- [16] Wagner, D.D., Ivatt, R., Destree, A.T. and Hynes, R.O. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11708-11715.

- [17] Delannoy, P., Debeire, P., Montreuil, J. and Debray, H. (1983) in:  
Proc. 7th Int. Symp. Glycoconjugates, Lund-Roneby; July 17-23  
(Chester, M.A., Heinegard, D., Lundblad, A. and Svensson, S. eds)  
pp. 173-174, Rahms, Sweden.
- [18] Murayama, K., Nichols, E.J., Levery, S.B., Carter, W.G. and  
Hakomori, S.I. (1984) Glycoconjugate J. 1, 155-169.
- [19] Delannoy, P., Debray, H. and Montreuil, J. (1985) C. R. Acad. Sci.  
301, 767-772.



B. Etude de la fibronectine sécrétée par les cellules HepG2.

1. Analyse par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle.

a - Etude préliminaire.

Avant d'entreprendre cette étude par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle, il nous fallait nous assurer, d'une part, que l'antisérum anti-pFn que nous avons préparé réagissait bien avec la fibronectine du milieu de culture des cellules HepG2 et, d'autre part, que la fibronectine du sérum de veau foetal ne donnait pas de réaction croisée avec notre anticorps.

Une analyse par immuno-diffusion bidimensionnelle présentée dans la figure 13 (p. 144) indique que notre antisérum ne donne pas d'arc de précipitation avec le sérum de Veau foetal (puits n°1), ni avec une solution à 1 mg/ml de fibronectine isolée de ce sérum (puits n°5). Par contre, il apparaît un arc de précipitation avec le milieu de culture des cellules HepG2 concentré 10 fois (puits n°3).

Ces deux conditions étant vérifiées, nous pouvions envisager d'étudier la HepG2Fn par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle. En outre, il nous devenait possible de doser la fibronectine dans le milieu de culture des HepG2 par immuno-diffusion radiale en utilisant comme gamme étalon une dilution d'un sérum standard contenant 0,31  $\mu\text{g}$  de pFn/ $\mu\text{l}$ . La concentration ainsi estimée varie de 2 à 4,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de milieu de culture selon les lots analysés, environ 100 fois moins que dans le sérum.

b - Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle.

Cette technique permet de mettre en évidence l'affinité d'une glycoprotéine donnée pour une lectine et ceci sans avoir à la purifier. Le résultat de cette analyse est présenté à la figure 14 (p. 145). Du

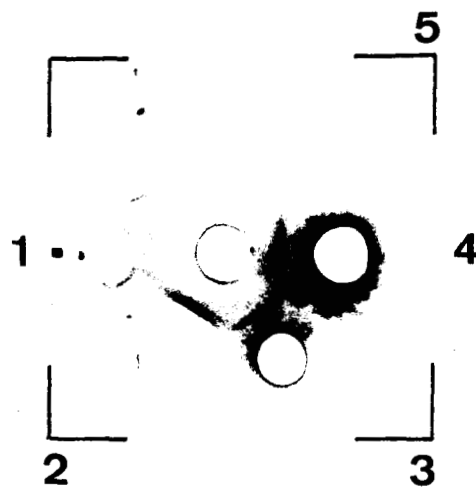
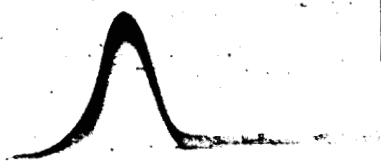


Fig. 13. Immuno-diffusion bidimensionnelle du milieu de culture des cellules HepG2 et du sérum de Veau foetal.

Cette immuno-diffusion a été réalisée en gel d'Agarose à 1 % dans un tampon véronal pH 8,6 pendant 48 h en chambre humide. 1  $\mu$ l d'anti-sérum anti-pFn a été déposé dans le puits central. Les puits périphériques contiennent 5  $\mu$ l de la solution d'antigène; 1: sérum de Veau foetal; 2: solution de pFn témoin à 0,8 mg/ml; 3: milieu de culture des cellules HepG2 concentré 10 fois; 4: sérum standard humain; 5: solution de fibronectine du sérum de Veau foetal à 1 mg/ml.

Les arcs de précipitation ont été colorés par l'Amidoschwartz.

A  
pFn



ConA -

B

HepG2Fn



ConA +

Fig. 14. Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle, en présence de ConA, de la pFn et de la HepG2Fn.

La migration en présence de ConA à 2 mg/ml dans la première dimension - ConA (+) - est comparé à celle obtenue en l'absence de lectine - ConA (-).

- A: 5  $\mu$ l de sérum standard humain (coloration par l'Amidoschwartz)
- B: 5  $\mu$ l de milieu de culture des cellules HepG2, concentré 10 fois (révélation par incubation du gel avec des [ $^{125}$ I]-IgG de Chèvre anti-Ig de Lapin et autoradiographie).

fait de la faible concentration en fibronectine du milieu de culture cellulaire, nous avons dû à la fois concentrer le milieu de culture et diminuer considérablement la concentration de l'antisérum dans la deuxième dimension. Dans ces conditions, la ligne de précipitation n'a pu être colorée par l'Amidoschwartz. La révélation a été réalisée par autoradiographie après incubation du gel d'agarose avec des [ $^{125}$ I]-IgG de Chèvre anti-immunoglobulines de Lapin.

La pFn contient plus de 80% de glycanes biantennés (544). De ce fait, elle possède une très grande affinité pour la ConA. Ceci se traduit par une migration fortement retardée dans la première dimension en présence de ConA à 2 mg/ml (Rf: rapport de migration en cm en présence de ConA/migration en absence de ConA = 0,20). La figure 14 (p. 145) nous montre que la HepG2Fn présente une affinité nettement plus faible pour la lectine ce qui se manifeste par une augmentation du Rf = 0,84. Différentes études effectuées précédemment sur la fibronectine de plasma cancéreux (297), la fibronectine du liquide amniotique (536), mais également sur d'autres glycoprotéines comme la sérotransferrine (117) ont montré la validité de cette technique. Dans tous les cas, les résultats ont été confirmés par les études structurales qui ont suivies. La ConA se lie aux glycanes de type N-acétyllactosaminique biantenné. La diminution des interactions de la glycoprotéine avec la lectine traduit généralement une modification des structures glycaniques allant dans le sens d'un "alourdissement" des structures. Bien que prévisible, ce résultat restait à être confirmé avant de poursuivre notre étude.

## 2. Chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose des glycanes de la HepG2Fn.

Afin de vérifier les données obtenues par électrophorèse d'affinité bidimensionnelle, nous avons purifié la fibronectine des cellules HepG2 par chromatographie d'affinité sur gélatine-Sepharose. L'addition de [ $2\text{-}^3\text{H}$ ]-mannose dans le milieu de culture nous a permis de marquer métaboliquement les glycanes de la HepG2Fn. Ce marquage était nécessaire, d'une part, pour quantifier les fractions obtenues par chromatographie sur ConA-Sepharose et, d'autre part, pour distinguer la HepG2Fn de la fibronectine du sérum de veau foetal co-purifiée sur

gélatine-Sepharose. La fraction éluée par l'urée 4 M a été caractérisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et autoradiographie (Fig. 15; p. 148). Les glycanes libérés de cette fraction par hydrolyse alcaline ont été N-réacétylés et chromatographiés sur colonne de ConA-Sepharose. Le profil d'élution est présenté dans la figure 15 (p. 148). A titre de comparaison, nous avons représenté sur cette même figure le profil obtenu à partir des glycanes de la pFn libérés par hydrazinolyse et réduit par le  $B^3H_4K$ . Bien que la technique de marquage soit différente, les deux expériences sont toutefois comparables car, dans les deux cas, la radioactivité est indépendante du degré de branchement des structures N-acétyllactosaminiques. En outre, l'analyse par chromatographie sur papier des monosaccharides libérés par hydrolyse acide nous a permis de nous assurer que seul le mannose était radioactif. La seule réserve touche à la présence de structures oligomannosidiques dont la radioactivité spécifique est fonction, dans le cas d'un marquage par le  $[2-^3H]$ -mannose, du nombre de résidus de mannose constitutifs de la molécule. Or, ces structures ne représentent qu'une fraction tout à fait mineure ce qui n'entraîne pas de variations sensibles des pourcentages mesurés.

Cette chromatographie permet de séparer les glycanes de la fibronectine en deux fractions. Une première fraction non retenue, contenant les glycanes tri- et tétraantennés ainsi que les structures biantennées possédant un résidu de GlcNAc en position intercalaire. Une deuxième fraction, éluée par l' $\alpha$ -Me.Glc 10 mM, renferme les glycanes biantennés. En outre, la HepG2Fn renferme une fraction mineure éluée par l' $\alpha$ -Me.Glc 0,3 M, pouvant correspondre à des glycanes de type oligomannosidique. Cette fraction (< 4 % de la radioactivité totale) n'a pas été mise en évidence dans la pFn. Cependant, nous avons déjà rencontré une fraction similaire lors de l'analyse des glycanes de la fibronectine des cellules BHK21/C13.

Comme nous pouvions le prévoir, il apparaît clairement que la diminution d'affinité pour la ConA, mise en évidence par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle de la HepG2Fn, correspond bien à une augmentation de l'antennarisation des glycanes. Le rapport glycanes tri + tétraantennés / glycanes biantennés passe de 0,29 pour la pFn à 1,08 pour la HepG2Fn.

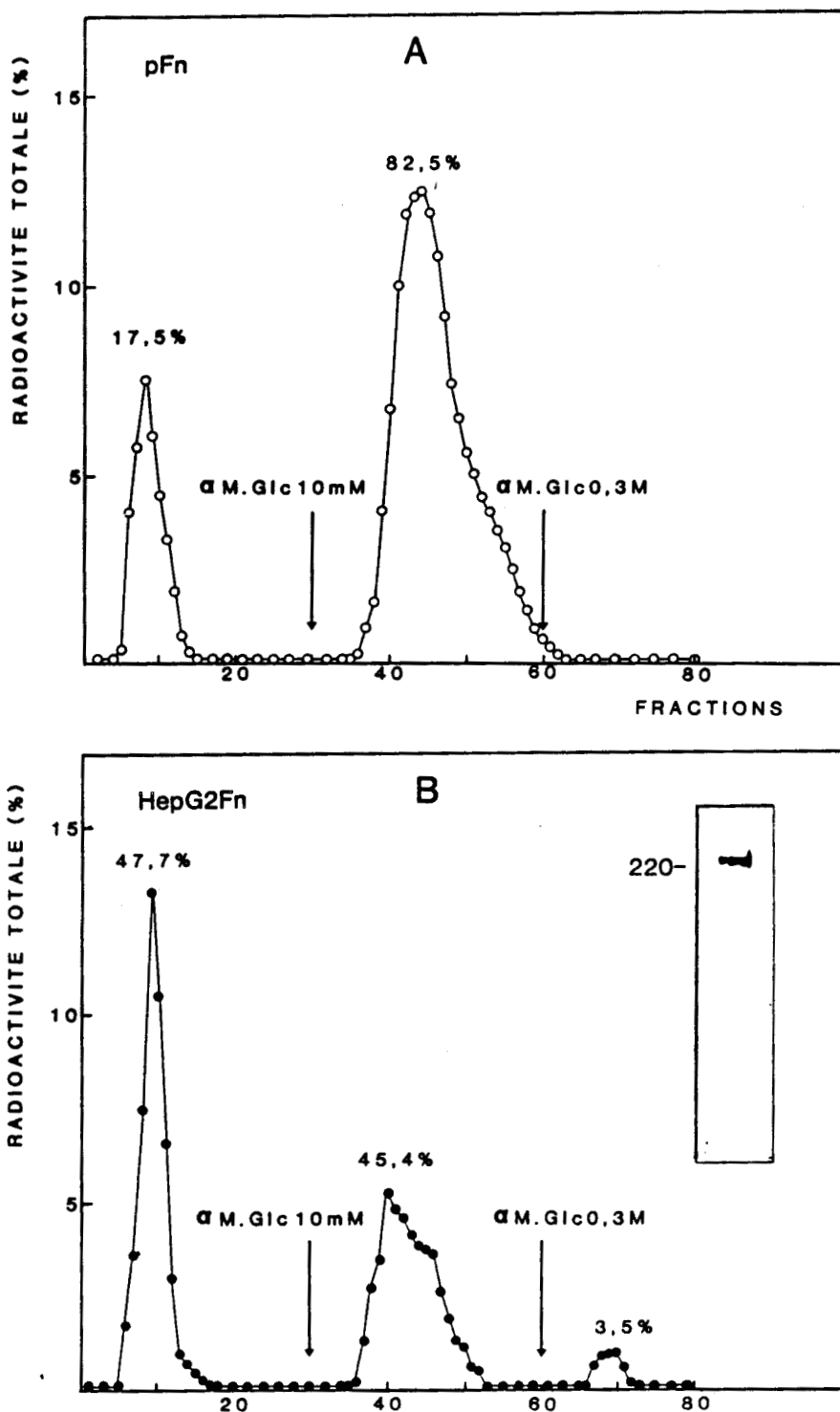


Fig. 15. Chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose des glycanes de la pFn et de la HepG2Fn.

Les glycanes de la pFn, libérés par hydrazinolyse et réduits par le  $B_3H_4K$  (A) et de la HepG2Fn marqués par le  $[2-^3H]$ -mannose (B) ont été fractionnés sur colonne de ConA-Sepharose (volume 10 ml) équilibrée dans un tampon acétate de sodium 5 mM de pH 5,2 selon le protocole décrit par Debray *et al.* (115). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale. Volume des fractions: 2,1 ml).

La photographie insérée dans la Fig. B présente l'autoradiographie de la HepG2Fn marquée par le  $[2-^3H]$ -mannose, après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (masse moléculaire de la ferritine: 220 kDa).

Il s'agit donc d'un nouvel exemple des changements profonds dont sont l'objet les structures glycaniques de la fibronectine des cellules cancéreuses. Ces différences de structures ont tout d'abord été mises en évidence au niveau de cellules fibroblastiques en culture viro-transformées (voir chapitre I; p. 70). Cette observation a été récemment étendue par Magallon et al. (297) à la fibronectine isolée du plasma de patients cancéreux. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'avait encore été réalisée sur la fibronectine de cellules provenant directement d'une tumeur maligne humaine.

### 3. Purification de la HepG2Fn.

A ce stade, ayant vérifié notre hypothèse de départ, à savoir l'enrichissement de la HepG2Fn en structures glycaniques tri- et tétraantennées, nous pouvions envisager sa purification afin de déterminer son affinité pour le collagène.

Le milieu de culture des cellules HepG2 contenant 10 % de sérum de Veau foetal, la purification de la HepG2Fn a été effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'IgG de Lapin anti-pFn couplées sur Sepharose 4B. Cette colonne nous a permis de fixer spécifiquement la HepG2Fn, la fibronectine du sérum de Veau ne se fixant pas sur les anticorps (nous avons vérifié ce dernier point en injectant 10 mg de fibronectine de sérum de Veau foetal sur la colonne d'anticorps).

Les conditions d'élution ont été également modifiées. Le complexe Ag-Ac a été généralement dissocié par une diminution du pH à 2,8. La fibronectine étant insoluble à pH acide, nous avons préféré éluer la colonne par un tampon CAPS-NaOH 0,1 M pH 11.

Cette première étape de purification a été suivie d'une chromatographie d'affinité sur gélatine-Sepharose. L'analyse des différentes fractions par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est présentée dans la figure 16 (p. 150). Cette électrophorègramme, colorée par le nitrate d'argent, nous montre que la plupart des contaminants présents dans la fraction éluee de la colonne d'anticorps à pH 11 (Ligne b) sont éliminés par cette étape sur gélatine-Sepharose. La pureté de la

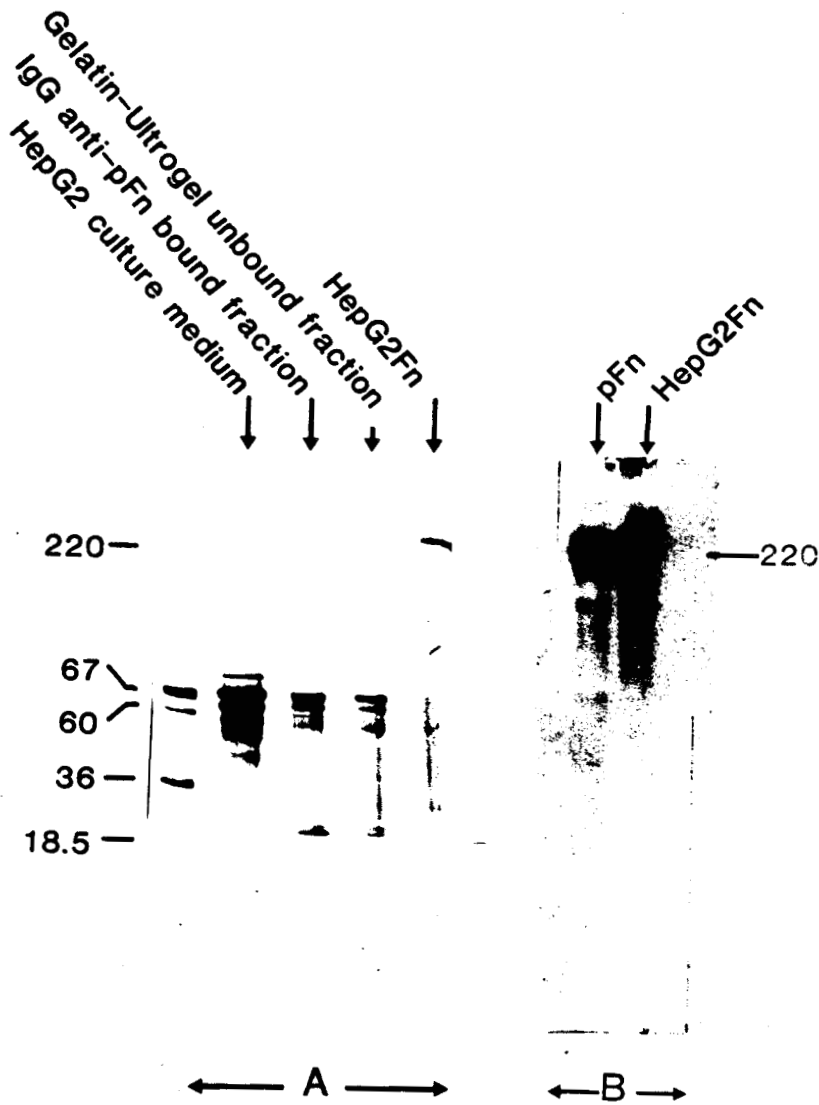


Fig. 16. Purification de la fibronectine du milieu de culture des cellules HepG2.

