

La fibronectine : propriétés et fonctions de la molécule native et de ses fragments

Laurent Poulouin
Olivier Gallet
Jean-Marie Imhoff

La fibronectine est une glycoprotéine de 450 à 500 kDa, présente sous forme fibrillaire dans la matrice extracellulaire, et, sous forme soluble, dans les fluides physiologiques comme le plasma sanguin. Elle est impliquée dans de nombreux processus comme l'opsonisation, la thrombose et la cicatrisation. La principale propriété de la fibronectine est de moduler les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules. Molécule d'adhérence, elle participe, *via* la formation du complexe fibronectine/intégrines, aux processus de communication intercellulaire en stimulant des voies de transmission du signal classiques ou originales, et règle donc la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaires.

La fibronectine est aujourd'hui considérée par beaucoup d'auteurs comme la protéine majeure de l'adhérence cellulaire [1]. Élément de liaison entre la cellule et le tissu conjonctif, on a attribué de nombreuses fonctions de natures variées à cette glycoprotéine native ou à ses fragments. Des articles récents ont relancé le débat afin de connaître les fonctions de la fibronectine au-delà de son rôle d'organisateur de la structure du tissu conjonctif.

De la cold insoluble globulin...

En 1948, une protéine, nommée *cold insoluble globulin*, fut mise en évidence dans le cryoprécipité de plasma sanguin [2]. Elle fut longtemps assimilée à une forme dérivée du fibrinogène [3]. En 1970, une première purification de cette protéine a dénoncé cette hypothèse, en montrant que la globuline insoluble

à froid est une protéine à part entière, uniquement reconnue par des anticorps dirigés contre la fraction purifiée et non par des anticorps antifibrinogène [4]. Présente dans le plasma à une concentration élevée (300 à 500 mg/l), elle participe à la formation du thrombus.

... à la fibronectine

En 1973, une nouvelle protéine présente sur la membrane cytoplasmique des cellules a été identifiée [5]. Après plusieurs études, il est apparu que cette protéine nommée fibronectine, du latin *fibro* et *nectere* la « fibre qui relie », et la globuline insoluble à froid sont des protéines identiques, quelques courtes séquences délétées mises à part [6]. La forme plasmatique, qui ne sera plus appelée globuline insoluble à froid mais fibronectine plasmatique, est une forme soluble de la protéine, sécrétée dans le sang par les hépatocytes [7]. Des formes solubles de la fibronectine ont été depuis localisées

ADRESSES

L. Poulouin: étudiant en doctorat. O. Gallet: docteur en biochimie et physiologie végétale, maître de conférences à l'université de Cergy-Pontoise. J.M. Imhoff: docteur ès sciences, professeur à l'université de Cergy-Pontoise, directeur du laboratoire d'étude des protéines. Laboratoire d'études des protéines CEL-DRED, UFR des sciences et techniques, université de Cergy-Pontoise, 2, avenue Adolphe-Chauvin, Pontoise, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France.

TIRÉS À PART

L. Poulouin.

RÉFÉRENCES

1. Thiéry J, Dufour S, Duband J. Fibronectines, morphogenèse et migrations cellulaires. *Med Sci* 1987; 3: 316-25.
2. Morrison PR, Edsall JT, Miller SG. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J Am Chem Soc* 1948; 70: 3103-8.
3. Edsall JT, Gilbert GA, Shegara HA. The non-clotting component of the human plasma I-1 (cold insoluble globulin). *J Am Chem Soc* 1955; 77: 157-61.
4. Mosseson MW, Umfleet RA. The cold insoluble globulin of human plasma. *J Biol Chem* 1970; 245: 5728-36.
5. Hynes RO. Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 3170-4.
6. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectin: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 369-77.
7. Tamkun JW, Hynes RO. Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J Biol Chem* 1983; 258: 4641-7.
8. Pearlstein E, Gold LI, Garcia-Pardo A. Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem* 1980; 29: 103-27.
9. Resinger PWM, Welsch U. Detection of fibronectin in human, bovine, ovine, caprine and equine milk: reinvestigation and new findings. *Milchwissenschaft* 1992; 47: 288-91.
10. Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG, Spiro RG. Comparative studies on amniotic fluid and plasma fibronectins. *Biochem J* 1981; 193: 295-9.
11. Katayama M, Kamihagi K, Nakagawa K, Hakyama T, Sano Y, Ouchi R, Nagata S, Hino F, Kato I. Increased fragmentation of urinary fibronectin in cancer patients detected by immunoenzymometric assay using domain-specific monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1993; 217: 115-28.
12. Jhanwar SC, Jensen JT, Kaebbling M, Chaganti RS, Klinger HP. *In situ* localization of human fibronectin (FN) genes to chromosome regions 2p14-p16, 2q34-q36, and 11q12.1-q13.5 in germ line cells but to chromosome 2 sites only in somatic cells. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 41: 47-53.
13. Kornbliht AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbach S, Muro AF. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* 1996; 10: 248-57.
14. Stenman S, Vaheri A. Distribution of major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1978; 147: 1054-64.

