

Fibronectines, morphogenèse et migrations cellulaires

Les fibronectines et leurs récepteurs sont les chefs de file des systèmes d'adhésion entre cellules et matrices intracellulaires. La connaissance de leurs mécanismes d'action est primordiale pour comprendre de multiples phénomènes cellulaires de l'embryon à l'adulte, des bactéries à l'homme.

Jean-Paul Thiéry

Directeur de recherche au Cnrs

Sylvie Dufour

Boursière du ministère de la Recherche

Jean-Loup Duband

Chargé de recherche au Cnrs

Dès les premières étapes du développement, les cellules de l'embryon sécrètent des glycoprotéines qui servent à élaborer la matrice extracellulaire. L'assemblage de ces glycoprotéines en un réseau fibrillaire s'établit progressivement dans les espaces intercellulaires. Les fibres élémentaires constitutives de ce réseau, de quelques dizaines de nanomètres, ne contiennent pas seulement du collagène, comme on l'a longtemps pensé. Elles sont en fait composées de collagènes de type I et III, de fibronectines et de glycosaminoglycanes ; ces derniers peuvent être assemblés dans des particules sphériques de deux nanomètres associées au réseau fibrillaire [1]. La matrice extracellulaire peut former un continuum, soit entre un épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent, soit entre les lames basales de deux épithéliums contigus. La lame basale, déposée dans la plupart des cas par les cellules épithéliales sur leur face basale, et de structure semi-cristalline est composée de glycoprotéines comme la laminine, de collagène de type IV, de pro-

téoglycanes et parfois de fibronectines.

Les embryologistes ont observé depuis longtemps que le développement de l'embryon fait intervenir de nombreuses modifications de l'organisation tridimensionnelle des cellules. Déformations et mouvements de feuilletts épithéliaux, migrations de cellules isolées se produisent au contact de la matrice extracellulaire. On avait émis l'hypothèse que le collagène, un des constituants de cette matrice, devait jouer un rôle essentiel dans les différentes étapes de la morphogenèse. Or, ce n'est qu'après la redécouverte, au début des années 1970, d'une importante famille de glycoprotéines, les fibronectines (du latin *fibra* : fibres et *nectere* : lier) [2-4], que l'accent a été mis sur le rôle de ces glycoprotéines dans le développement embryonnaire.

Le gène fibronectine

Les fibronectines sont composées de deux chaînes polypeptidiques de 220 à 240 kilodaltons (kD), reliées entre elles par des ponts disulfures situés au voisinage de l'extrémité carboxyterminale.

ADRESSE

J.-P. Thiéry, S. Dufour, J.-L. Duband : institut d'embryologie du Cnrs et du Collège de France, 49 bis avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex.

L'analyse de la séquence en acides aminés de fibronectines isolées à partir de plasma de bœuf a montré qu'il existe trois types d'homologie de séquence appelées homologies de type I, II et III. Les degrés d'homologie au sein du groupe d'homologie de type I varient entre 18 et 60 % et, au sein des groupes d'homologie de type II et III, ils sont respectivement de 30 et 50 %. La structure secondaire d'une chaîne de fibronectine a été déduite à partir de la carte de digestion protéasique

des fibronectines, de l'organisation au sein de la chaîne polypeptidique des différentes homologies I, II et III et de la position des cystéines capables de former des ponts disulfures [5] (figures 1 et 2). Les deux chaînes polypeptidiques sont codées par un même gène mais diffèrent en plusieurs endroits dans leur séquence (pour revues [6, 7]). Le clonage des ADN complémentaires de la totalité ou d'une partie des ARN messagers des fibronectines a été réalisé chez les mammifères et

chez les oiseaux. Ces expériences ont permis de trouver chez le rat et chez l'homme des clones qui différaient les uns des autres par une délétion dans deux régions distinctes. L'analyse détaillée des clones d'ADN génomique correspondants a clairement établi que les ARNm nucléaires subissaient un épissage différentiel. Ainsi, deux exons appelés EIII_A (appelé aussi ED) et EIII_B (Hynes, *communication personnelle*) peuvent être éliminés alors qu'un autre exon appelé IIICS peut être délété par