**A.** Les différentes étapes de la purification ont été caractérisées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS après coloration par le nitrate d'argent.

Ligne a: milieu de culture des cellules HepG2; ligne b: fraction éluée de la colonne d'anticorps anti-pFn par le tampon CAPS 0,1 M pH 11;

ligne c: fraction non retenue sur la colonne de gélatine-Sepharose;

ligne d: HepG2Fn éluée de la colonne de gélatine-Sepharose.

**B.** Comparaison de la masse moléculaire de la pFn (ligne e) et de la HepG2Fn (ligne f). Les bandes ont été visualisées par autoradiographie après électrotransfert et immuno-localisation par des [<sup>125</sup>I]-IgG anti-pFn.

Les masses moléculaires témoins indiquées à gauche correspondent à la ferritine (220.000), l'albumine (67.000), la catalase (60.000), la lactate déshydrogénase (36.000) et à la sous-unité de la ferritine (18.500).



préparation est tout à fait satisfaisante si on considère la faible concentration de la fibronectine dans le milieu de départ.

Cette électrophorèse effectuée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol fait apparaître que la HepG2Fn présente une masse moléculaire apparente légèrement supérieure à celle de la pFn. Cette différence de masse est nettement visible sur un gel révélé par des anticorps marqués selon le protocole décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes". Elle a pu être estimée à  $\approx 10$  kDa par monomère. Les modifications des structures glycaniques préalablement observées pourraient être la cause de cette augmentation de la masse apparente de la molécule.

#### 4. Chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Sephrose de la fibronectine native.

Afin de comparer l'affinité de la HepG2Fn et de la pFn vis-à-vis du collagène dénaturé, nous avons injecté environ 1 mg de fibronectine purifiée en solution dans le PBS, sur une colonne de gélatine-Ultrogel. La fibronectine a ensuite été éluée par un gradient linéaire d'urée de 0 à 4 M dans le PBS réalisé grâce à un appareil de chromatographie liquide LCC 500 Pharmacia muni de deux pompes asservies.

Les profils d'éluion obtenus par mesure de la densité optique à 280 nm sont présentés dans la figure 17 (p. 152). Il apparaît que la HepG2Fn possède une affinité plus faible pour le collagène dénaturé que la pFn. Le sommet du pic est obtenu pour une concentration en urée de 1,24 M pour la pFn alors que la concentration n'est que de 0,96 M pour la HepG2Fn. Une telle modification de l'affinité a déjà été observé par Zhu et al. (545) par comparaison de la pFn et de la fibronectine placentaire dont la partie glucidique est constituée en partie de structures poly-N-acétyllactosaminiques.

Afin de déterminer les raisons de cette diminution de l'affinité et, en particulier, si cette dernière est due à la structure de la partie glycanique ou à un changement de conformation de la partie peptidique, nous avons purifié le domaine de fixation au collagène par hydrolyse chymotrypsique ménagée.

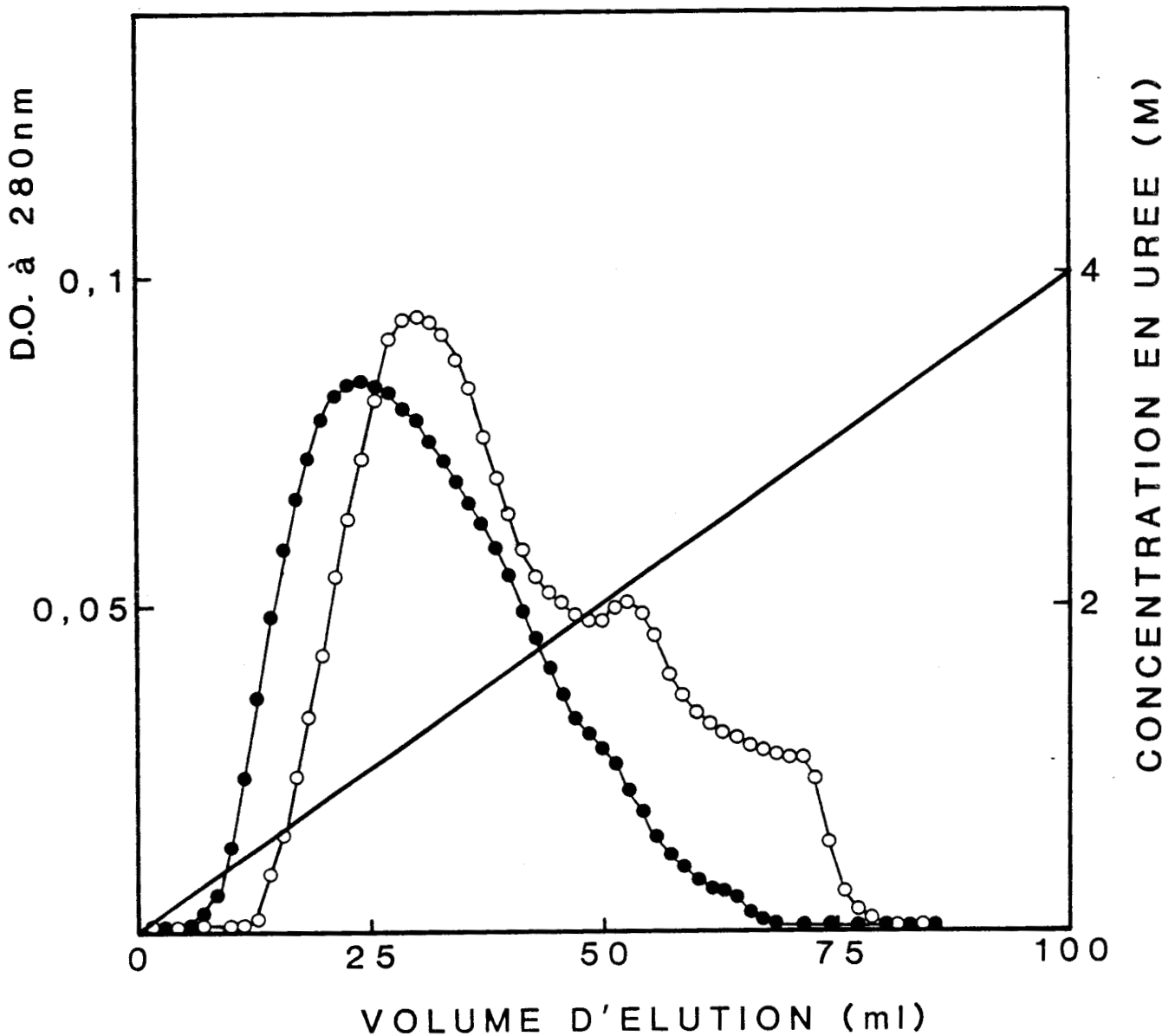


Fig. 17. Chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel de la pFn et de la HepG2Fn.

1 mg de fibronectine a été injecté sur une colonne de gélatine-Ultrogel (volume 10 ml) équilibrée dans le PBS 0,1 mM et éluée par un gradient linéaire d'urée de 0 à 4 M. L'éluion a été suivie par mesure de la densité optique à 280 nm.

- : pFn
- : HepG2Fn

5. Purification du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.

a - Etude préliminaire.

Les conditions d'hydrolyse décrites par Zhu et al. (545) ont été ré-étudiées en utilisant la pFn comme témoin. En particulier, nous avons déterminé le temps d'hydrolyse optimal permettant d'obtenir le fragment actif de 44 kDa avec le meilleur rendement, sans pour autant le dégrader par des coupures intracaténaies. De plus, nous avons ajouté dans le protocole de purification une étape de chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose qui permet d'éliminer une partie importante des fragments contaminants, notamment les fragments partiellement hydrolysés possédant un site d'affinité pour l'héparine (voir Fig. 18; p. 154).

Le domaine Hep III (troisième domaine de fixation à l'héparine) présente une très faible affinité (115) et, dans nos conditions, il ne se fixe pas sur la colonne d'héparine-Sepharose. Les résultats de la cinétique d'hydrolyse de la pFn sont présentées dans la figure 19 (p. 155). L'hydrolyse chymotrypsique génère deux fragments majeurs possédant une affinité pour la gélatine: Fragment I, de masse 62 kDa et un Fragment II de masse 44 kDa. La concentration en Fragment II croît avec le temps d'hydrolyse. Comme le montre la figure 18 (p. 154), le Fragment I est constitué du Fragment II lié au domaine Hep III de 16 kDa. Cette liaison, apparemment plus résistante à l'action de la chymotrypsine, peut être hydrolysée en augmentant le temps d'incubation.

Enfin, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS effectuée en milieu réducteur indique que ce fragment est constitué d'une seule chaîne polypeptidique. Par contre, lorsque le temps d'hydrolyse augmente, ce peptide peut être fragmenté, ce qui entraîne une perte d'affinité pour le collagène. Cette dégradation reste toutefois très faible après 4 h d'hydrolyse.

b - Purification du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.

La purification de ce domaine a été réalisée par hydrolyse chymotrypsique ménagée de 0,8 mg de HepG2Fn purifiée, préalablement marquée

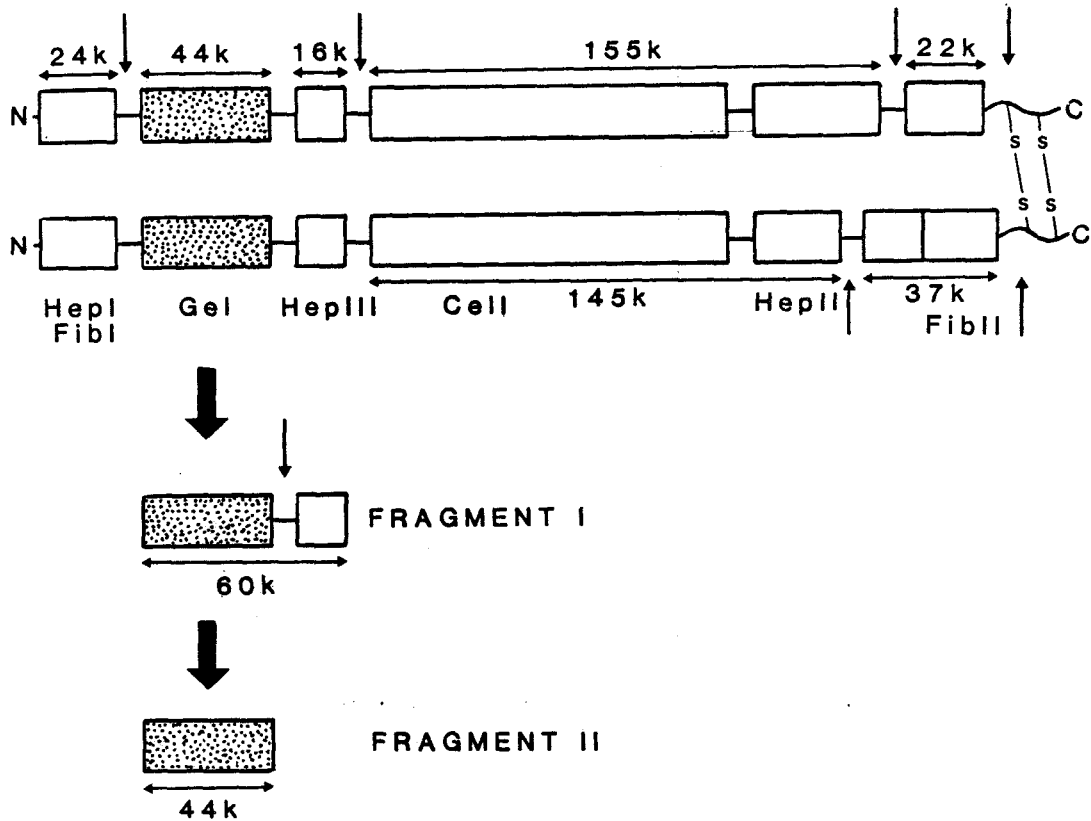


Fig. 18. Principaux sites de coupure de la fibronectine par l' $\alpha$ -chymotrypsine.

L'hydrolyse ménagée de la fibronectine par l' $\alpha$ -chymotrypsine permet de séparer les domaines fonctionnels de la molécule. Les masses moléculaires des principaux fragments obtenus sont indiquées sur le schéma.

Dans un premier temps, l' $\alpha$ -chymotrypsine génère un Fragment I de 62 kDa, constitué des domaines Gel et Hep III. L'hydrolyse de ce fragment libère le domaine Gel de 44 kDa.

—> : sites de coupures de l' $\alpha$ -chymotrypsine.

**Cell**, domaine de fixation cellulaire; **Fib I** et **Fib II**, domaines de fixation à la fibrine; **Gel**, domaine de fixation au collagène; **Hep I**, **Hep II** et **Hep III**, domaines de fixation à l'héparine.

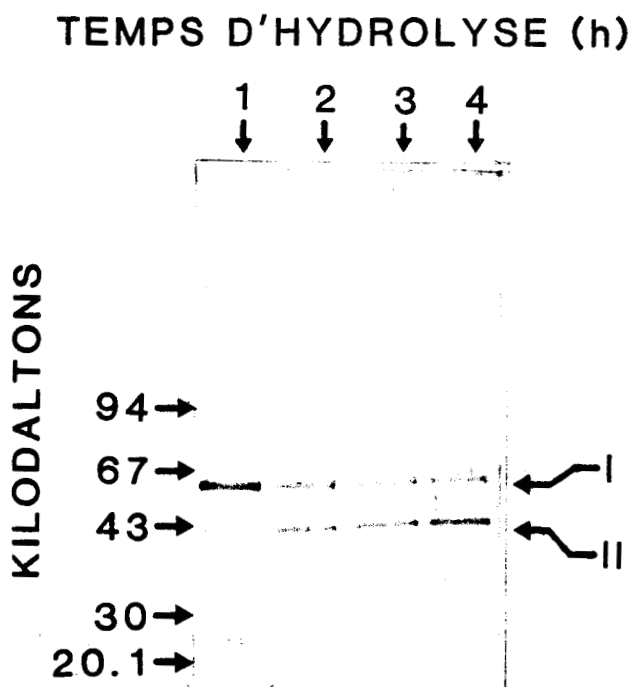


Fig. 19. Cinétique d'hydrolyse de la pFn par l' $\alpha$ -chymotrypsine.

10 mg de pFn ont été hydrolysés par l' $\alpha$ -chymotrypsine à 1 % (p/p) à 20°C. Des fractions aliquotes ont été prélevées après 1, 2, 3 et 4 h d'hydrolyse et fractionnées sur colonnes d'héparine-Sepharose et de gélatine-Sepharose montées en série. Les fractions éluées par l'urée 4 M de la gélatine-Sepharose ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et visualisées par le Bleu de Coomassie.

I, Fragment I (62.000); II, Fragment II (44.000).

Les masses moléculaires témoins indiquées à gauche correspondent à la phosphorylase b (94.000), l'albumine (67.000), l'ovalbumine (43.000), l'anhydrase carbonique (30.000) et à l'inhibiteur trypsique (20.100).

par [ $^{125}\text{I}$ ]. Les profils d'élution sont présentées à la Fig. 20 (p. 157) et le fragment purifiée a été analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et autoradiographie (Fig. 21; p. 158). La comparaison de ce fragment (ligne 3) avec celui préparé à partir de la pFn (ligne 1) indique qu'il possède une masse moléculaire apparente plus élevée qui a pu être estimée à 49 kDa, celle du fragment de la pFn étant de 44 kDa. En outre, son comportement électrophorétique dénote d'une plus grande hétérogénéité de masse moléculaire.

#### 6. Déglycosylation enzymatique du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.

La N-Glycanase purifiée des cultures de *Flavobacterium meningosepticum* permet d'hydrolyser la liaison GlcNAc-Asn des glycanes de type N-acétyllactosaminique, oligomannosidique et mixte (381). La déglycosylation de ce fragment a été effectuée dans des conditions non dénaturantes afin de préserver l'activité biologique de la partie peptidique. L'incubation est réalisée en présence de 1,10-phénanthroline 10 mM ajoutée comme inhibiteur protéinasique. Un échantillon témoin, sans enzyme, a été incubé dans les mêmes conditions. Après 48 h d'hydrolyse à 37°C, nous avons prélevé une fraction aliquote de l'incubat afin de l'analyser par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (Fig. 21; p. 158).

Le fragment traité par la N-Glycanase (ligne 4) a une masse moléculaire apparente de 39 kDa, ce qui correspond à une diminution de 10 kDa par rapport au fragment témoin (ligne 3). En outre, sa migration électrophorétique est comparable à celle du fragment déglycosylé provenant de la pFn (ligne 2).

Ce résultat tend à prouver que l'augmentation de la masse moléculaire apparente du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn, estimée à 5 kDa, est essentiellement due à sa partie glycanique. D'autre part, l'absence de bandes de masses moléculaires plus faibles, dans le témoin comme dans l'échantillon traité par l'enzyme, nous indique l'absence de dégradation de la partie peptidique au cours de l'incubation.