dans de nombreux fluides physiologiques comme le plasma sérial, la salive [8], le lait [9], le liquide amniotique [10] et l'urine [11].

Localisation chromosomique et variabilité

Le gène codant pour la fibronectine est systématiquement localisé avec les gènes de l'isocitrate déshydrogénase I et de la gamma-crystalline (formant un groupe synténique), sur le chromosome 1 chez la souris, sur le chromosome 8 chez le bœuf et sur les chromosomes 2 et 11 chez l'homme [12]. Ces régions sont semblables en cytologie et illustrent la conservation cytogénétique de ce groupe de gènes dans l'évolution. Chez l'homme, la localisation chromosomique est répartie sur les régions 2p14-2p16, 2q34-2q36 et 11q12.1-11q13.5. Contrairement aux cellules germinales où les trois locus sont transcrits, dans les cellules somatiques seules les formes de fibronectine codées par les locus du chromosome 2 sont synthétisées. L'ARN messenger précurseur de la simple chaîne de fibronectine codant pour 2386 résidus aminés

subit un processus d'épissage alternatif [13] qui est considéré comme un modèle caractéristique de la maturation des transcrits. Cet épissage, réalisé en trois sites sur chaque chaîne de la molécule (figure 1), permet de synthétiser de nombreuses isoformes de fibronectine et détermine la nature de la protéine. Elle sera membranaire (associée aux cellules), fibrillaire ou soluble, au fur et à mesure de l'épissage du transcrit. De nombreuses modifications post-traductionnelles affectent la protéine. La fibronectine est N-glycosylée. Représentant 5% de la masse totale de la protéine, les glycosylations portent à leur extrémité le glycoconjugué acide sialique- α (2-6)galactose/galactosamine. La glycoprotéine possède également des résidus séril et thréonil phosphorylés, et des résidus tyrosyl sulfatés. Enfin, les deux simples chaînes de la molécule seront reliées par deux ponts disulfures après leur sécrétion. Ces modifications vont moduler les caractéristiques de la fibronectine qui participe alors à l'adhérence des cellules au tissu conjonctif, à l'organisation et au maintien de l'intégrité du tissu conjonctif [14], à l'opsonisation

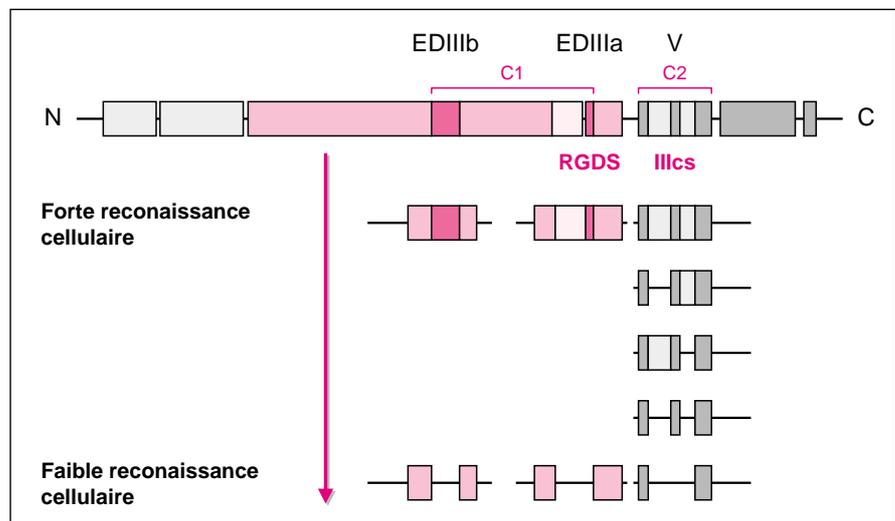


Figure 1. **Isoformes de la fibronectine.** Représentation des différentes isoformes d'une simple chaîne de la molécule de fibronectine. Aux trois positions EIIIa, EIIIb et V, un phénomène d'épissage alternatif définit la nature et la fonction de la glycoprotéine, en modulant, par exemple, les sites de reconnaissance cellulaire (C1 et C2): la séquence en acides aminés RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) et la séquence IIIcs. Plus l'épissage est important, plus la molécule de fibronectine manquera d'affinité pour la cellule, et plus elle sera retrouvée dans l'organisme sous forme soluble. N et C: extrémités amino- et carboxy-terminales. (D'après [18].)