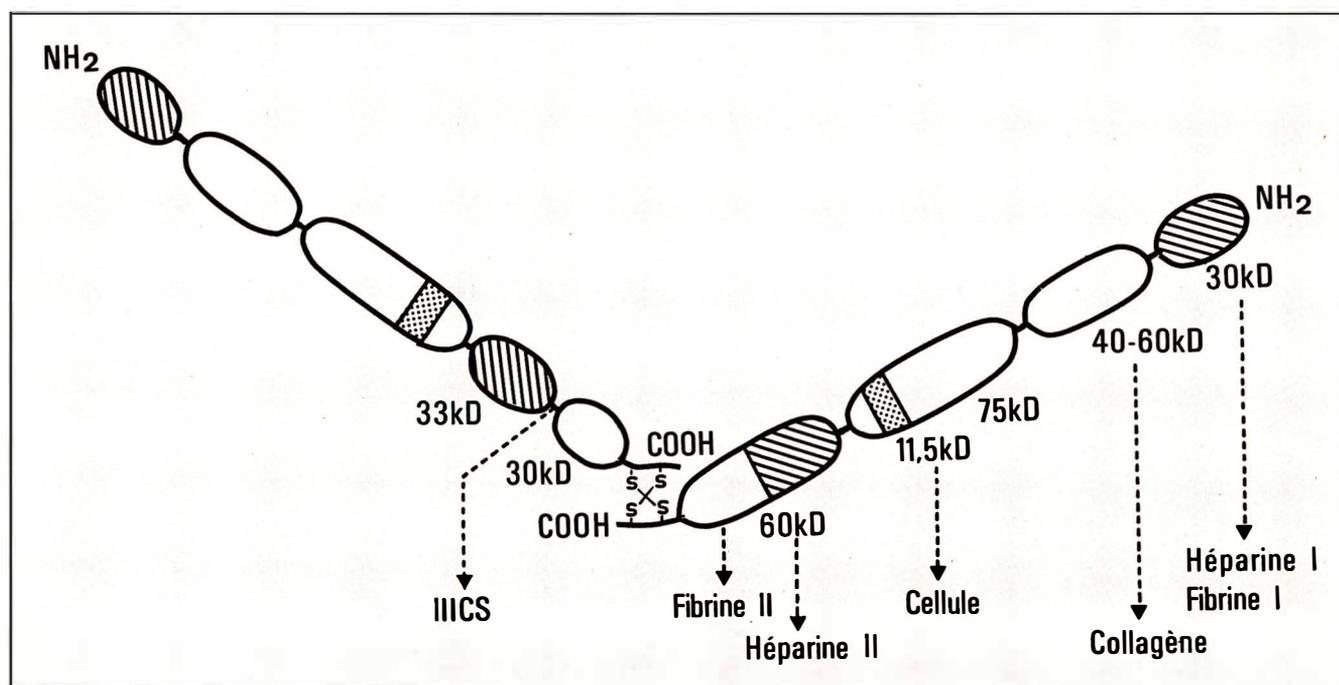
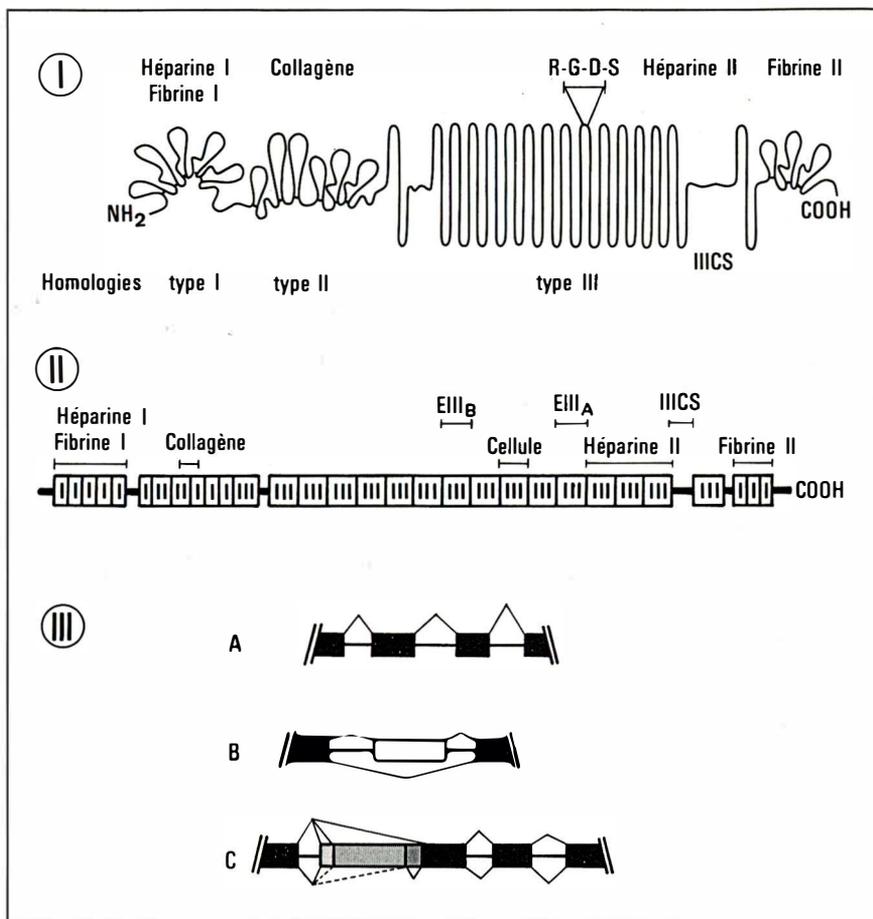