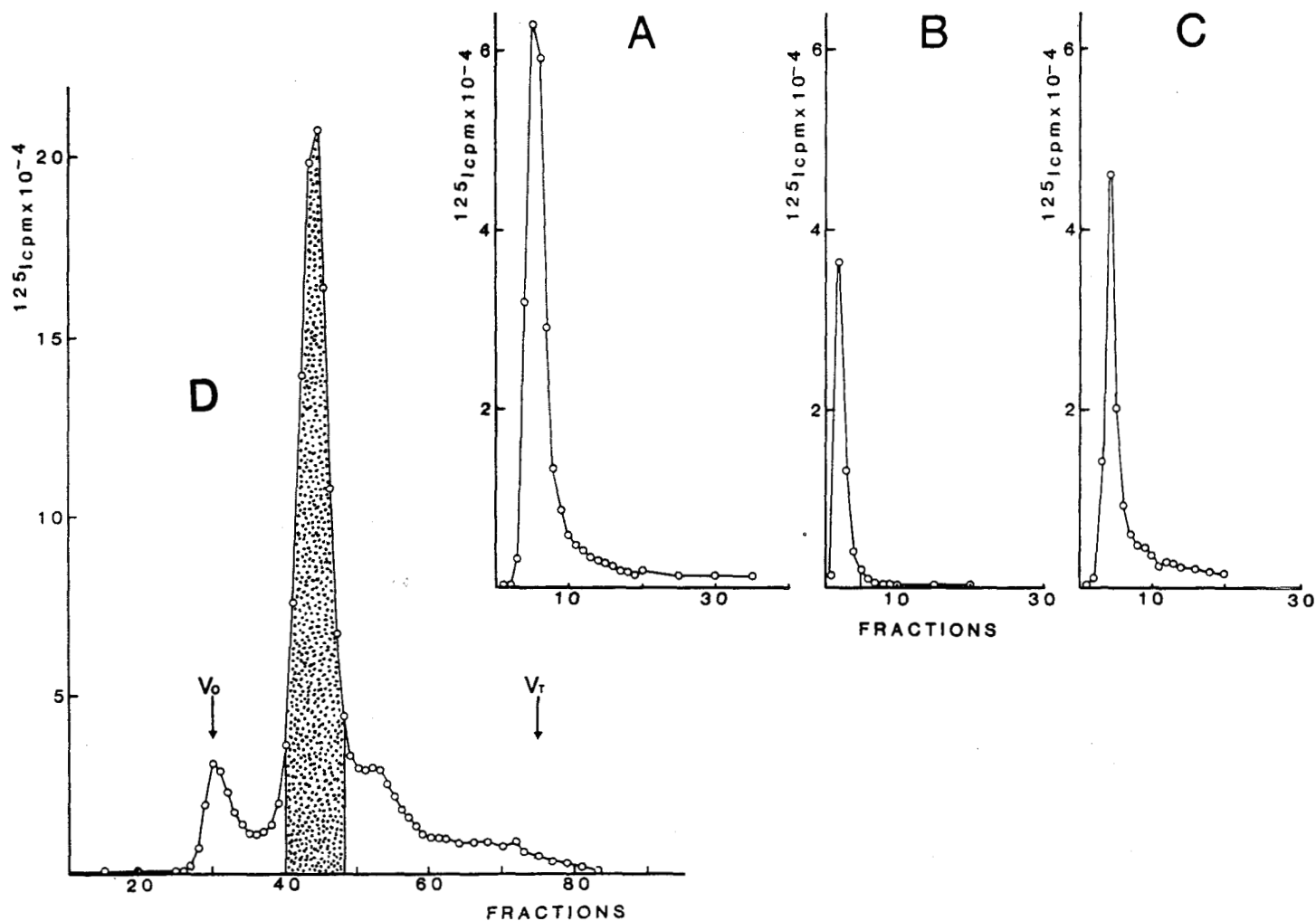


Fig. 20. Purification du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn.

0,8 mg de HepG2Fn, marquée par [ $^{125}\text{I}$ ] (180.000 cpm/ $\mu\text{g}$ ), en solution dans le TBS, a été incubé 4 h à 20°C en présence de 5  $\mu\text{l}$  de solution d' $\alpha$ -chymotrypsine à 1 mg/ml dans le TBS. Après addition de PMSF à une concentration finale de 1 mM, l'hydrolysate a été injecté sur colonnes d'héparine-Sepharose et de gélatine-Sepharose montées en série (colonnes de 5 ml équilibrées dans le PBS, PMSF 0,1 mM). Après rinçage par le tampon, les colonnes sont séparées et éluées par une solution d'urée 4 M.

**A:** fraction non retenue.

**B:** fraction éluée de la colonne de gélatine-Sepharose.

**C:** fraction éluée de la colonne d'héparine-Sepharose.

(fraction de 2,2 ml; comptage 50  $\mu\text{l}$ ).

La purification a été poursuivie par gel filtration de la fraction B sur Ultrogel AcA 44 (colonne de 100 x 1 cm), équilibrée dans le PBS, PMSF 0,1 mM (courbe D). Le pic hachuré a été analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (voir Fig. 21; p. 158) et conservé à -20°C.

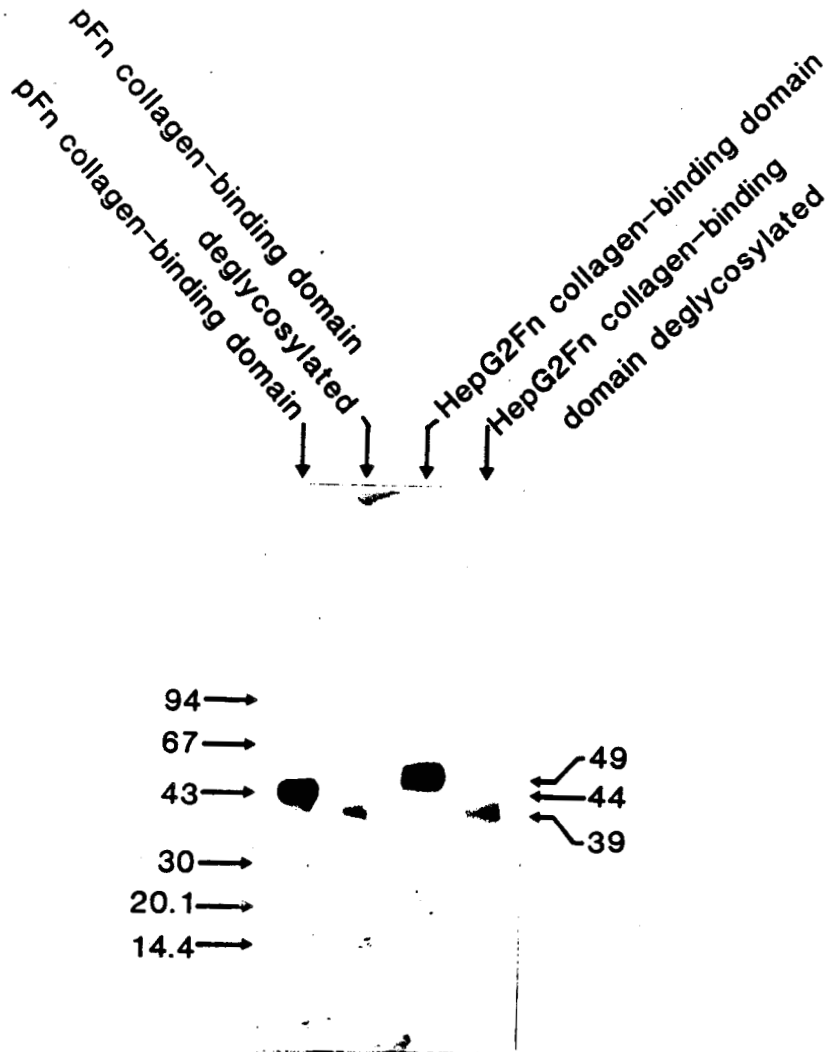


Fig. 21. Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS du domaine de fixation au collagène et visualisation de l'action de la N-Glycanase.

Comparaison du comportement électrophorétique des domaines de fixation au collagène de la pFn et de la HepG2Fn obtenus par hydrolyse chymotrypsique et mise en évidence de l'action de la N-Glycanase.

De gauche à droite: ligne 1; fragment témoin pFn  
ligne 2; fragment pFn déglycosylé  
ligne 3; fragment témoin HepG2Fn  
ligne 4; fragment HepG2Fn déglycosylé

La masse moléculaire des fragments natifs a été estimée à 44 kDa pour la pFn et à 49 kDa pour la HepG2Fn.

La masse moléculaire des deux fragments déglycosylés a été estimée à 39 kDa par rapport aux masses moléculaires témoins indiquées à gauche.



7. Chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn, natif et déglycosylé.

Cette chromatographie d'affinité a été effectuée dans les conditions préalablement utilisées pour l'analyse des fragments de la pFn. Les profils d'élution, présentés dans la figure 22 (p. 160), montre que le domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn possède une affinité plus faible que celui isolé de la pFn. Cette diminution d'affinité, préalablement observée pour la glycoprotéine native est ici plus marquée. Le sommet du pic d'élution apparaît à une concentration de 2,95 M pour la pFn et chute à 2,45 M pour la HepG2Fn. Nous pouvons également remarquer que le fragment isolé possède une affinité plus élevée que la glycoprotéine totale comme l'avait déjà observé Yamada et Kennedy (529). De plus, il s'avère que la diminution d'affinité de la HepG2Fn n'est pas due à une modification de la conformation de la protéine comme nous avons pu l'envisager. Il est à noter que ce fragment se fixe de façon quantitative sur le collagène (> 90% de la radioactivité totale) et qu'il est élué en un seul pic, ce qui tend à prouver l'absence de dénaturation et de coupure intracaténaire provoquant une perte ou une diminution importante de l'affinité.

L'analyse du profil d'élution du domaine traité par la N-Glycanase fait apparaître que la déglycosylation de ce fragment peptidique augmente son affinité pour la gélatine. Au contraire, et à l'inverse de ce que nous avons observé avec la pFn, l'élimination de la partie glycanique entraîne l'élution du fragment à une concentration en urée plus élevée (2,85 M). Si l'on rapproche ce résultat de celui obtenu avec la pFn pour laquelle la déglycosylation n'induisait aucun changement du profil d'élution, il est clair que les modifications des structures glycaniques de la HepG2Fn perturbent les interactions fibronectine-collagène.

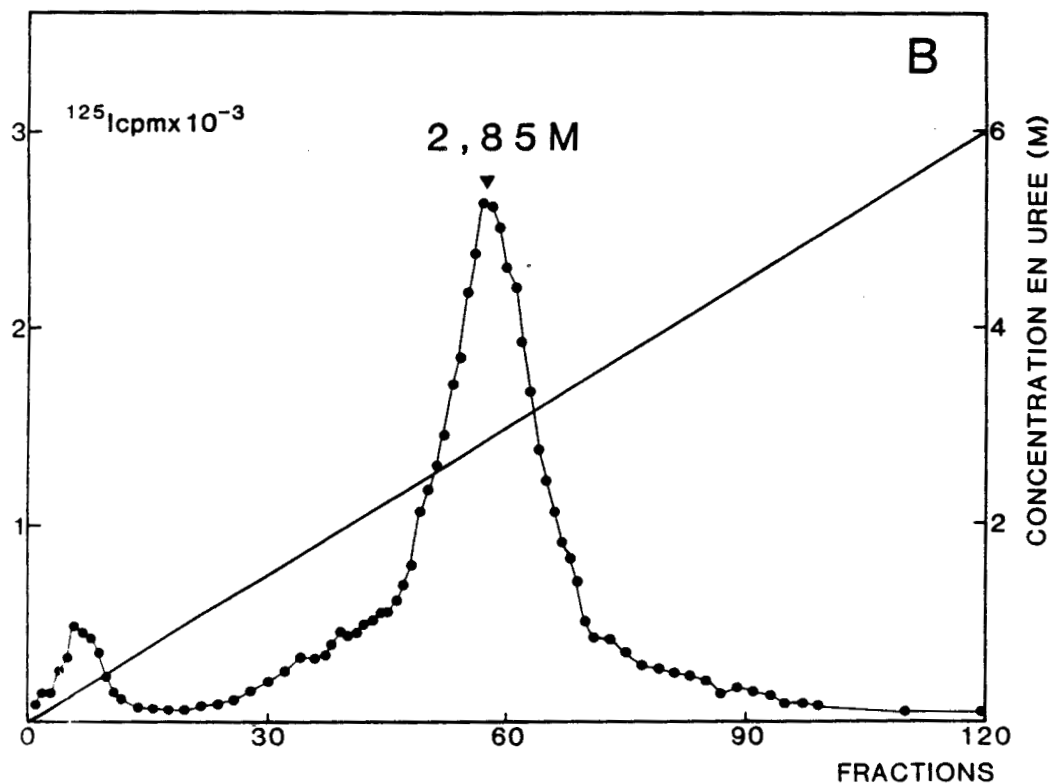
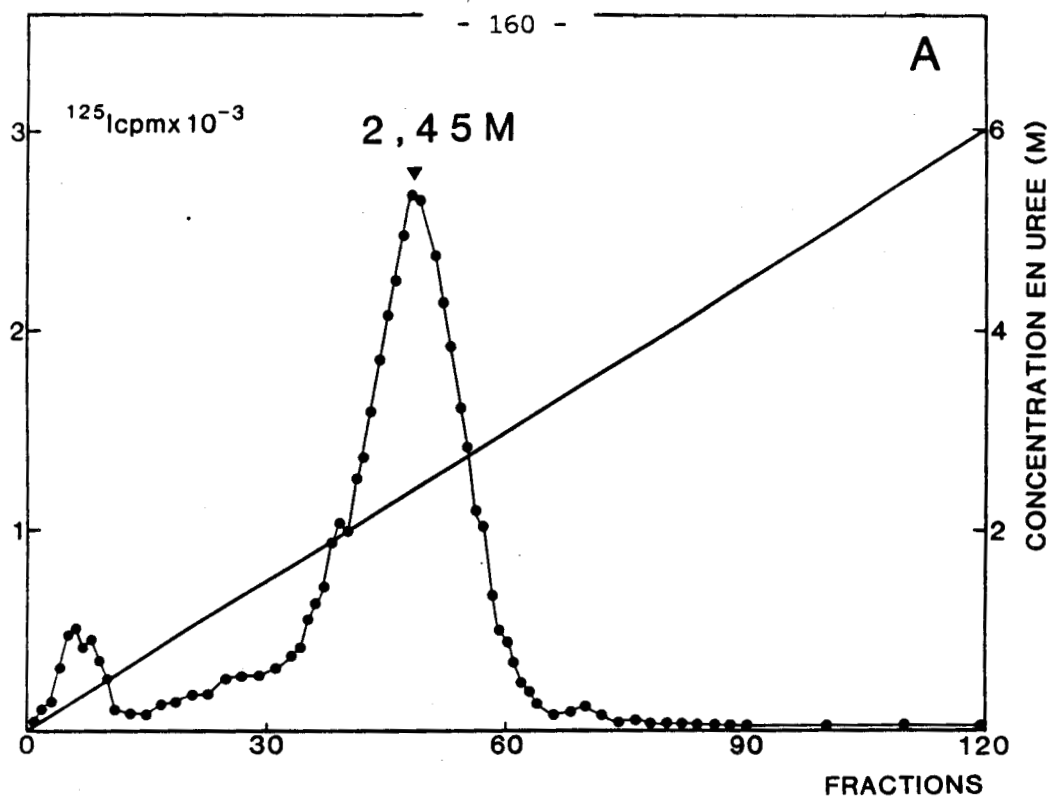


Fig. 22. Chromatographie d'affinité sur gélatine-Ultrogel du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn, natif et déglycosylé.

La chromatographie d'affinité du domaine natif (A) ou déglycosylé (B) a été réalisée dans les conditions utilisées préalablement pour la pFn et éluée par un gradient linéaire d'urée de 0 à 6 M. Le sommet du pic d'éluion apparaît à une concentration en urée de 2,45 M pour le fragment natif et de 2,85 M pour le fragment déglycosylé.

#### IV. DISCUSSION.

Dans la première partie de nos résultats, nous avons montré que l'affinité du domaine de fixation au collagène de la fibronectine plasmatique humaine n'est pas modifiée après traitement par la N-Glycanase. Le sommet du pic d'élution sur gélatine-Ultrogel est obtenu à une même concentration en urée de 2,95 M que le fragment soit déglycosylé ou non.

Ce résultat est apparemment en contradiction avec ceux de Jones et al. (234) qui ont montré que la fibronectine non glycosylée sécrétée dans le milieu de culture de fibroblastes de peau humains traités par la tunicamycine avait une affinité plus élevée pour la gélatine que la fibronectine témoin. Cependant, ces résultats sont difficilement comparables car ces auteurs n'ont effectué aucune analyse de la partie glycanique de la fibronectine étudiée. Il est possible que la copule glycanique de la fibronectine des fibroblastes utilisés pour cette étude soit différente de celle de la pFn, essentiellement constituée de glycannes biantennés. En particulier, l'enrichissement en structures "lourdes" pourrait expliquer l'affinité plus faible de la molécule glycosylée. A cet égard, les profils d'élution présentés par Jones et al. font apparaître une affinité du domaine glycosylé inférieure à celle de la pFn (2,76 M contre 2,95 M respectivement) et que le traitement par la tunicamycine lui confère une affinité comparable à celle de la pFn.

La deuxième partie de cette étude nous a tout d'abord permis de mettre en évidence l'enrichissement de la fibronectine des cellules HepG2 en glycannes tri- et tétraantennés. Il s'agit d'un nouvel exemple de modifications des glycannes de la fibronectine à la suite d'une transformation maligne qui nous permet de penser qu'il s'agit d'un phénomène général. La cancérisation n'est cependant pas le seul facteur capable de modifier la partie glycanique de la fibronectine. En particulier, il apparaît que la glycosylation de la fibronectine placentaire est modulée au cours de la gestation (546).

La déglycosylation enzymatique du domaine de fixation au collagène de la HepG2Fn nous a permis de vérifier, tout du moins partiellement, notre hypothèse de départ. En effet, il est clair que l'élimination de

la partie glycanique par la N-Glycanase a pour conséquence d'augmenter l'affinité du domaine de fixation au collagène. En outre, l'activité du fragment déglycosylé est comparable à celle de la pFn. Il est fort probable que nous soyons en présence d'un phénomène de masquage du site de fixation conduisant à la perte d'affinité.