et à la phagocytose, à la thrombose ou à la cicatrisation.

Une molécule d'adhérence

Ces différentes fonctions peuvent expliquer la diversité des éléments reconnus par la fibronectine. La localisation des différents domaines d'affinité a été déterminée sur la glycoprotéine purifiée à partir du plasma sanguin humain [15]. Sur les deux chaînes polypeptidiques de 220 à 250 kDa chacune, reliées entre elles par deux ponts disulfures, on discerne des domaines d'affinité pour les ligands suivants (figure 2): pour des ligands intracellulaires libérés lors de la nécrose, pour des ligands composant le tissu conjonctif ou pour des ligands du plasma (Tableau I). Toutes les formes de fibronectine portent la séquence en acides aminés RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) retrouvée sur d'autres molécules du tissu conjonctif comme la vitronectine, le fibrinogène, la laminine et l'entactine. Cette séquence en acides aminés est reconnue, en présence de calcium, par les complexes intégrines, regroupant les deux sous-unités (α et β) des intégrines et des protéines accessoires comme l'IAP (*integrin associated protein*) [16]. Ce complexe intégrine est relié par la taline ou la vinculine au cytosquelette de la cellule adhérant au tissu conjonctif (figure 3). Les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles de cette région

Ligand	Origine	Fonctions de la fibronectine impliquée
ADN, actine Protéine 1q du complément	intracellulaire sérique	opsonisation, phagocytose opsonisation
Fibrine Collagènes et héparanes	sérique tissu conjonctif	thrombose organisation de la matrice extracellulaire
Intégrines	cellule	motilité, prolifération, différenciation

vont être déterminantes pour la fixation de la fibronectine à la cellule, et vont moduler les caractéristiques de communications intercellulaires assurées par la fibronectine [17, 18].

Une molécule de communication

La molécule de fibronectine, outre son rôle de molécule majeure de l'adhérence cellulaire au tissu conjonctif, participe à différents processus de communication cellulaire. Les complexes intégrines peuvent activer une chaîne de transduction du signal, où les effecteurs sont, soit des protéines kinases, soit les différents constituants du cytosquelette (figure 3). Dans le premier cas, des *focal adhesion kinases* (comme pp125^{FAK}) associées à c-Src activent directement les voies de transduction faisant intervenir Grb2, Sos puis Ras [19, 20]. Cette cascade

stimule l'expression des proto-oncogènes cJun, cFos et cMyc, qui induisent la prolifération cellulaire. La kinase pp125^{FAK} est également liée aux petites protéines G, de la famille Rho, associées au cytosquelette. Dans le deuxième cas, les constituants de ce dernier modulent les voies de transduction du signal en inhibant les phosphatases impliquées dans ces mécanismes. Il y a alors un double effet d'activation et de modulation des voies de transduction par les composants de la matrice extracellulaire, en particulier la fibronectine, *via* les intégrines. Dans le cas d'adénocarcinome, une cellule prémétastatique dégrade la matrice qui l'entoure, le stroma, afin de rejoindre la circulation générale. La protéolyse du tissu conjonctif modifie les voies de transduction du signal des cellules proches qui n'adhèrent plus à la matrice extracellulaire. Nous sommes en présence d'un émetteur, la cellule tumorale, d'un message, la dégradation du tissu conjonctif, et de récepteurs, les autres cellules. Il y a donc communication. Parmi toutes les modifications des profils d'expression, on peut remarquer l'effet sur les messagers endocrines comme l'interleukine 1 [21]. Il ressort donc que les systèmes de communication faisant intervenir le tissu conjonctif, et en particulier la fibronectine, sont des systèmes intégrés dans les voies de communication classiques.