Figure 1. **Représentation schématique d'une molécule de fibronectine.** La molécule est composée de deux chaînes très semblables mais non identiques. Ces deux chaînes sont liées entre elles par deux ponts disulfures situés dans leur extrémité carboxy-terminale. Chaque chaîne possède différents domaines fonctionnels qui ont été décrits à la suite d'expériences de dégradation protéasique de la molécule. Ces domaines portent des sites de liaison pour diverses macromolécules et pour des récepteurs membranaires. En partant de l'extrémité amino-terminale, on trouve le domaine de liaison à l'héparine et à la fibrine de 30 kD (symbolisé par des hachures et noté Héparine I et Fibrine I), suivi par le domaine de liaison au collagène de 40 à 60 kD. On trouve ensuite le site de liaison à la cellule contenant la séquence RGDS. Ce site a été initialement situé sur un fragment protéolytique de 75 kD puis réduit à une région de 11,5 kD (symbolisée par des pointillés) avant d'être défini comme le térapeptide RGDS. Du côté de l'extrémité carboxy-terminale, se situent deux domaines de liaison, celui pour l'héparine et celui pour la fibrine. Le premier est symbolisé par des hachures et le second est en blanc ; ils sont notés Héparine II et Fibrine II. Il est à noter toutefois que ces deux domaines peuvent être séparés par la séquence IIICS quand celle-ci n'est pas épissée ; dans ce cas, ils ont respectivement une masse moléculaire de 33 et 30 kD (cette situation est représentée sur la chaîne de gauche). Ces deux domaines peuvent aussi être accolés quand la séquence IIICS est épissée et, dans ce cas, ils forment un domaine de 60 kD (cette situation est représentée sur la chaîne de droite). Nous ferons remarquer, enfin, qu'une chaîne de fibronectine qui n'a pas subi d'épissage de sa région IIICS peut être associée avec une chaîne identique ou ayant subi l'épissage de la région IIICS. Ceci est une des causes de la diversité des molécules de fibronectine.