Cette observation est en tout point comparable à celle effectuée par Zhu et al. (545) sur la fibronectine placentaire humaine où la présence de structures poly-N-acétyllactosaminiques provoquent également une diminution sensible de l'affinité pour le collagène.

Les conséquences de cette perte d'affinité reste toutefois à définir. En particulier, la diminution de l'affinité de la fibronectine placentaire reste pour le moment inexplicée. Dans le cas des cellules cancéreuses, il est possible d'envisager l'association de ce phénomène avec la diminution de la fibronectine associée à la membrane et à la perte d'adhésion de ces cellules.

Toutefois, notre travail sur la partie glycanique des cellules HepG2 demeure parcellaire. Il serait nécessaire, maintenant que l'on connaît l'implication des glycanes dans l'affinité de la fibronectine pour le collagène, de déterminer avec certitude la nature des modifications des structures glycaniques. La présence de structures poly-N-acétyllactosaminiques pourrait être envisagée du fait de l'augmentation importante de la masse moléculaire des glycanes qui a pu être estimée à 5 kDa pour le fragment chymotrypsique et à 10 kDa par monomère de fibronectine. Dans cet ordre d'idée, Nichols et al. (340) ont récemment montré par l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique de la séquence: Gal( $\alpha$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3/6)Gal que la fibronectine sécrétée par des cellules fibroblastiques humaines WI 38 transformées par le virus SV 40 possédait de telles structures.

D'autre part, bien que la plupart des glycanes de la fibronectine se trouve associée au site de fixation au collagène, une proportion significative se retrouve sur le domaine de fixation cellulaire. A ce sujet, plusieurs questions restent en suspens. Les modifications des structures glycaniques affectent-elles de la même manière tous les glycanes ou sont-elles associées préférentiellement à un domaine particulier? Jones et al. ont montré que la fibronectine non glycosylée avait un pouvoir d'adhésion cellulaire sensiblement plus élevée que la molécule native (234). Peut-on considérer que les glycanes de la

fibronectine puissent moduler l'affinité de la molécule pour son récepteur membranaire ?

Les réponses à ces questions permettraient sans doute de mieux saisir le rôle de la glycosylation dans les phénomènes de l'adhésion cellulaire.

. . . .

## **CONCLUSIONS**

Au terme de cet exposé, il nous est possible de dégager les points suivants:

1 - L'étude réalisée sur la fibronectine de cellules BHK21/C13 "normales" et transformées par le virus du sarcome du Hamster nous a permis de caractériser les modifications qui affectent la partie glycanique de la fibronectine des cellules transformées et ainsi d'étendre à une glycoprotéine de la matrice extracellulaire les observations effectuées dans divers laboratoires (114-115,321,347,464,551) au niveau des glycannes des glycoprotéines cellulaires.

Notre analyse a pu montrer que les glycannes majeurs de la fibronectine de fibroblastes de rein de Hamster "normaux" ont une structure de type N-acétyllactosaminique biantennée, fucosylée, essentiellement neutre ou monosialylée, telle que l'avait décrite Fukuda et Hakomori (136).

La fibronectine des cellules transformées voit sa partie glycanique modifier à deux niveaux:

a - La proportion des glycannes de type tri- et tétraantennés augmente considérablement au détriment des structures biantennées.

b - Parallèlement, le taux de sialylation est nettement plus élevé, la fibronectine des cellules transformées étant enrichie en glycannes di-, tri- et tétrasialylés qui n'existent qu'en faible proportion dans la fibronectine des cellules "normales".

Sur la base de ces résultats, eux-mêmes confirmés par les travaux de Wagner et al. (502) et de Murayama et al. (336), nous avons émis l'hypothèse que l'antennarisation et la sialylation accrues des glycannes de la fibronectine pourraient compter parmi les facteurs de dissociation du tissu cancéreux. En effet, différents résultats expérimentaux (319-320) ont montré que les glycannes tri- et tétraantennés adoptent une conformation étalée (dite "en parapluie"), couvrant des superficies importantes de la protéine. En outre, cette conformation peut être maintenue par la formation de liaisons ioniques entre les résidus d'acide sialique et les acides aminés basiques de la chaîne peptidique. De ce fait, les modifications glycaniques qui affectent les cellules

cancéreuses pourraient être à l'origine d'un masquage des sites de fixation de la fibronectine conduisant à une diminution de son affinité.

2 - Notre étude des activités sialyltransférasiques des cellules BHK21/C13 a permis de caractériser l'incorporation d'acide N-acétylneuraminique sur différents accepteurs par uniquement une liaison  $\alpha$ -2,3. Comme nous pouvions le prévoir, nous avons également mis en évidence l'augmentation importante de l'activité enzymatique dans les homogénats de cellules transformées. Nous avons profité du fait de la présence d'une seule activité sialyltransférasique dans les homogénats cellulaires pour préciser certains paramètres enzymatiques de l' $\alpha$ -2,3-sialyltransférase. Ceci nous a permis de caractériser dans les cellules transformées une diminution du Km apparent vis-à-vis des asialoglycopeptides tri- et tétraantennés, reflet d'une augmentation de l'affinité apparente de l'enzyme pour ces structures.

Cette augmentation de l'affinité apparente de l'enzyme doit certainement trouver son explication dans une perturbation des systèmes de régulation de l'enzyme. Cependant, avant de poursuivre cette étude, il sera nécessaire de mieux connaître les systèmes qui régissent la régulation des glycosyltransférases membranaires des cellules normales.

3 - L'étude de la fibronectine des cellules HepG2 nous a permis d'obtenir plusieurs résultats.

a - Comme nous l'avions préalablement observé pour les cellules fibroblastiques, l'utilisation de la ConA nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'antennarisation des glycanes de la fibronectine sécrétée par les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 par comparaison avec ceux de la fibronectine plasmatique humaine.

b - Parallèlement, la fibronectine des cellules HepG2 possède une affinité plus faible pour le collagène que la fibronectine plasmatique humaine. Cette observation se vérifie lorsqu'on isole le domaine spécifique de fixation au collagène.

c - La déglycosylation enzymatique ne modifie en rien l'affinité du domaine de fixation au collagène de la fibronectine plasmatique humaine. Par contre, dans le cas de la fibronectine des cellules HepG2,



la déglycosylation entraîne une augmentation sensible de l'affinité de ce domaine.

Prises dans leur ensemble, ces différentes observations nous montre que l'augmentation de l'antennarisation de la fibronectine peut conduire à une diminution de son affinité apparente pour le collagène. Comme l'ont montré Skorstengaard et al. (445) le site de fixation au collagène est un domaine structural de 44 kDa parfaitement différencié. Par ailleurs, il est porteur de trois glycanes de type N-acétyllactosaminique. lorsque les glycanes ont une structure biantennée, comme c'est le cas dans la fibronectine plasmatique humaine, l'effet de masquage de la partie peptidique doit être faible car la déglycosylation de ce domaine ne modifie pas son affinité. Inversement, lorsque la proportion des structures tri- et tétraantennées augmente ceci conduit à une diminution de l'affinité du site actif.

Ces observations, à elles seules, ne nous permettent pas encore de dire si l'alourdissement des glycanes de la fibronectine conduit à une désorganisation de la matrice extracellulaire des cellules transformées. Cependant, et bien que les mécanismes permettant l'organisation de la fibronectine au sein de la matrice extracellulaire ne soient pas encore connues, il a été montré que les interactions fibronectine-collagène joue un rôle important dans l'organisation de ce réseau fibrillaire. De ce fait, la diminution de l'affinité de la fibronectine pour le collagène pourrait être associée à la désorganisation de la matrice qui entoure les cellules cancéreuses.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Les références citées dans les articles ne sont pas classées  
ci-dessous.

Références	Pages
1 Abecassis, J., Collard, R., Eber, M., Pusel, J., Fricker, J.P. et Methlin, G. (1984) <i>Int. J. Cancer</i> <b>33</b> , 821-824.	87
2 Abraham, S.N., Beachey, E.H. et Simpson, W.A. (1983) <i>Infect. Immun.</i> <b>41</b> , 1261-1268.	57
3 Adams, S.L., Sobel, M.E., Howard, B.M., Olden, K., Yamada, K.M., De Crombrughe, B. et Pastan, I. (1979) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>74</b> , 3399-3403.	62
4 Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. et Knowles, B.B. (1979) <i>Nature</i> <b>282</b> , 615-616.	123,126
5 Akiyama, S.K., Hasegawa, E., Hasegawa, T. et Yamada, K.M. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 13256-13260.	28
6 Akiyama, S.K. et Johnson, M.D. (1983) <i>Comp. Biochem.</i> <i>Physiol.</i> <b>76B</b> , 687-694.	6,7
7 Akiyama, S.K. et Yamada, K.M. (1983) in "Connective Tissue and Diseases of Connective Tissue", Wagner, B.B. et Fleischmajer, R. eds., Williams and Wilkins, Baltimore, 55-96.	8,44
8 Akiyama, S.K. et Yamada, K.M. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 4492-4500.	28
9 Akiyama, S.K., Yamada, S.S. et Yamada, K.M. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>102</b> , 442-448.	28
10 Albany, A., Allavena, G., Richter, H., Pontz, B.F., Parodi, S. et Santi, L. (1985) <i>Experimentia</i> <b>41</b> , 1591-1593.	54
11 Alexander, S.S., Colonna, G., Yamada, K.M., Pastan, I. et Edelhoch, H.J. (1978) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>253</b> , 5820-5824.	11,13
12 Alexander, S.S., Colonna, G. et Edelhoch, H.J. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 1501-1505.	11
13 Alhadeff, J.A. et Holzinger, R.T. (1982) <i>Int. J.</i> <i>Biochem.</i> <b>14</b> , 119-126.	87
14 Ali, I.U. (1983) <i>FEBS Lett.</i> <b>151</b> , 45-48.	36
15 Ali, I.U. (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>81</b> , 28-32.	8,24
16 Ali, I.U. (1984) <i>FEBS Lett.</i> <b>176</b> , 169-175.	36

Références	Pages
17 Ali, I.U. et Hunter, T. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>256</b> , 7671-7677.	36,63
18 Ali, I.U., Mautner, V., Lanza, R. et Hynes, R.O. (1977) <i>Cell</i> <b>11</b> , 115-126.	61
19 Ali, I.U. et Hynes, R.O. (1979) <i>Cell</i> <b>14</b> , 439-446.	54
20 Ali, I.U., Mautner, V.M., Lanza, R.P. et Hynes, R.O. (1977) <i>Cell</i> <b>11</b> , 115-126.	58
21 Amrani, D.L., Falk, M.J. et Mosesson, M.W. (1985) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>160</b> , 171-183.	49,122
22 Amrani, D.L., Mauzy-Melitz, D. et Mosesson, M.W. (1986) <i>Biochem. J.</i> <b>238</b> , 365-371.	49,68
23 Aplin, J.D. et Hugues, R.C. (1982) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>694</b> , 375-418.	6
24 Argraves, W.S., Pytela, R., Suzuki, S., Thompson, K., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>103</b> , 531a.	28
25 Arumugham, R.G. et Tanzer, M.L. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 11883-11889.	43
26 Asch, B.B., Kamat, B.R. et Burstein, N.A. (1981) <i>Cancer Res.</i> <b>41</b> , 2115-2125.	60,65
27 Aub, J.C., Sanford, B.H. et Cote, M.N. (1965) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>54</b> , 396-399.	60
28 Aurameas, S. et Ternynck, T. (1976) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>72</b> , 790-795.	126
29 Babu, J.P., Simpson, W.A., Courtney, H.S. et Beachey, E.H. (1983) <i>Infect. Immun.</i> <b>41</b> , 162-168.	57
30 Baenziger, J.U. et Fiete, D. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 789-795.	86
31 Baker, M.A., Taub, R.N., Kanani, A., Brockhausen, I. et Hindenburg, A. (1985) <i>Blood</i> <b>66</b> , 1068-1071.	86
32 Balduini, C.L., Sinigaglia, F., Salvini, P. et Balduini, C. (1984) <i>Haemostasis</i> <b>14</b> , 158-163.	55
33 Balian, G., Click, E.M., Crouch, E., Davidson, J.M. et Bornstein, P. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 1429-1432.	23
34 Balian, G., Crouch, E., Click, E.M., Carter, W.G. et Bornstein, P. (1979) <i>J. Supramol. Struct.</i> <b>12</b> , 505-516.	15,38

Références	Pages
35 Bannikov, G.A., St Vincent, L. et Montesano, R. (1980) Br. J. Cancer <b>42</b> , 596-609.	60
36 Barlati, S., Adamoli, A. et Depetro, G. (1986) in "Structural Glycoproteins in Cell Matrix Interactions", Labat-Robert, J., Timpl, R. et Robert, L. eds., S. Karger AG, Basel, 174-183.	63
37 Baumann, H. et Eldredge, D. (1982) J. Cell Biol. <b>95</b> , 29-40.	49
38 Beachey, E.H. et Simpson, W.A. (1982) Infection <b>10</b> , 65-69.	23,57
39 Bendiak, B. et Cook, G.M.W. (1982) Eur. J. Biochem. <b>128</b> , 355-362.	86
40 Bendiak, B. et Cook, G.M.W. (1983) Biochem. J. <b>213</b> , 253-260.	86
41 Ben Susan, H.B., Koh, T.L., Henry, K.G., Murray, B.A. et Culp, L.A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>75</b> , 5864-5868.	55
42 Bentley, K.L., Klebe, R.J., Hurst, R.E. et Horowitz, P.M. (1985) J. Biol. Chem. <b>260</b> , 7250-7256.	29
43 Berger, E.G. et Hesford, F.J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>82</b> , 4736-4739.	85
44 Bernacki, R.J. et Kim, U. (1977) Science <b>195</b> , 577-580.	87
45 Bernard, B.A., Yamada, K.M. et Olden, K. (1982) J. Biol. Chem. <b>257</b> , 8549-8554.	43,123
46 Bernard, M.P., Kolbe, M., Weil, D. et Chu, M.L. (1985) Biochemistry <b>24</b> , 2698-2704.	33,47
47 Bernard, M.P., Myers, J.C., Chu, M.L., Ramirez, F., Eikenberry, E.F. et Prockop, D.J. (1983) Biochemistry <b>22</b> , 1139-1145.	27
48 Birdwell, C.R., Gosdodarowicz, D. et Nicolson, G.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>75</b> , 3273-3277.	47
49 Bishop, D.H.L., Huddleston, J.A. et Brownlee, G.G. (1982) Nucleic Acids Res. <b>10</b> , 1335-1339.	27
50 Bitar, K.G., Perez-Aranda, A. et Bradshaw, R.A. (1980) FEBS Lett. <b>116</b> , 196-198.	27
51 Blithe, D.L., Buck, C.A. et Warren, L. (1980) Biochemistry <b>19</b> , 3386-3395.	72

Références	Pages
52 Blumenstock, F.A., Saba, T.M., Weber, P. et Laffin, R. (1978) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>253</b> , 4287-4291.	57
53 Blumenstock, F.A., Weber, P. et Saba, T.M. (1977) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>252</b> , 7156-7162.	5,57
54 Bøg-Hansen, T.C., Prahl, P. et Løwenstein, H. (1978) <i>J. Immunol. Meth.</i> <b>22</b> , 293-307.	129
55 Borsi, L., Carnemolla, B., Castellani, P., Rosellini, C., Vecchio, D., Allemanni, G., Chang, S.E., Taylor-Papadimitriou, J., Pande, H. et Zardi, L. (1987) <i>J. Cell Biol.</i> <b>104</b> , 595-600.	63
56 Borsi, L., Castellani, P., Balza, E., Siri, A., Pellechia, C., De Scalzi, F. et Zardi, L. (1986) <i>Anal. Biochem.</i> <b>155</b> , 335-345.	20
57 Bosmann, H.B., Boeber, G.F., Brown, A.E., Case, K.R., Gersten, D.M., Kimmerrrer, T.W. et Hone, A. (1973) <i>Nature</i> <b>246</b> , 487-490.	86
58 Bosmann, H.B. (1972) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>49</b> , 1256-1262.	86
59 Bosmann, H.B. et Hall, C. (1974) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>71</b> , 1833-1837.	86
60 Boucaut, J.C., Darribère, T., Boulekbache, H. et Thiéry, J.P. (1984) <i>Nature</i> <b>307</b> , 364-367.	55
61 Boucaut, J.C., Darribère, T., Poole, T.J., Aoyama, H., Yamada, K.M. et Thiéry, J.P. (1984) <i>J. Cell Biol.</i> <b>99</b> , 1822-1830.	55
62 Bowersox, J.C. et Sorgente, N. (1982) <i>Cancer Res.</i> <b>42</b> , 2547-2551.	56
63 Brown, J.R. (1976) in "Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol 5", Dayhoff, M.O. ed., National Biochemical Research Foundation, Washington, 266-267.	45
64 Brown, P.J. et Juliano, R.L. (1985) <i>Science</i> <b>228</b> , 1448-1451.	28
65 Brown, P.J. et Juliano, R.L. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>103</b> , 1595-1603.	28
66 Buck, C.A., Fuhrer, J.P., Soslan, G. et Warren, L. (1974) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>249</b> , 1541-1550.	72
67 Buck, C.A., Glick, M.C. et Warren, L. (1970) <i>Biochemistry</i> <b>9</b> , 4567-4576.	60,71
68 Buck, C.A., Glick, M.C. et Warren, L. (1971) <i>Biochemistry</i> <b>10</b> , 2176-2180.	71