Les fragments de fibronectine

Ces processus de communication, observés avec la fibronectine, sont aussi retrouvés avec des fragments de la glycoprotéine. En effet, le tissu conjonctif

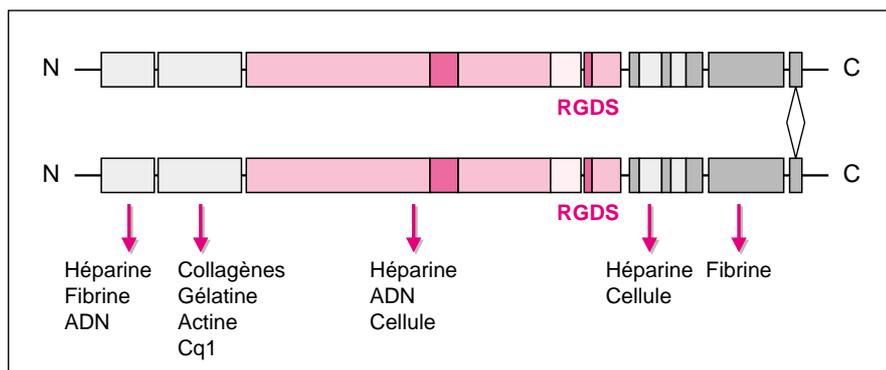


Figure 2. **Structure et affinité de la fibronectine.** Représentation des deux chaînes de la molécule de fibronectine. Les différentes parties de la molécule ont été déterminées à partir des peptides obtenus après hydrolyse ménagée de la protéine. Les régions amino-terminales sont représentées en gris clair, les régions centrales en rose et les régions carboxy-terminales en gris foncé. Le site RGDS indique la séquence en acides aminés Arg-Gly-Asp-Ser reconnue par les complexes intégrines.

RÉFÉRENCES

15. Mosseson MW, Chen AB, Huseby RM. The cold-insoluble globulin of human plasma: studies of its essential structural features. *Biochem Biophys Acta* 1975; 386: 509-24.
16. Mardon HJ, Grant KE. The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett* 1994; 340: 197-201.
17. Giry-Loziquez C, Kleman J, Van der Rest M. Interactions moléculaires et modularité des protéines au sein des matrices extracellulaires. *Med Sci* 1994; 10: 1234-43.
18. Hynes RO. Fibronectins. In: Kreis T, Vale R, eds. *Guidebook to extracellular matrix and adhesion proteins*. Oxford: Oxford University Press, 1993: 56-8.
19. Parsons JT. Integrin-mediated signaling: regulation by protein tyrosin kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 146-52.
20. LaFlamme SE, Auer KL. Integrin signaling. *Sem Cancer Biol* 1996; 6: 111-8.
21. Ostberg CO, Zhu P, Wight TN, Gwarsstrom EE. Fibronectin attachment is permissive for IL-1 mediated gene regulation. *FEBS Lett* 1995; 367: 93-7.
22. Clarck RAF. Biology of dermal wound repair. *Dermato Clin* 1993; 11: 647-65.
23. Heino J. Biology of tumor cell invasion: interplay of cell adhesion and matrix degradation. *Int J Cancer* 1996; 65: 717-22.
24. Imhoff JM, Desmadril M, Breton MF, Tschesche H. Fibronectin inhibition of polymorphonuclear collagenase on collagen-fibronectin complex. *Matrix*; soumis à publication.
25. Beezhold DH, Personius C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *J Leuk Biol* 1992; 51: 59-64.
26. Muir D, Manthorpe M. Stromelysin generates a fibronectin fragment that inhibits Schwann cell proliferation. *J Cell Biol* 1992; 116: 177-85.