Références	Pages
69 Buck, C.A., Glick, M.C. et Warren, L. (1970) <i>Science</i> <b>172</b> , 169-171.	71
70 Burridge, K. (1976) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>73</b> , 4457-4461.	60
71 Burridge, K. et Connell, L. (1983) <i>J. Cell Biol.</i> <b>97</b> , 359-367.	53
72 Calaycay, J., Pande, H., Lee, T., Borsi, L., Siri, A., Shively, J.E. et Zardi, L. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 12136-12141.	14
73 Cardarelli, P.M. et Pierschbacher, M.D. (1986) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>83</b> , 2647-2651.	59
74 Carlson, N.R.K., Estes, T., Degroot, J., Holden, J.T. et Ruoslahti, E. (1980) <i>Biochem. J.</i> <b>190</b> , 301-305.	24
75 Carnemolla, B., Castellani, P., Cutolo, M., Borsi, L. et Zardi, L. (1984) <i>FEBS Lett.</i> <b>171</b> , 285-288.	8
76 Carter, W.G. (1984) <i>J. Cell Biol.</i> <b>99</b> , 105-114.	22
77 Carter, W.G. et Hakomori, S.I. (1979) <i>Biochemistry</i> <b>18</b> , 730-738.	40,41
78 Castellani, P., Siri, A., Rosellini, C., Infunisi, E., Borsi, L. et Zardi, L. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>103</b> , 1671-1677.	63
79 Chatterjee, S.K. (1979) <i>Eur. J. Cancer</i> <b>15</b> , 1351-1356.	87
80 Chelibonova-Lorer, H., Ivanov, S., Garozova, E. et Antonova, M. (1986) <i>Int. J. Biochem.</i> <b>18</b> , 271-276.	87
81 Chen, A.B., Amrani, D.L. et Mosesson, M.W. (1977) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>493</b> , 310-322.	58
82 Chen, L.B., Summerhayes, I., Hsieh, P. et Gallimore, J.E. (1979) <i>J. Supramol. Struct.</i> <b>12</b> , 139-150.	61
83 Chen, J.M. et Chen, W.T. (1987) <i>Cell</i> <b>48</b> , 193-203.	63
84 Chen, W.T., Chen, J.M. et Mueller, S.C. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>103</b> , 1073-1090.	55
85 Chen, W.T., Chen, J.M., Parsons, S.J. et Parsons, J.T. (1985) <i>Nature</i> <b>316</b> , 156-158.	63
86 Chen, W.T., Olden, K., Bernard, B.A. et Chu, F.F. (1984) <i>J. Cell Biol.</i> <b>98</b> , 1546-1555.	63
87 Chen, W.T. et Singer, S.J. (1982) <i>J. Cell Biol.</i> <b>95</b> , 205-222.	22

Références	Pages
88 Chen, W.T., Wang, J., Hasegawa, T., Yamada, S.S. et Yamada, K.M. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>103</b> , 1649-1661.	28
89 Cheresh, D.A. et Klier, F.G. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>102</b> , 1887-1897.	29
90 Cheresh, D.A., Pierschbacher, M.D., Herzig, M.A. et Mujoo, K. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>102</b> , 688-696.	29
91 Chiquet, M., Puri, E.C. et Turner, D.C. (1979) <i>J.</i> <i>Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 5475-5482.	59
92 Choate, J.J. et Mosher, D.F. (1983) <i>Cancer</i> <b>51</b> , 1142-1147.	68
93 Choi, M.G. et Hynes, R.O. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 12050-12055.	47,49
94 Clement, J.M. et Hofnung, M. (1981) <i>Cell</i> <b>27</b> , 507-514.	27
95 Click, E.M. et Balian, G. (1985) <i>Biochemistry</i> <b>24</b> , 6685-6696.	36
96 Collard, J.G., Schijuen, J.F., Bikker, A., La Rivière, G., Bolscher, J.G.M. et Rios, E. (1986) <i>Cancer Res.</i> <b>46</b> , 3521-3527.	69,72
97 Collet, M. et Erikson, R. (1978) <i>Proc. Natl. Acad.</i> <i>Sci. USA</i> <b>75</b> , 2021-2024.	63
98 Coman, D.R. (1944) <i>Cancer Res.</i> <b>4</b> , 625-629.	59
99 Conrad, J., Diehl-Seifort, B., Zahn, R.K., Uhlenbeck, G., Zimmermann, E. et Müller, W.E.G. (1982) <i>J. Cell Biochem.</i> <b>19</b> , 395-404.	7
100 Corthier, G., Boschetti, E. et Charley-Poulain, J. (1984) <i>Immunol. Meth.</i> <b>66</b> , 75-79.	126
101 Cosio, F.G. (1984) <i>J. Lab. Clin. Med.</i> <b>103</b> , 613-619.	58
102 Cossu, G. et Warren, L. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 5603-5607.	64
103 Couchman, J.R., Höök, M., Rees, D.A. et Timpl, R. (1983) <i>J. Cell Biol.</i> <b>96</b> , 177-183.	52
104 Critchley, D.R. (1974) <i>Cell</i> <b>3</b> , 121-125.	13
105 Cseh, K., Kabalay, L., Jakab, L., Török, J., Marticssek, J., Pozsonyi, T. et Szlenarik, G. (1985) <i>Ann. Immunol. Hung.</i> <b>25</b> , 305-315.	68
106 Czop, J.K. et Austen, K.F. (1982) <i>J. Immunol.</i> <b>129</b> , 2678-2681.	58



Références	Pages
107 Czop, J.K. Kadish, J.L. et Austen, K.F. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>78</b> , 3649-3653.	58
108 Czop, J.K. Kadish, J.L. et Austen, K.F. (1982) J. Immunol. <b>129</b> , 163-167.	58
109 Czop, J.K. Kadish, J.L., Zepf, D.M. et Austen, K.F. (1985) J. Immunol. <b>134</b> , 1844-1850.	58
110 Dao, T.L., Ip, C. et Patel, J. (1980) J. Natl. Cancer Inst. <b>65</b> , 529-534.	87
111 Darribère, T., Boucher, D., Lacroix, J.C. et Boucaut, J.C. (1984) Cell Differentiation <b>14</b> , 171-177.	54
112 Darribère, T., Boulekbache, H., Shi, D.L. et Boucaut, J.C. (1985) Cell Tissue Res. <b>239</b> , 75-80.	54
113 Debeire, p. (1986) Thèse de doctorat ès Sciences n°687, présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille.	60
114 Debray, H., Delannoy, P., Debeire, P. et Montreuil, J. (1983) in "Proc. VIIth Intern. Symp. Glycoconjugates", Lund-Roneby 18-23 juillet, 172.	60,72,73,164
115 Debray, H., Pierce-Crétel, A., Spik, G. et Montreuil, J. (1983) in "Lectin Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry", Bøg-Hansen, T.C. et Splenger, G.A. eds, De Gruyter, Berlin, 335-350.	131,148,153, 164
116 Debray, H., Qin, Z., Delannoy, P., Montreuil, J., Dus, D., Radzikowski, , Christensen, B. et Kieler, J. (1986) Int. J. Cancer <b>37</b> , 607-611.	60,71,73
117 Debryne, V., Montreuil, J. et Spik, G. (1984) Prot. Biol. Fluids <b>31</b> , 63-68.	129,146
118 Dedhar, S., Ruoslahti, E. et Pierschbacher, M.D. (1987) J. Cell Biol. <b>104</b> , 585-593.	25
119 Dennis, J.W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M.L. et Kerbel, R.S. (1987) Science <b>236</b> , 582-585.	72
120 Der, C.J. et Stanbridge, E.J. (1978) Cell <b>15</b> , 1241-1251.	60,65
121 Dessau, W., Adelman, B.C., Timpl, R. et Martin, G.R. (1978) Biochem. J. <b>169</b> , 55-59.	24
122 Dienes, H.P., Knoblich, A. et Falke, D. (1985) Arch. Virology <b>86</b> , 223-237.	64
123 Duband, J.L., Rocher, S., Chen, W.T., Yamada, K.M. et Thiéry, J.P. (1986) J. Cell Biol. <b>102</b> , 160-178.	28,55

Références	Pages
124 Durham, J.P., Gillies, D., Baxter, A. et Lopez-Solis, R.O. (1979) Clin. Chim. Acta <b>95</b> , 425-432.	87
125 Edwards, J.G., Campbell, G. et Salama, N. (1985) Cell Biol. Int. Rep. <b>9</b> , 737-745.	64
126 Ehrisman, R., Roth, D.E., Eppenberger, H.M. et Turner, D.C. (1982) J. Biol. Chem. <b>257</b> , 7381-7387.	20
127 Engvall, E. et Ruoslahti, E. (1977) Int. J. Cancer <b>20</b> , 1-5.	24,52,125
128 Engvall, E., Ruoslahti, E. et Miller, E.J. (1978) J. Exp. Med. <b>147</b> , 1584-1595.	24,32
129 Erickson, H.P. et Carrel, N.A. (1983) J. Biol. Chem. <b>258</b> , 14539-14544.	10,12
130 Erickson, H.P. et Inglesias, J.L. (1984) Nature <b>311</b> , 267-269.	12,13
131 Fisher, S.J. et Laine, R.A. (1979) J. Supramol. Struct. <b>11</b> , 391-399.	38
132 Fitzgerald, T.J. et Repesh, L.A. (1985) Genitourin. Med. <b>61</b> , 147-155.	57
133 Fraker, P.J. et Speck, J.C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. <b>80</b> , 849-857.	127
134 Frangon, S.A., Morris, E.R., Rees, D.A., Welsh, E.J. et Chavin, S.I. (1983) Biopolymers <b>22</b> , 821-831.	53
135 Friedman, R., Gelfand, T., Weiss, D.M. et Dorjanski, F. (1984) Int. J. Tiss. Reac. <b>6</b> , 291-301.	64
136 Fukuda, M. et Hakomori, S.I. (1979) J. Biol. Chem. <b>254</b> , 5451-5457.	40,41,80,167
137 Fukuda, M., Levery, S.B. et Hakomori, S.I. (1982) J. Biol. Chem. <b>257</b> , 6856-6860.	39,40
138 Furcht, L.T. (1983) Mod. Cell Biol. <b>1</b> , 53-117.	6,50
139 Furcht, L.T., Mosher, D.F., Wendelschafer-Crabb, G., Woodbridge, P.A. et Foidart, J.M. (1979) Nature <b>277</b> , 393-395.	62
140 Gahmberg, C.G. Kiehn, D. et Hakomori, S.I. (1974) Nature <b>248</b> , 413-415.	5,13,62
141 Ganzinger, U. et Deutsch, E. (1980) Cancer Res. <b>40</b> , 1300-1304.	87

Références	Pages
142 Garcia-Pardo, A., Pearlstein, E. et Frangione, B. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 12670-12674.	14
143 Garcia-Pardo, A., Pearlstein, E. et Frangione, B. (1984) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>120</b> , 1015-1021.	10,14,20
144 Garcia-Pardo, A., Pearlstein, E. et Frangione, B. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 10320-10325.	14,33
145 Garcia-Pardo, A., Rostagno, A. et Frangione, B. (1987) <i>Biochem. J.</i> <b>241</b> , 923-928.	14
146 Gardner, J.M. et Hynes, R.O. (1985) <i>Cell</i> <b>42</b> , 439-448.	28
147 Gartner, T.K. et Bennett, J.S. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 11891-11894.	25
148 Giacotti, F.G., Comoglio, P.M. et Tarone, G. (1986) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>163</b> , 47-62.	28
149 Giacotti, F.G., Tarone, G., Kundsen, K., Damsky, C.H. et Comoglio, P.M. (1985) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>156</b> , 182-190.	28
150 Gilbert, W. (1978) <i>Nature</i> <b>271</b> , 501.	45
151 Ginsberg, M.H., Painter, R.G., Birdwell, C., Plow, E.F. et Forsyth, J. (1979) <i>J. Supramol. Struct.</i> <b>11</b> , 167-174.	55
152 Ginsberg, M.H., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. et Plow, E. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 3931-3936.	25
153 Glass II, W.F., Briggs, R.C. et Hnilica, L.S. (1981) <i>Anal. Biochem.</i> <b>115</b> , 219-224.	131
154 Glick, M.C., Rabinowitz, S. et Sachs, L. (1974) <i>J.</i> <i>Virol.</i> <b>13</b> , 967-974.	71
155 Gold, L.I., Frangione, B. et Pearlstein, E. (1983) <i>Biochemistry</i> <b>22</b> , 4113-4119.	14,30,38
156 Gold, L.I., Garcia-Pardo, A., Frangione, B., Franklin, E.C. et Pearlstein, E. (1979) <i>Proc. Natl.</i> <i>Acad. Sci. USA</i> <b>76</b> , 4803-4807.	23
157 Gold, L.I. et Pearlstein, E. (1980) <i>Biochem. J.</i> <b>186</b> , 551-559.	52
158 Grilchrest, B.A., Calhoun, J.K. et Maciag, T. (1982) <i>J. Cell Physiol.</i> <b>112</b> , 197-206.	56
159 Grinnell, F. (1980) <i>J. Cell Biol.</i> <b>86</b> , 104-112.	57

Références	Pages
160 Grinnell, F. (1983) in "Growth and Maturation Factors", Guroff, G. ed., John Wiley and Sons, New York, 267-292.	6,50
161 Grinnell, F. (1983) in "Growth and Maturation Factors", Guroff, G. ed., John Wiley and Sons, New York, 454-486.	56
162 Grinnell, F. et Feld, M.K. (1979) Cell 17, 117-129.	53
163 Grinnell, F., Feld, M.K. et Minter, D. (1980) Cell 19, 517-525.	56
164 Grinnell, F., Feld, M.K. et Snell, W. (1979) Cell Biol. Int. Rep. 3, 585.	55
165 Grinnell, F. et Minter, D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4408-4412.	24,52
166 Grinnell, F. et Phan, T.V. (1986) Thromb. Res. 41, 89-98.	55
167 Gudewicz, P.W., Molnar, J., Lai, M.Z., Beezhold, D.W., Siefiring, G.E., Credo, R.B. et Lorand, L. (1980) J. Cell Biol. 87, 427-433.	57,58
168 Gutman, A., Yamada, K.M. et Kornblihtt, A. (1986) FEBS Lett. 207, 145-148.	49
169 Haas, R. et Culp, L.A. (1984) FEBS Lett. 174, 279-283.	24
170 Hahn, E., Wick, G., Pencer, D. et Timpl, R. (1982) Gut. 21, 63-71.	23
171 Hahn, E. et Yamada, K.M. (1979) Cell 18, 1043-1051.	24
172 Hakansson, L. et Venge, P. (1985) J. Immunol. 135, 2735-2739.	54,56
173 Hakomori, S.I. et Murakami, W.T. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 254-261.	60
174 Hannan, G.N., Redmond, J.W. et Mc Auslan, B.R. (1984) Biochim. Biophys. Acta 801, 396-402.	40
175 Hansen, M.S. et Clemmensen, I. (1982) Biochem. J. 201, 629-633.	55
176 Hard, G.C., Clarke, F.M. et Toh, B.H. (1980) Cancer Res. 40, 3728-3734.	60
177 Harrisson, F., Vanroelen, C. et Vahaet, L. (1985) Cell Tissue Res. 241, 391-397.	55

Références	Pages
178 Haverstick, D.M., Cowan, J.F., Yamada, K.M. et Santoro, S.A. (1985) <i>Blood</i> <b>66</b> , 946-952.	25
179 Hayashi, M., Schlesinger, D.H., Kennedy, D.W. et Yamada, K.M. (1980) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>255</b> , 10017-10020.	30
180 Hayashi, M. et Yamada, K.M. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>256</b> , 1292-1300.	30
181 Hayashi, M. et Yamada, K.M. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 5263-5267.	30,32
182 Hayashi, M. et Yamada, K.M. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 3327-3331.	30
183 Hayashi, M. et Yamada, K.M. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 3332-3340.	20,24,32,47
184 Hayman, E.G., Engvall, E. et Ruoslahti, E. (1980) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>127</b> , 478-481.	62
185 Hayman, E.G., Engvall, E. et Ruoslahti, E. (1981) <i>J. Cell Biol.</i> <b>88</b> , 352-357.	62
186 Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., Ohgren, Y. et Ruoslahti, E. (1983) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>80</b> , 46-50.	53
187 Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1985) <i>J. Cell Biol.</i> <b>100</b> , 1948-1954.	28
188 Hedman, K., Kurkinen, M., Alitalo, K., Vaheri, A., Johansson, S. et Höök, M. (1979) <i>J. Cell Biol.</i> <b>81</b> , 83-91.	22
189 Hedman, K., Johansson, S., Vartio, T., Kjellen, L., Vaheri, A. et Höök, M. (1982) <i>Cell</i> <b>28</b> , 663-671.	22
190 Heggeness, M.H., Ash, J.F. et Singer, S.J. (1978) <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> <b>312</b> , 414-417.	53
191 Henderson, M. et Kessel, D. (1977) <i>Cancer</i> <b>39</b> , 1129-1134.	87
192 Hesford, J.F., Berger, E.G. et Van Halbeek, H. (1984) <i>Glycoconjugate J.</i> <b>1</b> , 141-153.	85
193 Hill, H.R., Shigeaka, A.O., Augustine, N.H., Pritchard, D., Lundblad, J.L. et Schwartz, R.S. (1984) <i>J. Exp. Med.</i> <b>159</b> , 1618-1628.	57
194 Hirano, H., Yamada, Y., Sullivan, M., De Crombrughe, B., Pastan, I. et Yamada, K.M. (1983) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>80</b> , 46-50.	45,46
195 Hirst, R., Horwitz, A., Buck, C. et Rohrschneider, L. (1986) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>83</b> , 6470-6474.	64

Références	Pages
196 Hogg, N.M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>71</b> , 489-492.	13
197 Homandberg, G.A. et Erickson, J.W. (1986) Biochemistry <b>25</b> , 6917-6925.	13
198 Höök, M., Rubin, K., Oldberg, A., Öbrink, B. et Vaheri, A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. <b>79</b> , 726-733.	53
199 Hörmann, H. (1982) Klin. Wochenschr. <b>60</b> , 1265-1277.	6,50
200 Hörmann, H. (1985) Blut <b>51</b> , 307-314.	57
201 Hörmann, H. et Jelinic, V. (1981) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. <b>362</b> , 87-94.	31
202 Hörmann, H. et Richter, H. (1986) Biopolymers <b>25</b> , 945-958.	22
203 Hörmann, H. et Seidl, M. (1980) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. <b>361</b> , 1449-1452.	32
204 Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C. et Burridge, K. (1986) Nature <b>320</b> , 531-533.	28,53
205 Horwitz, A., Duggan, K., Greggs, R., Decker, C. et Buck, C. (1985) J. Cell Biol. <b>101</b> , 2134-2144.	28
206 Hovemann, B., Galler, R., Walldorf, U., Kupper, H. et Bautz, E.K.F. (1982) Nucleic Acids Res. <b>9</b> , 4721-4731.	27
207 Hudgin, .L. et Schachter, H. (1972) Can. J. Biochem. <b>50</b> , 1024-1028.	85
208 Hugues, R.C., Pena, S.D.J., Clark, J. et Dourmashkin, R.R. (1979) Exp. Cell Res. <b>121</b> , 307-314.	53
209 Humphries, M.J., Matsumoto, K., White, S.L. et Olden, K. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>83</b> , 1752-1756.	72
210 Humphries, M.J., Olden, K. et Yamada, K.M. (1986) Science <b>233</b> , 467-470.	66
211 Hung, M.C. et Wensink, P.C. (1981) Nucleic Acids Res. <b>9</b> , 6407-6416.	27
212 Hynes, R.O. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>70</b> , 3170-3174.	5,60
213 Hynes, R.O. (1981) in "Cell Biology of the Extracellular Matrix", Hay, E.D. ed., Plenum Publishing Corp., New York, 295-334.	6

Références	Pages
214 Hynes, R.O., Ali, I.U., Destree, A.T., Mautner, V., Perkins, M.E., Singer, D.R., Wagner, D.D. et Smith, K.K. (1978) <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> <b>312</b> , 317-342.	55,62
215 Hynes, R.O. et Destree, A.T. (1977) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>74</b> , 2855-2859.	13,22
216 Hynes, R.O. et Destree, A.T. (1978) <i>Cell</i> <b>15</b> , 875-886.	53
217 Hynes, R.O., Martin, G.S., Critchley, D.R., Schearer, M. et Epstein, C.J. (1976) <i>Dev. Biol.</i> <b>48</b> , 35-46.	60
218 Hynes, R.O. et Wyke, J.A. (1975) <i>Virology</i> <b>64</b> , 492-504.	62
219 Hynes, R.O. et Yamada, K.M. (1982) <i>J. Cell Biol.</i> <b>95</b> , 369-377.	6,48
220 Ip, C. et Dao, T.L. (1978) <i>Cancer Res.</i> <b>38</b> , 723-728.	87
221 Irimura, T., Gonzalez, R. et Nicolson, G.L. (1981) <i>Cancer Res.</i> <b>41</b> , 3411-3418.	72
222 Isemura, M., Kan, M., Yamaguchi, Y., Munakata, H., Aikama, J., Yamane, J. et Yosizawa, Z. (1984) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>799</b> , 276-281.	40
223 Isemura, M., Yamaguchi, Y., Munakata, H., Aikawa, J., Kan, M., Yamane, I. et Yosizawa, Z. (1984) <i>J. Biochem.</i> <b>96</b> , 163-169.	31,38
224 Itaya, K. et Hakomori, S.I. (1976) <i>FEBS Lett.</i> <b>66</b> , 65-69.	60
225 Iwanaga, S., Suzuki, K. et Hashimoto, S. (1978) <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> <b>408</b> , 583-594.	31
226 Iwata, M. et Nakato, F. (1981) <i>Wilhelm. Roux's Arch.</i> <b>196</b> , 83-86.	7
227 Jarstrand, C., Ahlgren, T. et Berghem, L. (1982) <i>J. Clin. Lab. Immunol.</i> <b>8</b> , 59-63.	54,57
228 Jhanwar, S.C., Jensen, J.T., Kaelbling, M., Chaganti, R.S.K. et Klinger, H.P. (1986) <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> <b>41</b> , 47-53.	45
229 Jilek, F. et Hörmann, H. (1978) <i>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> <b>359</b> , 247-250.	22,24
230 Jilek, F. et Hörmann, H. (1979) <i>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> <b>360</b> , 597-603.	29,31,52
231 Johansson, S. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 1557-1561.	28

Références	Pages
232 Johansson, S. et Höök, M. (1984) <i>J. Cell Biol.</i> <b>98</b> , 810-817.	52
233 Johansson, S., Kjellen, L., Höök, M. et Timpl, R. (1981) <i>J. Cell Biol.</i> <b>90</b> , 260-264.	52
234 Jones, G.E., Arumugham, R.G. et Tanzer, M.L. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>103</b> , 1663-1670.	123,161,162
235 Joziassse, D.H., Schiphorst, W.E.C.M., Van den Eijnden, D.H., Van Halbeek, H., et Vliegenthart, J.F.G. (1983) in "Proc. VIIth Intern. Symp. Glycoconjugates, Lund-Roneby 18-23 juillet, 737-738.	86
236 Joziassse, D.H., Schiphorst, W.E.C.M., Van den Eijnden, D.H., Van Kuik, J.A., Van Halbeek, H. et Vliegenthart, J.F.G. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 714-719.	86
237 Kamikowski, G.W., Mosher, D.F., Lorand, L. et Ferry, J.D. (1981) <i>Biophys. Chem.</i> <b>13</b> , 25-28.	31
238 Katow, H., Yamada, K.M. et Solursh, M. (1982) <i>Differentiation</i> <b>22</b> , 120-124.	7
239 Kennedy, D.W., Rohrabach, D.H., Martin, G.R., Momoï, T. et Yamada, K.M. (1983) <i>J. Cell Physiol.</i> <b>114</b> , 257-262.	52
240 Kerbel, R.S., Dennis, J.W., Lagarde, A.F. et Frost, P. (1982) <i>Cancer Metastasis Rev.</i> <b>1</b> , 99-140.	72
241 Keski-Oja, J., Gahmberg, C.G. et Alitalo, K. (1982) <i>Cancer Res.</i> <b>42</b> , 1147-1153.	65
242 Keski-Oja, J., Mosher, D.F. et Vaheri, A. (1976) <i>Cell</i> <b>9</b> , 29-35.	22
243 Keski-Oja, J., Sen, A. et Todaro, G.J. (1980) <i>J. Cell Biol.</i> <b>85</b> , 527-533.	22
244 Keski-Oja, J. et Yamada, K.M. (1981) <i>Biochem. J.</i> <b>193</b> , 615-620.	22
245 Kessel, D. et Allen, J. (1975) <i>Cancer Res.</i> <b>35</b> , 670-672.	87
246 Kessel, D., Sykes, E. et Henderson, M. (1977) <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> <b>59</b> , 29-32.	87
247 Khan, P. et Shin, S.I. (1979) <i>J. Cell Biol.</i> <b>82</b> , 1-16.	65
248 Kishore, G.S., Budnick, R.N. et Dao, T.L. (1985) <i>Biochem. Med.</i> <b>33</b> , 1-7.	86



Références	Pages
249 Kistler, W.S., Noyes, C., Hsu, R. et Heinrikson, R.L. (1975) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>250</b> , 1847-1853.	27
250 Kitagaki, H., Matsumoto, I., Seno, N. et Nagase, S. (1986) <i>J. Biochem.</i> <b>99</b> , 453-458.	69
251 Klebe, R.J. (1974) <i>Nature</i> <b>250</b> , 248-251.	24
252 Kleinman, H.K., Hewitt, A.T., Murray, J.C., Liotta, L.A., Rennard, S.I., Pennyparker, J.P., Mc Goodwin, E.B., Martin, G.R. et Fishman, P.H. (1979) <i>J. Supramol. Struct.</i> <b>11</b> , 69-78.	52
253 Kleinman, H.K., Klebe, R.J. et Martin, G.R. (1981) <i>J. Cell Biol.</i> <b>88</b> , 473-485.	6,56
254 Kleinman, H.K., Mc Goodwin, E.B., Martin, G.R., Klebe, R.J., Fietzek, P.P. et Wooley, D.E. (1978) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>253</b> , 5642-5646.	24
255 Kleinman, H.K., Martin, G.R. et Fishman, P.H. (1979) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>76</b> , 3367-3371.	29
256 Klohs, W.D., Bernacki, R.J. et Korytnyk, W. (1979) <i>Cancer Res.</i> <b>39</b> , 1231-1235.	87
257 Knowles, B.B., Howe, C.C. et Aden, D.P. (1980) <i>Science</i> <b>209</b> , 497-499.	123
258 Knox, P., Crooks, S. et Rimmer, C.S. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>102</b> , 2318-2323.	56
259 Knox, P. et Griffiths, S. (1982) <i>J. Cell Biol.</i> <b>55</b> , 301-316.	61
260 Knox, P., Griffiths, S. et Wells, P. (1982) in "The Extracellular Matrix", Howkes, S.P. et Wang, J.L., eds, Acad. Press, New York, 103-107.	30,31
261 Knox, P. et Wells, P. (1979) <i>J. Cell Sci.</i> <b>40</b> , 77-88.	30,31
262 Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F.E. (1983) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>80</b> , 3218-3222.	47
263 Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F.E. (1984) <i>Nucleic Acid Res.</i> <b>12</b> , 5853-5868.	33,47
264 Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F.E. (1984) <i>EMBO J.</i> <b>3</b> , 221-226.	35,36
265 Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F.E. (1984) <i>EMBO J.</i> <b>3</b> , 2511-2516.	36
266 Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F.E. (1985) <i>EMBO J.</i> <b>4</b> , 1755-1759.	14

Références	Pages
267 Koteliansky, V.E., Glukhova, M.A., Morozkin, A.D., Musatov, A.P. et Shirinsky, V.P. (1981) FEBS Lett. <b>133</b> , 31-35.	22,23
268 Kotelianski, V.E., Leytin, V.L., Sviridov, D.D., Repin, V.S. et Smirnov, V.N. (1981) FEBS Lett. <b>123</b> , 59-63.	55
269 Koteliansky, V.E., Gneushev, H.N., Glukhova, M.A., Shartava, A.S. et Smirnov, V.N. (1982) FEBS Lett. <b>143</b> , 168-170.	22
270 Kramer, R.H., Gonzalez, R. et Nicolson, G.L. (1980) Int. J. Cancer <b>26</b> , 639-645.	66
271 Krotoski, D.M., Domingo, C. et Bronmer-Fraiser M. (1986) J. Cell Biol. <b>103</b> , 1061-1071.	28,55
272 Krusius, T., Fukuda, M., Dell, A. et Ruoslahti, E. (1985) J. Biol. Chem. <b>260</b> , 4110-4116.	8,38,40,41 42
273 Kurkinen, M., Vartio, T. et Vaheri, A. (1980) Biochim. Biophys. Acta <b>624</b> , 490-498.	32
274 Kuusela, P. (1978) Nature <b>276</b> , 718-720.	23,57
275 Kuusela, P., Ruoslahti, E., Engvall, E. et Vaheri, A. (1976) Immunochemistry <b>13</b> , 639-642.	5
276 Kuusela, P., Vaheri, A., Palo, J. et Ruoslahti, E. (1978) Lab. Clin. Med. <b>92</b> , 595-601.	8
277 Labat-Robert, J., Birembaut, P., Robert, L. et Adnet, J.J. (1981) Diag. Histopath. <b>4</b> , 125-134.	65
278 Labat-Robert, J., Potazman, J.P., Derouette, J.C. et Robert, L. (1981) Cell Biol. Int. Rep. <b>5</b> , 969-973.	8
279 Labat-Robert, J., Robert, L., Auger, C. Lethias, C et Garrone, R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>78</b> , 6261-6265.	7
280 Laemmli, U.K. (1970) Nature <b>227</b> , 680-685.	130
281 Laemmli, U.K. et Favre, M. (1973) J. Mol. Biol. <b>80</b> , 575-599.	130
282 Lahav, J., Schwartz, M.A. et Hynes, R.O. (1982) Cell <b>31</b> , 253-262.	32
283 Lai, C.S., Tooney, N.M. et Ankel, E.G. (1984) Biochemistry <b>23</b> , 6393-6397.	10

Références	Pages
284 Lakowski, M.J., Kato, I., Kohr, W.J., March, C.J. et Bogard, W.C. (1980) in "Protides of the Biological Fluids", Peeters, S. ed., Pergamon Press, New York, 123-128.	45
285 Lammers, G. et Jameson, J.C. (1986) <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> <b>84B</b> , 181-187.	82,87
286 Lause, D.B., Beezhold, D.H. et Doran, J.E. (1984) <i>J. Immunol.</i> <b>132</b> , 1294-1299.	59
287 Lazarides, E. et Burridge, K. (1975) <i>Cell</i> <b>6</b> , 289-298.	28
288 Ledger, P.W., Nishimoto, S.K., Hayashi, S. et Tanzer, M.L. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 547-554.	43
289 Lee, Y.C. et Scocca, J.R. (1972) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>247</b> , 5753-5758.	127
290 Lefèvre, A., Mazurier, C. et Goudemand, M. (1983) <i>Rev. Fr. Trans. Immuno-Hemat.</i> <b>26</b> , 135-145.	8
291 Levinton, A., Opperman, H., Levinton, L., Varmus, H. et Bishop, J. (1978) <i>Cell</i> <b>15</b> , 561-572.	63
292 Linder, E., Stenman, S., Lehto, V.P. et Vaheri, A. (1978) <i>Ann. N.Y. Acad. Sci.</i> <b>312</b> , 151-159.	65
293 Loring, J., Glimelius, B. et Weston, J.A. (1982) <i>Dev. Biol.</i> <b>90</b> , 165-174.	59
294 Lundblad, R.L., Fenton, J.W. et Mann, K.G. eds. (1977) "Chemistry and Biology of Thrombin", Ann. Arbor. Science, Ann. Arbor, MI.	27
295 Macarak, E.J. et Howard, P.S. (1983) <i>J. Cell Physiol.</i> <b>116</b> , 76-86.	56
296 Maciag, T., Hoover, G.A., Steinerman, M.B. et Weinstein, E. (1981) <i>J. Cell Biol.</i> <b>91</b> , 420-426.	56
297 Magallon, T., Delannoy, P. et Montreuil, J. (1988) <i>Glycoconjugate J.</i> , soumis à publication.	38,39,40,146 149
298 Mahadavi, V. et Hynes, R.O. (1979) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>583</b> , 167-178.	62
299 Marciani, D.J., Lyons, L.B. et Thompson, E.P. (1976) <i>Cancer Res.</i> <b>36</b> , 2937-2944.	60
300 Marino, J.A., Pensky, J., Culp, L.A. et Spagnolo, P.J. (1985) <i>J. Lab. Clin. Med.</i> <b>105</b> , 725-730.	54,56
301 Marquette, D., Molnar, J., Yamada, K.M., Schlessinger, D., Darby, S. et Van Alten, P. (1981) <i>Mol. Cell Biochem.</i> <b>36</b> , 147-155.	58

Références	Pages
303 Matyas, G.R., Evers, D.C., Radinsky, R. et Morré, D.J. (1986) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>162</b> , 296-318.	29
304 Maxe, I., Ryden, C., Wadstrom, T. et Rubin, K. (1986) <i>Infect. Immun.</i> <b>54</b> , 695-704.	57
305 Mayer, B.W., Hay, E.D. et Hynes, R.O. (1981) <i>Dev. Biol.</i> <b>82</b> , 267-286.	55
306 Mc Carthy, J.B. et Furcht, L.T. (1984) <i>J. Cell Biol.</i> <b>98</b> , 1474-1480.	54
307 Mc Carthy, J.B., Hagen, S.T. et Furcht, L.T. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>102</b> , 179-188.	29
308 Mc Donald, J.A. et Kelley, D.G. (1980) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>255</b> , 8848-8858.	24
309 Mc Donald, J.A., Kelley, D.G. et Broekelmann, T.J. (1982) <i>J. Cell Biol.</i> <b>92</b> , 485-492.	22
310 Mc Donald, J.A., Quade, B.J., Broekelmann, T.J., La Chance, R., Forsman, K., Hasegawa, E. et Akiyama, S. (1987) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>262</b> , 2957-2967.	22
311 Mc Keown-Longo, P.J. et Mosher, D.F. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>259</b> , 12210-12215.	13,22
312 Mc Keown-Longo, P.J. et Mosher, D.F. (1985) <i>J. Cell Biol.</i> <b>100</b> , 364-374.	22
313 Meezan, E., Wu, H., Black, P. et Robbins, P.W. (1969) <i>Biochemistry</i> <b>9</b> , 4567-4576.	60
314 Mensing, H., Albani, A., Krieg, T., Pontz, B.F. et Muller, P.K. (1984) <i>Int. J. Cancer</i> <b>33</b> , 43-48.	54
315 Miller, E.J. (1984) in "Extracellular Matrix Biochemistry", Piez, K.A. et Reddi, A.H. eds., <i>Elvesier, New York</i> , 41-81.	27
316 Mizoguchi, A., Takasaki, S. et Kobata, A. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>259</b> , 11949-11957.	55
317 Molnar, J., Froelich, J. et Rouin, B. (1981) <i>J. Supramol. Struct. Suppl.</i> <b>5</b> , 310.	23
318 Molnar, J., Gelder, F.B., Lai, M.Z., Sieftring, G.E., Credo, R.B. et Lorand, L. (1979) <i>Biochemistry</i> <b>18</b> , 3909-3916.	57
319 Montreuil, J. (1984) in "Comprehensive Biochemistry, Vol 19B, part II", Neuberger, A. et Van Deenen, L.L.M. eds., <i>Elvesier, Amsterdam</i> , 1-188.	40,122,164
320 Montreuil, J. (1984) <i>Pure &amp; Appl. Chem.</i> <b>56</b> , 859-877.	40,122,164