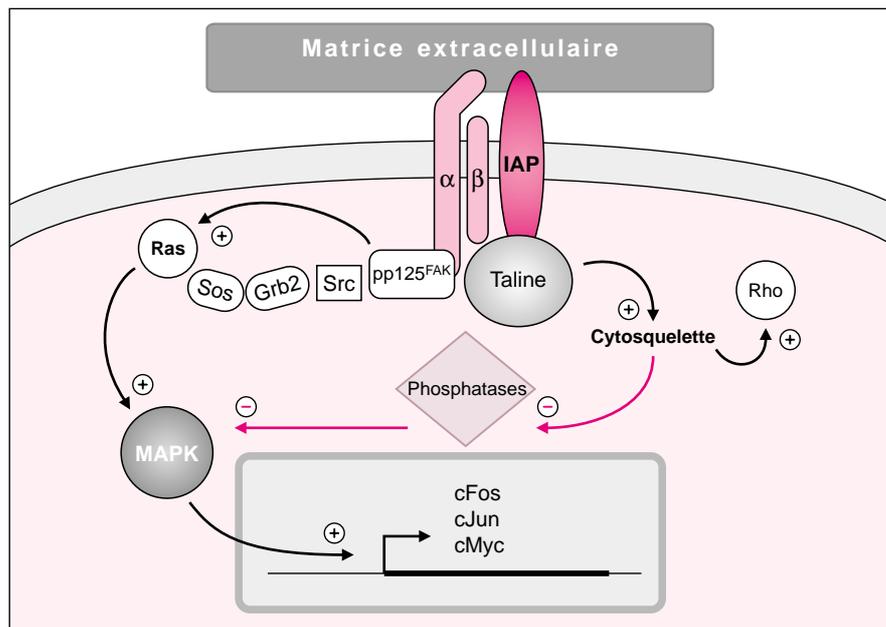


Figure 3. **Représentation du complexe intégrines.** Les deux sous-unités de l'intégrine (α et β) sont liées à la protéine associée aux intégrines (IAP). En présence de calcium, le complexe membranaire reconnaît les éléments du tissu conjonctif et, en particulier, la fibronectine. La formation du complexe intégrines/fibronectine entraîne l'activation d'une focal adhesion kinase: pp125^{FAK}. Cette kinase active la petite protéine G Ras par la voie c-Src, Grb2 et Sos. Ras active la voie de transduction des MAP kinases, MAPK, et induit donc l'expression des proto-oncogènes c-Fos, c-Jun et c-Myc. Les éléments du cytosquelette, liés au complexe intégrines grâce à la taline, activent la petite protéine G Rho et inhibent les phosphatases cytosoliques, potentialisant alors les voies de transduction des kinases.

est dégradé par un éventail de protéases lors de différents processus physiologiques [22] comme l'angiogenèse, la cicatrisation, ou pathologiques [23] comme les inflammations et la cancérogenèse. Or, de récents travaux ont montré que toute dégradation efficace du tissu conjonctif nécessite l'hydrolyse de la fibronectine [24]. La protéine assure en effet un rôle prépondérant dans le maintien de l'intégrité du tissu conjonctif en stabilisant les structures, entre autres, du collagène au sein de la matrice extracellulaire.

Activités potentielles des fragments de fibronectine

De nombreux auteurs ont montré que les fragments de fibronectine possèdent des propriétés variées. Certaines font intervenir des voies de transmission du signal semblables à celles de la molécule native, décrites ultérieurement [25]. Les fragments inhibent la prolifération des cellules de Schwann [26] ou des cellules endothéliales [27].

Il est facile d'imaginer que la majorité des cellules ont besoin d'une matrice extracellulaire, et surtout d'y adhérer pour croître. L'inhibition de la prolifération cellulaire par les fragments est due à leur capacité de se lier aux récepteurs membranaires comme les intégrines. La cellule, reconnaissant les fragments, ne peut plus se fixer au tissu conjonctif par l'intermédiaire des molécules natives de fibronectine. Mais la fixation aux récepteurs, soit de la fibronectine intacte, peut ne pas produire les mêmes effets. Ainsi, *in vivo*, des fragments de fibronectine, injectés près des cartilages, se lient à l'environnement cellulaire et activent sa dégradation. Cela suppose alors que la cellule détermine la qualité de son adhérence autrement que par la reconnaissance de la fibronectine. La cellule ne reconnaît pas seulement une protéine, elle reconnaît son environnement. Ces fragments activent des voies de transduction du signal, augmentant ainsi la sécrétion de protéases [28].

Activités protéolytiques des fragments

D'autres travaux montrent que les fragments de fibronectine pourraient porter des activités protéolytiques. Différents fragments de fibronectine, tels que ceux libérés lors des phénomènes métastatiques, montrent de nombreuses activités protéolytiques [29]. Il y aurait alors « explosion enzymatique » : la dégradation de la fibronectine entraînerait la dégradation de tous les autres constituants du tissu conjonctif. Les préparations classiques de fibronectine, telles que celles commercialisées, sont réalisées selon le protocole d'E. Engvall et E. Ruoslahti décrit en 1977 [30] à partir du plasma sanguin par chromatographie d'affinité sur gélatine. Cependant, cette dernière co-purifie également tout élément du plasma ayant une affinité pour la gélatine, dont les gélatinases présentes physiologiquement dans le sérum. En utilisant des protocoles de purification plus complexes, aucune activité protéolytique à partir des fragments de fibronectine n'est observée [31]. Il paraît donc vraisemblable que les activités préalablement observées à partir des fragments puissent être dues aux protéases contaminantes co-purifiées lors de la purification de la fibronectine.