- 321 Montreuil, J., Debray, H., Debeire, P. et Delannoy, P. (1983) in "Structural Carbohydrates in the Liver", Popper, M., Reutter, W., Köttgen, E. et Gudat, F. eds., MTP Press, Boston, 239-258. 72,73,164
- 322 Morissey, J.H. (1981) *Anal. Biochem.* **117**, 307-310. 131
- 323 Morisson, P., Edsall, R. et Miller, E.G. (1948) *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3103-3108. 5
- 324 Mosesson, M.W. et Amrani, D.L. (1980) *Blood* **56**, 145-158. 8
- 325 Mosesson, M.W., Chen, A.B. et Huseby, R.M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **386**, 509-524. 11,14
- 326 Mosesson M.W. et Umfleet, R.A. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 5728-5736. 11
- 327 Mosher, D.F. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 6614-6621. 22,31
- 328 Mosher, D.F. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 1639-1645. 31
- 329 Mosher, D.F. (1984) *Ann. Rev. Med.* **35**, 561-575. 6
- 330 Mosher, D.F. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* **58**, 63-68. 22,24
- 331 Mosher, D.F. et Johnson, R.B. (1983) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **408**, 583-594. 31
- 332 Mosher, D.F. et Proctor, R.A. (1980) *Science* **209**, 927-929. 23,57
- 333 Mosher, D.F., Schad, P.E. et Vann, J.M. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1181-1188. 22,24,56
- 334 Munro, J.R., Narashiman, S., Wetmore, S., Riordan, J.R. et Schachter, H. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 269-277. 85
- 335 Muramatsu, T., Ogata, M. et Koide, N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **444**, 53-68. 72
- 336 Murayama, K., Nichols, E.J., Levery, S.B., Carter, W.G. et Hakomori, S.I. (1984) *Glycoconjugate J.* **1**, 155-169. 38,39,40,41  
82,122,164
- 337 Mutschler, J.L. (1986) *FEBS Lett.* **201**, 210-214. 38
- 338 Nataly, P.G., Galloway, D., Nicotra, M.R. et De Martino, C. (1981) *Connect. Tissue Res.* **8**, 199-204. 7
- 339 Neri, A., Ruoslahti, E. et Nicolson, G.L. (1981) *Cancer Res.* **41**, 5082-5095. 65

Références	Pages
340 Nichols, E.J., Fenderson, B.A., Carter, W.G. et Hakomori, S.I. (1986) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>261</b> , 11295-11301.	162
341 Nicollet, I., Lebreton, J.P., Fontaine, H. et Hiron, M. (1981) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>668</b> , 235-245.	129
342 Nicolson, G.L. (1982) <i>J. Histochem. Cytochem.</i> <b>30</b> , 214-220.	66,67,68
343 Nielson, S.E. et Puck, T.T. (1980) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>77</b> , 985-989.	62
344 Niewiarowska, J., Cierniewski, C.S. et Tuszinski, G.P. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>259</b> , 6181-6187.	28,53
345 Norris, D.A., Clark, R.A.F., Swigart, L.M., Huff, J.C., Weston, W.L. et Howell, S.E. (1982) <i>J. Immunol.</i> <b>129</b> , 1612-1618.	54,56
346 Ogamo, A., Nagai, A. et Nagasawa, K. (1985) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>841</b> , 30-41.	30
347 Ogata, S.J., Muramatsu, T. et Kobata, A. (1976) <i>Nature</i> <b>259</b> , 580-582.	72,164
348 Oh, E., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1981) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>92</b> , 485-492.	22
349 O'Keefe, E., Woodley, D., Castillo, G., Russel, N. et Payne, R.E. (1984) <i>J. Invest. Dermatol.</i> <b>82</b> , 150-155.	62
350 Oldberg, A., Franzen, A. et Heinegård, D. (1986) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>83</b> , 8819-8823.	27
351 Oldberg, A. et Ruoslahti, E. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 4859-4863.	30,31
352 Olden, K., Pratt, R.M. et Yamada, K.M. (1979) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>76</b> , 3343-3347.	43,123
353 Olden, K. et Yamada, K.M. (1977) <i>Cell</i> <b>11</b> , 957-969.	49,62
354 Olson, M.O.J., Nagabhushan, N., Dzwiniel, M., Smillie, L.B. et Witaker, D.R. (1970) <i>Nature</i> <b>228</b> , 438-442.	27
355 Oppenheimer-Marks, N., Border, B. et Grinnell, F. (1984) <i>Cell Biol. Int. Rep.</i> <b>8</b> , 171-178.	64
356 Oppenheimer-Marks, N. et Grinnell, F. (1984) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>152</b> , 467-475.	28
357 Österlund, E., Eronen, I., Österlund, K. et Vuento, M. (1985) <i>Biochemistry</i> <b>24</b> , 2661-2667.	13

Références	Pages
358 Ouaissi, M.A., Cornette, J. et Capron, A. (1986) Mol. Biochem. Parasitol. <b>19</b> , 201-211.	57
359 Pande, H., Calaycay, J., Hawke, D., Ben-Avram, C.M. et Shively, J.E. (1985) J. Biol. Chem. <b>260</b> , 2301-2306.	14,38
360 Paraskeva, C. et Gallimore, P.H. (1980) Int. J. Cancer <b>25</b> , 631-639.	60
361 Pardee, A. (1975) Biochim. Biophys. Acta <b>417</b> , 153-171.	59
362 Parsons, R.G., Todd, H.D. et Kowal, R. (1979) Cancer Res. <b>39</b> , 103-128.	68
363 Patel, V.P. et Lodish, H.F. (1986) J. Cell Biol. <b>102</b> , 449-456.	28
364 Paul, J.I. et Hynes, R.O. (1984) J. Biol. Chem. <b>259</b> , 13477-13487.	36,38
365 Paulson, J.C., Beranck, W.E. et Hill, R.L. (1977) J. Biol. Chem. <b>252</b> , 2356-2362.	85
366 Paulson, J.C., Prieels, J.P., Glasgow, L.R. et Hill, R.L. (1978) J. Biol. Chem. <b>253</b> , 5617-5624.	85
367 Paulson, J.C., Rearick, J.I. et Hill, R.L. (1977) J. Biol. Chem. <b>252</b> , 2363-2371.	85
368 Pearlstein, E. (1976) Nature <b>262</b> , 497-499.	52
369 Pearlstein, E., Gold, L.I. et Garcia-Pardo, A. (1980) Mol. Cell Biochem. <b>29</b> , 103-128.	7
370 Pearlstein, E., Hynes, R.O., Franks, L.M. et Hemming, V.L. (1976) Cancer Res. <b>36</b> , 1475-1480.	60
371 Pearlstein, E. et Waterfields, M.D. (1974) Biochim. Biophys. Acta <b>362</b> , 1-12.	5
372 Pennyparker, J.P., Hassel, J.R., Yamada, K.M. et Pratt, R.M. (1979) Exp. Cell Res. <b>121</b> , 411-415.	58
373 Petersen, T.E., Thøgersen, H.C., Skorstengaard, K., Vibe-Pedersen, K., Sahl, P., Sottrup-Jensen, L. et Magnusson, S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>80</b> , 137-141.	14,20,23,35 45
374 Pierschbacher, M.D., Hayman, E.G., et Ruoslahti, E. (1981) Cell <b>26</b> , 259-267.	24
375 Pierschbacher, M.D., Hayman, E.G., et Ruoslahti, E. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <b>80</b> , 1224-1227.	25,29

Références	Pages
376 Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1984) <i>Nature</i> <b>309</b> , 30-33.	25
377 Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>81</b> , 5985-5988.	25
378 Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., Sandelin, J., Lind, P. et Peterson, P.A. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 9593-9597.	25,26
379 Plow, .F. et Ginsberg, M.H. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 9593-9597.	55
380 Plow, E.F., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., Marguerie, G.A. et Ginsberg, M.H. (1985) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>82</b> , 8057-8061.	25
381 Plummer, T.H., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W. et Tarentino, A.L. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>259</b> , 10700-10704.	156
382 Podleski, T.R., Greenberg, I., Schlessinger, J. et Yamada, K.M. (1979) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>123</b> , 104-126.	58
383 Pommier, C.G., Inada, S., Fries, L.F., Takahashi, T., Frank, M.M. et Brown, E.J. (1983) <i>J. Exp. Med.</i> <b>157</b> , 1844-1854.	58
384 Poole, S., Furtel, R.A., Lamar, E. et Rowekamp, W. (1981) <i>J. Mol. Biol.</i> <b>153</b> , 273-289.	27
385 Pouyssegur, J., Willingham, M. et Pastan, I. (1977) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>74</b> , 243-247.	54
386 Pratt, T. et Herblom, A.P. (1984) <i>Cancer Res.</i> <b>44</b> , 1148-1152.	86
387 Proctor, R.A., Hamill, R.J., Mosher, D.F., Textor, J.A., Olbrantz, P.J. (1983) <i>J. Antimicrob. Chemother.</i> <b>12</b> , 85-95.	57
388 Proctor, R.A., Mosher, D.F. et Olbrantz, P.J. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 14788-14794.	57
389 Proctor, R.A., Prendergast, E. et Mosher, D.F. (1982) <i>Blood</i> <b>59</b> , 681-687.	23,57
390 Proctor, R.A., Textor, J.A., Vann, J.M. et Mosher, D.F. (1985) <i>Infect. Immun.</i> <b>47</b> , 629-637.	57
391 Prowse, K.R., Tricoli, J.V., Klebe, R.J. et Shows, T.B. (1986) <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> <b>41</b> , 42-46.	45
392 Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ginsberg, M.H., Plow, E.F. et Ruoslahti, E. (1986) <i>Science</i> <b>231</b> , 1559-1562.	28



Références	Pages
393 Pytela, R., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1985) <i>Cell</i> <b>40</b> , 191-198.	28
394 Raghov, R., Gossage, D. et Kang, A.H. (1986) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>261</b> , 4677-4684.	49
395 Repesh, L.A., Furcht, L.T. et Smith, D. (1981) <i>J. Histochem. Cytochem.</i> <b>29</b> , 937-945.	7
396 Rice, C.M. et Strauss, J.H. (1981) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>78</b> , 2062-2066.	27
397 Rich, A.H., Pearlstein, E., Weissmann, G. et Hoffstein, S.T. (1981) <i>Nature</i> <b>193</b> , 224-226.	30,31
398 Richter, H. et Hörmann, H. (1982) <i>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> <b>363</b> , 351-364.	20,32,47
399 Richter, H., Seidl, M. et Hörmann, H. (1981) <i>Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> <b>362</b> , 399-408.	30
400 Richter, H., Wendt, C. et Hörmann, H. (1985) <i>Biol. Chem. Hoppe Seyler</i> <b>366</b> , 509-514.	29
401 Rieber, M. et Rieber, M.S. (1980) <i>Cancer Res.</i> <b>40</b> , 2562-2567.	60
402 Robbins, P.M., Wicku, G.G., Branton, P.E., Gaffney, B.J., Hirschberg, C.B., Fuchs, P. et Blumberg, P.M. (1974) <i>Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.</i> <b>39</b> , 1173-1180.	5
403 Rocco, M., Aresu, O. et Zardi, L. (1984) <i>FEBS Lett.</i> <b>178</b> , 327-330.	10
404 Rocco, M., Carson, M., Hantgan, R., Mc Donagh, J. et Hermans, J. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 14545-14549.	10,11
405 Ronquist, G. et Nou, E. (1983) <i>Cancer</i> <b>52</b> , 1679-1683.	87
406 Ronquist, G., Rinsten, A., Blanche, C., Cerven, E., Hiesche, C. et Westman, M. (1982) <i>Arch. Chir. Scand.</i> <b>148</b> , 373-377.	87
407 Ronquist, G., Rinsten, A., Westman, M. et Cerven, E. (1980) <i>Acta Chir. Scand.</i> <b>146</b> , 247-252.	87
408 Rossowski, W. et Sahai-Srivastava, B.I. (1983) <i>Eur. J. Cancer Clin. Oncol.</i> <b>19</b> , 1431-1437.	86
409 Rourke, F.J., Blumenstock, F.A. et Kaplan, J.E. (1984) <i>J. Immunol.</i> <b>132</b> , 1931-1936.	57
410 Rovasio, R.A., Delouvee, A., Yamada, K.M., Timpl, R. et Thiéry, J.P. (1983) <i>J. Cell Biol.</i> <b>96</b> , 462-473.	59

Références	Pages
411 Rovin, B., Molnar, J., Chevalier, D. et Ng, P. (1984) <i>J. Leukocyte Biol.</i> <b>36</b> , 601-620.	57
412 Rowlands, D.J., Clarke, B.E., Carroll, A.R., Brown, F., Nicholson, B.H., Bittle, J.L., Houghten, R.A. et Lerner, R.A. (1983) <i>Nature</i> <b>306</b> , 694-697.	27
413 Rubin, K., Höök, M., Öbrink, B. et Timpl, R. (1981) <i>Cell</i> <b>24</b> , 463-470.	52
414 Ruoslahti, E. (1984) <i>Cancer Metast. Rev.</i> <b>3</b> , 43-51.	61
415 Ruoslahti, E. et Engvall, E. (1980) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>631</b> , 350-358.	31
416 Ruoslahti, E., Engvall, E., Hayman, E.G. et Spiro, R.G. (1981) <i>Biochem. J.</i> <b>193</b> , 295-299.	38
417 Ruoslahti, E. et Hayman, E.G. (1980) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>631</b> , 350-358.	24,52
418 Ruoslahti, E., Hayman, E.G., Engvall, E., Cathram, W.C. et Butler, W.T. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>256</b> , 7277-7281.	30
419 Ruoslahti, E., Hayman, E.G., Kuusela, P., Shively, J.E. et Engvall, E. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 6054-6059.	23
420 Ruoslahti, E., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D. et Engvall, E. (1982) <i>Methods Enzymol.</i> <b>82</b> , 803-831.	6
421 Ruoslahti, E. et Vaheri, A. (1975) <i>J. Exp. Med.</i> <b>141</b> , 497-501.	5
422 Ryden, C., Rubin, K., Speziale, P., Höök, M., Lindberg, M. et Wadström, T. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 3396-3401.	57
423 Saat, Y., Krishnaraj, R. et Kemp, R. (1981) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>678</b> , 213-220.	86
424 Saba, T.M., Gregory, T.J. et Blömenstock, F.A. (1980) <i>Br. J. Cancer</i> <b>41</b> , 956-965.	68
425 Saba, T.M. et Jaffe, E. (1980) <i>Am. J. Med.</i> <b>68</b> , 577-594.	6,58
426 Sasaki, M., Barber, S. et Ceriani, R.L. (1985) <i>Breast Cancer Res. Treat.</i> <b>5</b> , 51-56.	87
427 Sato, T.N. et Hayashi, M. (1986) <i>J. Biochem.</i> <b>99</b> , 653-661.	8
428 Schor, S.L. et Court, J. (1979) <i>J. Cell Sci.</i> <b>38</b> , 267-281.	52

Références	Pages
429 Schwartz, C.E. et Ruoslahti, E. (1983) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>143</b> , 457-461.	65
430 Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R. et Hynes, R.O. (1983) <i>Cell</i> <b>35</b> , 425-431.	14,33,47
431 Sekiguchi, K., Fukuda, M. et Hakomori, S.I. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>256</b> , 6452-6462.	20,30,32
432 Sekiguchi, K. et Hakomori, S.I. (1980) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>77</b> , 2661-2665.	24,30,38
433 Sekiguchi, K. et Hakomori, S.I. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 3967-3973.	20,32,33,34 47
434 Sekiguchi, K., Siri, A., Zardi, L. et Hakomori, S.I. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 5105-5114.	20,36,37,63
435 Sieber-Blum, M., Sieber, F. et Yamada, K.M. (1981) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>133</b> , 285-295.	59
436 Silver, H.K., Karim, K.A., Archibald, E.L. et Salinass, F.A. (1979) <i>Cancer Res.</i> <b>39</b> , 5036-5042.	87
437 Simpson, A.W. et Boughton, B.J. (1984) <i>J. Clin. Pathol.</i> <b>37</b> , 787-789.	58
438 Singer, I.I. (1979) <i>Cell</i> <b>16</b> , 675-685.	53
439 Singer, I.I., Kawka, D.W., Scott, S., Mumford, R.A. et Lark, M.W. (1987) <i>J. Cell Biol.</i> <b>104</b> , 573-584.	53
440 Singer, I.I. et Paradiso, P.R. (1981) <i>Cell</i> <b>24</b> , 481-492.	53
441 Singer, S.J. et Chen, W.T. (1983) in "Structural Carbohydrates in the Liver", Popper, H., Reutter, W., Köttgen, E. et Gudat, F. eds., MTP Press, Boston, 199-208.	53
442 Siri, A., Carnemolla, B., Castellani, P., Balza, E., Raffanti, S. et Zardi, L. (1983) <i>Cancer lett.</i> <b>21</b> , 117-123.	63
443 Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Petersen, T.E. et Magnusson, S. (1986) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>154</b> , 15-29.	14
444 Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Sahl, P., Petersen, T.E. et Magnusson, S. (1986) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>161</b> , 441-453.	14,17,33,40
445 Skorstengaard, K., Thøgersen, H.C. et Petersen, T.E. (1984) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>140</b> , 235-243.	14,23,166