La fibronectine et la pathologie

Chez l'embryon, la fibronectine joue un rôle essentiel lors de la migration, de la prolifération et de la différenciation des cellules mésodermiques. Les affections dues à une mutation du gène codant pour la fibronectine sont souvent létales. Dans le cas de mutations-stop reproduites par des expériences de d'invalidation de gène (*knockout*) chez la souris [32], les mutants hétérozygotes sont viables mais leur concentration en fibronectine plasmatique est réduite de moitié par rapport aux concentrations physiologiques. Dans le cas des homozygotes, l'allèle mutant perturbe l'orientation antéro-postérieure, provoque la déformation des tubes neuraux et cause des lacunes dans les tissus issus du mésoderme. L'embryon ne possède pas de somites et l'ensemble des éléments de son système cardiovasculaire sont atrophiés ou manquants. Dans le cas de mutations moins impor-

tautes, la surstabilisation des transcrits codant pour la fibronectine provoque des maladies arthritiques. La destruction des cartilages par les neutrophiles polymorphonucléaires est entraînée par une hypersécrétion de thrombospondine et de fibronectine, libérant dans l'articulation de nombreux fragments de la protéine matricielle [28, 33]. Outre les affections directement liées à un défaut qualitatif ou quantitatif de fibronectine, il faut tenir compte de son rôle passif lors de l'invasion de l'organisme par les cellules métastatiques qui adhèrent à la protéine. Enfin, la fibronectine est utilisée afin de détecter et de qualifier les inflammations chroniques et les processus de cancérogenèse en observant la présence de ses produits de dégradation dans le sang (mucoviscidose [34]) ou l'urine (adénocarcinomes vésiculaires [11]) ■

RÉFÉRENCES

27. Homandberg GA, Kramer-Bjerke J, Grant D, Eisenstein R. Heparin-binding domain fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell-growth: structure-function correlation. *Biochim Biophys Acta* 1986; 874: 61-71.
28. Xie D, Homandberg GA. Fibronectin fragments bind to and penetrate cartilage tissue resulting in proteinase expression and cartilage damage. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1182: 189-96.
29. Boudjennah L, Dalet-Fumeron V, Ylatura S, Pagano M. Immunopurification and characterisation of a collagenase/gelatinase domain issued from basement membrane fibronectin. *FEBS Lett* 1996; 391: 52-6.
30. Engvall E, Ruoslahti E. Binding of a soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 1977; 20: 1-5.
31. Smilevov L, Forsberg E, Zeligman I, Sparman M, Johansson S. Separation of fibronectin from a plasma gelatinase using immobilized metal affinity chromatography. *FEBS Lett* 1992; 302: 227-30.
32. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 1993; 119: 1079-91.
33. Kreis C, La Fleur M, Menard C, Paquin R, Beaulieu AD. Thrombospondin and fibronectin are synthesized by neutrophils in human inflammatory joint disease and in a rabbit model of *in vivo* neutrophil activation. *J Immunol* 1989; 143: 1961-8.
34. Allal M, Robert L, Labat-Robert J. Fragmentation de la fibronectine dans la mucoviscidose. *C R Acad Sci Paris* 1992; 314 série III: 587-92.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier Marie-France Breton pour les précieuses remarques apportées lors de la lecture de ce manuscrit.

Summary

Fibronectin: properties and functions of the native molecule and its fragments

Fibronectin is a 450-500 kDa glycoprotein organized in fibrillar structures in the extracellular matrix (ECM) and also in soluble forms in many circulating body fluids such as blood plasma. Fibronectin is involved in several biological phenomena including opsonization, thrombosis and tissue repair. Its main function is to mediate interactions of cells with ECM through the integrins complexes. Considered as a cell attachment protein, fibronectin is also a real communication molecule. Within the integrins complex, fibronectin functions as a signaling receptor integrating informations from ECM; it stimulates transduction pathways, through kinases and cytoskeletal proteins activation. It is also involved in cell proliferation, differentiation, motility and survival.