Références	Pages
446 Smets, L.A. et Van Beek, W.P. (1983) in "Structural Carbohydrate in the Liver", Popper, H., Reutter, W., Köttgen, E. et Gudat, F. eds., MTP Press, Boston, 325-332.	60
447 Smith, D.E., Mosher, D.F., Johnson, R.B. et Furcht, L.T. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 5831-5838.	13
448 Smith, H.S., Hackett, A.J., Riggs, J.L., Mosesson, M.W., Watson, J.R. et Stampfer, M.R. (1979) <i>J. Supramol. Struct.</i> <b>11</b> , 147-166.	60
449 Smith, H.S., Riggs, J.L., et Mosesson, M.W. (1979) <i>Cancer Res.</i> <b>39</b> , 4138-4145.	60,61,65
450 Sorvillo, L.M. et Pearlstein, E. (1985) <i>Infect. Immun.</i> <b>49</b> , 664-669.	57
451 Sottrup-Jensen, L., Claeys, H., Zajdel, M., Petersen, T.E. et Magnusson, S. (1978) in "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol 3", Davidson, J.F., Rowan, R.M., Salama, M.M. et Desnoyers, P.C. eds., Raven, New York, 191-209.	45
452 Spiegel, E., Burger, M. et Spiegel, M. (1980) <i>J. Cell Biol.</i> <b>87</b> , 309-313.	7
453 Spiegel, S., Yamada, K.M., Hom, B.E., Moss, J. et Fishman, P.H. (1986) <i>J. Cell Biol.</i> <b>102</b> , 1898-1906.	22
454 Stampfer, M.R., Vlodavsky, I., Smith, H.S., Ford, R., Becker, F.F. et Riggs, J. (1981) <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> <b>67</b> , 253-261.	60
455 Stanislawski, L., Simpson, W.A., Hasty, D., Sharon, N., Beachey, D.H. et Ofek, I. (1985) <i>Infect. Immun.</i> <b>48</b> , 257-259.	57
456 Stenman, S. et Vaheri A. (1978) <i>J. Exp. Med.</i> <b>147</b> , 1054-1064.	7
457 Stenman, S. et Vaheri, A. (1981) <i>Int. J. Cancer</i> <b>27</b> , 427-435.	65
458 Stenman, S., Wartiovaara, J. et Vaheri, A. (1977) <i>J. Cell Biol.</i> <b>74</b> , 453-467.	49
459 Stenn, K.S., Madri, J.A., Tinghitella, T. et Terranova, V.P. (1983) <i>J. Cell Biol.</i> <b>96</b> , 63-67.	56
460 Stewart, J.F., Rubens, R.D., Haare, S., Bulbrook, R.D. et Kessel, D. (1982) <i>Br. J. Cancer</i> <b>46</b> , 208-212.	87
461 Stojanovic, D., Visher, P. et Hugues, R.C. (1984) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>138</b> , 551-562.	119

Références	Pages
462 Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1985) <i>EMBO J.</i> <i>4</i> , 2519-2524.	27
463 Swalla, B.J. et Solursh, M. (1984) <i>Differentiation</i> <i>26</i> , 42-48.	58
464 Takasaki, S., Ikehira, M. et Kobata, A. (1980) <i>Biochem. Biophys. Rec. Commun.</i> <i>92</i> , 735-742.	72,164
465 Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K., Iwanaga, S. et Kobata., A. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <i>254</i> , 8548-8553.	39,40
466 Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K. et Kobata. A. (1980) <i>J. Biochem.</i> <i>88</i> , 1587-1594.	38
467 Tamkun, J.W. et Hynes, R.O. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <i>258</i> , 4641-4647.	49,122
468 Tamkun, J.W., Schwarzbauer, J.F. et Hynes, R.O. (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <i>81</i> , 5140-5144.	47
469 Tarone, G., Galletto, G., Pratt, R.M. et Comoglio, P.M. (1982) <i>J. Cell Biol.</i> <i>94</i> , 179-186.	28
470 Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J. et Hurst, J. (1981) <i>Cancer Res.</i> <i>41</i> , 2491-2500.	60
471 Terranova, V.P., Kleinman, H.K. et Martin, G.R. (1983) in "Structural Carbohydrates in the Liver", Popper, H., Reutter, W., Köttgen, E. et Gudat, F. eds., MTP Press, Boston, 399-406.	50,58
472 Terranova, V.P., Williams, J.E., Liotta, L.A. et Martin, G.R. (1984) <i>Science</i> <i>226</i> , 982-985.	68
473 Thiéry, J.P., Duband, J.L. et Delouvé, A. (1982) <i>Dev. Biol.</i> <i>93</i> , 324-343.	55
474 Thomas, D.D., Baseman, J.b. et Alderete, J.F. (1985) <i>J. Exp. Med.</i> <i>161</i> , 514-525.	57
475 Thompson, L.K., Horowitz, P.M., Bentley, K.L., Thomas, D.D., Alderete, J.F. et Klebe, R.J. (1986) <i>J. Biol. Chem.</i> <i>261</i> , 5209-5214.	29
476 Titany, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L.H., Wade, D., Ashida, K., Walsh, K.A., Chopek, M.W., Sadler, J.E. et Fujikawa, K. (1986) <i>Biochemistry</i> <i>25</i> , 3171-3184.	27
477 Todaro, G.F. et Green, H. (1963) <i>J. Cell Biol.</i> <i>17</i> , 299-313.	59

Références	Pages
478 Todd, H.S., Coffee, M.S., Waalkes, T.M., Abeloff, M.D. et Parsons, R.G. (1980) <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> <b>65</b> , 901-904.	68
479 Tsukamoto, Y., Helsel, W.E. et Wahl, S.M. (1981) <i>J. Immun.</i> <b>127</b> , 673-682.	54
480 Umezawa, K., Kornblihtt, A.R. et Baralle, F.E. (1985) <i>FEBS Lett.</i> <b>186</b> , 31-34.	33,47
481 Urushihara, H. et Yamada, K.M. (1986) <i>J. Cell Physiol.</i> <b>126</b> , 323-332.	29
482 Vaheri, A. et Mosher, D.F. (1978) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>516</b> , 1-25.	6,7,60
483 Vaheri, A. et Ruoslahti, E. (1974) <i>Int. J. Cancer</i> <b>13</b> , 579-586.	60
484 Vaheri, A., Ruoslahti, E., Westermarck, B. et Ponten, J.A. (1976) <i>J. Exp. Med.</i> <b>143</b> , 64-72.	60
485 Van Beek, W.P., Smets, L.A. et Emmelot, P. (1973) <i>Cancer Res.</i> <b>33</b> , 2913-2922.	71
486 Van Beek, W.P., Smets, L.A. et Emmelot, P. (1975) <i>Nature</i> <b>253</b> , 457-460.	71
487 Van den Eijnden, D.H., Joziassse, D.H., Dorland, L., Van Halbeek, M., Vliegenthart, J.F.G. et Schmid, K. (1980) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>92</b> , 839-845.	85,86
488 Van den Eijnden, D.H. et Schiphorst, W.E.C.M. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>256</b> , 3159-3162.	85
489 Van de Water, L., Destree, A.T. et Hynes, R.O. (1983) <i>Science</i> <b>220</b> , 201-204.	57
490 Van de Water, L., Schroeder, S., Crenshaw, E.B. et Hynes, R.O. (1981) <i>J. Cell Biol.</i> <b>90</b> , 32-39.	49,57,58
491 Van Dijk, W., Boers, W., Sala, M., Lasthins, A.M. et Mookerjea, S. (1986) <i>Biochem. Cell Biol.</i> <b>64</b> , 79-84.	82,88
492 Vartio, T. (1982) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>123</b> , 223-233.	20
493 Vartio, T. et Vaheri, A. (1983) <i>T.I.B.S.</i> <b>8</b> , 442-444.	6,50
494 Venyaminov, S.Y., Metsis, M.L., Chernousov, M.A. et Koteliansky, V.E. (1983) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>135</b> , 485-489.	13
495 Verbrugh, H.A., Peterson, P.K., Smith, D.E., N'Guyen, B.T., Hoidal, J.R., Wilkinson, B.J., Verhoef, J. et Furcht, L.T. (1981) <i>Infect. Immun.</i> <b>33</b> , 811-819.	57

Références	Pages
496 Vercellotti, G.M., Lussenhop, D., Peterson, P.K., Furcht, L.T., Mc Carthy, J.B., Jacob, H.S. et Moldow, C.F. (1984) <i>J. Lab. Clin. Med.</i> <b>103</b> , 34-43.	57
497 Vercellotti, G.M., Mc Carthy, J.B., Lindholm, P., Peterson, P.K., Jacob, H.S. et Furcht, L.T. (1985) <i>Am J. Pathol.</i> <b>120</b> , 13-21.	57
498 Villiger, B., Kelley, D.G., Engleman, W., Kuhn, C. et Mc Donald, J.A. (1981) <i>J. Cell Biol.</i> <b>90</b> , 711-720.	49
499 Visher, P. et Hugues, R.C. (1981) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>117</b> , 275-284.	119
500 Vlodavsky, I., Ariav, Y., Atzmon, R. et Fuks, Z. (1982) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>140</b> , 149-159.	66
501 Vuento, M., Wramm, M. et Ruoslahti, E. (1977) <i>FEBS Lett.</i> <b>82</b> , 227-231.	11
502 Wagner, D.D., Ivatt, R., Destree, A.T. et Hynes, R.O. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>256</b> , 11708-11715.	63,82,122, 164
503 Wagner, D.D. et Hynes, R.O. (1979) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>254</b> , 6746-6754.	38
504 Wagner, D.D. et Hynes, R.O. (1980) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>255</b> , 4304-4312.	13,20
505 Wall, R.T., Cooper, S.L. et Kosek, J.C. (1982) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>140</b> , 105-109.	56
506 Warren, L., Buck, C.A. et Tushynski, G.P. (1978) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>516</b> , 97-127.	60,71
507 Warren, L., Fuhrer, J.P. et Buck, C.A. (1972) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>69</b> , 1838-1842.	86,119
508 Wartiovaara, J., Linder, E., Ruoslahti, E. et Vaheri, A. (1974) <i>J. Exp. Med.</i> <b>140</b> , 1522-1533.	62
509 Watt, K.W.K., Correll, B.A., Strong, D.D. et Doolittle, R.F. (1979) <i>Biochemistry</i> <b>18</b> , 5410-5416.	27
510 Weinstein, J., De Souza, U. et Paulson, J.C. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 13835-13844.	85
511 Weinstein, J., De Souza, U. et Paulson, J.C. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 13845-13853.	85
512 Weiser, M.M., Klohs, W.D., Podolsky, D.K. et Wilson, J.R. (1982) in "The Glycoconjugates, Vol IV", Horowitz, M.I. et Pigman, W. eds., Academic Press, New York, 301-333.	86,87

Références	Pages
513 Weiss, L. et Ward, P.M. (1983) <i>Cancer Metastasis Rev.</i> <b>2</b> , 111-127.	66
514 West, C.M., Lanza, R., Rosenbloom, J., Lowe, M., Holtzer, H. et Avdalonis, N. (1979) <i>Cell</i> <b>17</b> , 491-501.	58
515 Weston, J.A. (1983) in "Cell Interactions Development: Molecular Mechanisms", Yamada, K.M. ed., John Wiley and Sons, New York, 153-184.	55
516 Wigley, C.G. et Summerhayes, I.C. (1979) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>118</b> , 394-399.	60
517 Williams, E.C., Janmey, P.A., Ferry, J.D. et Mosher, D.F. (1982) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>257</b> , 14973-14978.	10
518 Williams, E.C., Janmey, P.A., Johnson, R.B. et Mosher, D.F. (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>258</b> , 5911-5914.	23
519 Willingham, M.C., Yamada, K.M., Yamada, S.S., Pouyssegur, J. et Pastan, I. (1977) <i>Cell</i> <b>10</b> , 375-380.	58,61
520 Willingham, M.C., Jay, G. et Pastan, I. (1979) <i>Cell</i> <b>18</b> , 125-134.	63
521 Winter, G. et Fields, S. (1982) <i>Nucleic Acids Res.</i> <b>10</b> , 2135-2139.	27
522 Wolff, I., Timpl, R., Pecker, I. et Steffen, C. (1967) <i>Vox Sang.</i> <b>12</b> , 443-456.	5
523 Wrann, M. (1978) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>84</b> , 269-274.	38
524 Yamada, K.M. (1982) in "The Glycoconjugates, Vol III", Horowitz, M.I. ed., Acad. Press, New York, 331-362.	6,8,50,52
525 Yamada, K.M. (1983) <i>Ann. Rev. Biochem.</i> <b>52</b> , 761-799.	6
526 Yamada, K.M., Akiyama, S.K., Hasegawa, T., Hasegawa, E., Humphries, M.J., Kennedy, D.W., Nagata, K., Urushihara, H., Olden, K. et Chen, W.T. (1985) <i>J. Cell Biochem.</i> <b>28</b> , 79-97.	6
527 Yamada, K.M., Crithley, D.R., Fishman, P.H. et Moss, J. (1983) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>143</b> , 295-302.	29
528 Yamada, K.M., Hayashi, M., Hirano, H. et Akiyama, S.K. (1984) in "The Role of the Extracellular Matrix in Development", Trelslad, R.L. ed., Alan R. Liss Inc., New York, 89-121.	6,8,9,44
529 Yamada, K.M. et Kennedy, D.W. (1984) <i>J. Cell Biol.</i> <b>99</b> , 29-36.	25,54,63,159



Références	Pages
530 Yamada, K.M., Kennedy, D.W., Grotendorst, G.R. et Momoï, T. (1981) <i>J. Cell. Physiol.</i> <b>109</b> , 343-351.	29
531 Yamada, K.M., Kennedy, D.W., Kimata, K. et Pratt, R.M. (1980) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>255</b> , 6055-6063.	31
532 Yamada, K.M., Ohanian, S.H. et Pastan, I. (1976) <i>Cell</i> <b>9</b> , 241-245.	58
533 Yamada, K.M. et Olden, K. (1978) <i>Nature</i> <b>275</b> , 179-184.	60
534 Yamada, K.M., Schlesinger, D.H., Kennedy, D.W. et Pastan, I. (1977) <i>Biochemistry</i> <b>16</b> , 5552-5559.	11,13,22
535 Yamada, K.M. et Weston, J.A. (1974) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>71</b> , 3492-3496.	13
536 Yamaguchi, Y., Isemura, M., Yosizawa, Z., Sato, A. et Suzuki, M. (1983) <i>Tohoku J. Exp. Med.</i> <b>141</b> , 359-367.	146
537 Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. et Kobata, A. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>259</b> , 10834-10840.	72
538 Yogeewaran, G. et Salk, P.L. (1981) <i>Science</i> <b>212</b> , 1514-1516.	69,72
539 Yonemasu, K., Nakainshi, A., Sasaki, T. et Kashiba, S. (1983) <i>Microbiol. Immunol.</i> <b>27</b> , 283-290.	56
540 Zardi, L., Cecconi, C., Barbieri, O., Carnemolla, B., Picca, M. et Santi, L. (1979) <i>Cancer Res.</i> <b>39</b> , 3774-3779.	68
541 Zardi, L., Siri, A., Carmenolla, B., Santi, L., Gardner, W.D. et Hoch, S.O. (1979) <i>Cell</i> <b>18</b> , 649-657.	32
542 Zerlauth, G. et Wolf, G. (1984) <i>Carcinogenesis</i> <b>5</b> , 863-868.	49
543 Zerlauth, G. et Wolf, G. (1985) <i>Carcinogenesis</i> <b>6</b> , 531-534.	49
544 Zhu, B.C.R., Fisher, S.F., Pande, H., Calaycay, J., Shively, J.E. et Laine, R.A. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>259</b> , 3962-3970.	43,146
545 Zhu, B.C.R. et Laine, R.A. (1985) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>260</b> , 4041-4045.	38,41,42,124 128,151,153,162
546 Zhu, B.C.R. et Laine, R.A. (1987) <i>Arch. Biochim. Biophys.</i> <b>252</b> , 1-6.	161
547 Zucker, M.B., Mosesson, M.W., Broekman, M.J. et Kaplan, K.L. (1979) <i>Blood</i> <b>54</b> , 8-12.	56

ADDENDUM

Références	Pages
548 Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., Van Halbeek, H. et Vliegenthart, J.F.G. (1985) FEBS Lett. 183, 65-69.	82
549 Herrman, W.P. et Gielen, W. (1979) Arch. Dermatol. Res. 265, 321-329.	87
550 Clement, I.P. (1979) Biochim. Biophys. Acta 583, 14-19.	87
551 Sauter, U.V. et Glick, M.C. (1979) Biochemistry 18, 2533-2540.	72,173
552 Zardi, L., Carnemolla, B., Siri, A., Petersen, T.E., Paolèlla, G., Sebastio, G. et Baralle, F.E. (1987) EMBO J. 6, 2337-2342.	63
553 Van der Rest, M. (1987) Médecine/Sciences 3, 411-420.	19



## RESUME

L'analyse comparée des glycanes des fibronectines de fibroblastes de rein de Hamster normaux et transformés par le virus HSV a montré que les glycanes majeurs de la fibronectine des fibroblastes normaux ont une structure de type N-acétyllactosaminique biantennée, fucosylée, essentiellement neutre ou monosialylée et que la fibronectine des cellules transformées voit sa partie glycanique se modifier à deux niveaux : (i) la proportion des glycanes tri- et tétraantennés augmente considérablement au détriment des structures biantennées, (ii) elle est enrichie en glycanes di-, tri- et tétrasialylés. Parallèlement, l'étude des activités sialyltransférasiques de ces cellules a permis de caractériser l'augmentation importante de l'activité  $\alpha$ -2,3-sialyltransférasique et une diminution du Km vis-à-vis des asialoglycopeptides tri- et tétraantennés dans les homogénats de cellules transformées. Cette augmentation de l'affinité apparente doit certainement trouver son explication dans une perturbation des systèmes de régulation de l'enzyme. Enfin, l'analyse comparée de la fibronectine plasmatique humaine et de la fibronectine sécrétée par des cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 *in situ* a montré que l'augmentation du taux d'antennarisation des glycanes de la fibronectine des cellules HepG2 entraînait une diminution de l'affinité apparente pour le collagène.

Sachant que les glycanes tri- et tétraantennés adoptent une conformation étalée "en parapluie" qui couvre de larges superficies de la protéine, une hypothèse relative à la disparition de la fibronectine des tissus cancéreux et à l'essaimage métastatique est proposée sur la base d'un masquage, par les glycanes, des sites de fixation des fibronectines des cellules néoplasiques.