RÉFÉRENCES

- Hay ED. Cell Biology of Extracellular Matrix. New York : Plenum Press : 417 p.
- Mosesson MW, Umfleet RA. The cold insoluble globulin of human plasma : Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold insoluble fraction components. *J Biol Chem* 1970 ; 245 : 5728-36.
- Hynes RO. Alteration of cell surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 ; 70 : 3170-4.
- Yamada KM, Weston JA. Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 ; 71 : 3492-6.
- Petersen TE, Thogersen HC, Skorsten-gaard K, et al. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin : Three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 137-41.
- Hynes RO. Molecular biology of fibronectin. *Annual Review of Cell Biology* 1985 ; 1 : 67-90.
- Dufour S, Duband J-L, Thierry JP. Role of a major cell-substratum adhesion in cell behavior and morphogenesis. *Biology of the Cell* 1986 ; 58 : 1-13.
- Schwarzbauer JE, Tamkun JW, Lemischka IR, Hynes RO. Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell* 1983 ; 35 : 421-31.
- Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. Primary structure of human fibronectin : Differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J* 1985 ; 4 : 1755-9.
- Hirano H, Yamada Y, Sullivan M, De Crombrughe B, Pastan I, Yamada KM. Isolation of genomic DNA clones spanning the entire fibronectin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 46-50.
- Zardi L, Cianfriglia M, Balza E, Carnemolla B, Siri A, Croce CM. Species-specific monoclonal antibodies in the assignment of the gene for human fibronectin to chromosome 2. *EMBO J* 1982 ; 1 : 929-33.
- Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* 1983 ; 52 : 761-99.
- Furcht LT. Structure and function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Modern Cell Biology* 1983 ; 1 : 53-117.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984 ; 309 : 30-3.
- Akiyama SK, Hasegawa E, Hasegawa T, Yamada KM. The interaction of fibronectin fragments with fibroblastic cells. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 13256-60.



tiellement [8, 9] (figure 2). On comprend donc comment l'association au hasard de deux chaînes polypeptidiques, transcrites à partir de ces ARN messagers à épissage différentiel, peut conduire à plusieurs centaines de fibronectines, alors que le gène codant est unique. Chez l'oiseau, il a été établi que le gène de 50 kilopaires de bases (kpb) contenait 48 exons d'environ 140 paires de bases à l'exception de l'exon IIICS [10]. Chez les mammifères, le gène a été localisé sur le chromosome 11 chez la souris, et sur le chromosome 2 chez l'homme [11]. Les fibronectines peuvent être regroupées en deux classes principales : les fibronectines solubles qui sont présentes dans les fluides biologiques comme le plasma, le

liquide céphalorachidien et le liquide synovial et les fibronectines associées aux cellules qui forment des structures fibrillaires dans la matrice extracellulaire. Dans l'organisme, nombreux sont les types de cellules synthétisant la quasi-totalité des fibronectines produites après épissage différentiel des messagers. Cependant, il faut souligner que les hépatocytes synthétisent exclusivement les fibronectines plasmatiques dépourvues des séquences EIII_A et EIII_B.

Les sites de liaison des fibronectines

Historiquement, de très nombreuses recherches, antérieures aux travaux de génétique brièvement décrits dans le paragraphe précé-

◀ **Figure 2. Représentation schématique détaillée d'une chaîne de fibronectine.** I) Structure secondaire d'une chaîne de fibronectine. La chaîne est organisée en plusieurs domaines structuraux séparés les uns des autres par des séquences non structurées sensibles à l'action des protéases. Chaque domaine structural est composé de plusieurs unités structurales chacune correspondant à des séquences spécifiques répétées le long de la chaîne polypeptidique. Trois catégories d'unités ont été observées ; elles sont appelées homologues de séquences de type I, II et III. Il y a 12 homologues de type I, 2 homologues de type II et 16 homologues de type III. Le repliement structural présent dans les homologues de séquences de type I et II sont stabilisées par un pont disulfure. Les domaines fonctionnels de liaison pour l'héparine, le collagène, la fibrine ont été localisés le long de la chaîne ; on peut remarquer qu'à chaque domaine fonctionnel correspond un ou plusieurs domaines structuraux associés ensemble. Le site de liaison à la cellule correspondant au tétrapeptide RGDS est présent sur une homologie de type III et est exposé à l'extérieur de la chaîne. II) Représentation schématique d'une chaîne de fibronectine localisant les régions sujettes à des épissages alternatifs. Les boîtes appelées I, II et III correspondent aux différentes homologues de séquences de type I, II et III. Les traits épais représentent des séquences uniques dans la molécule. Chaque homologie de type III est codée par deux exons d'environ 140 paires de bases chacun, excepté dans le cas de l'homologie EIII_A codée par un seul exon. Il existe un épissage différentiel de l'ARN pré-messager des fibronectines au niveau des exons EIII_A, EIII_B et IIICS. Il existe ainsi plusieurs variants des fibronectines selon l'absence ou la présence de ces deux régions. III) Détail des différents épissages ayant lieu au sein d'un ARN pré-messager de fibronectine. A) épissage normal entre deux exons (boîtes noires) aboutissant à l'élimination des introns (traits fins). B) épissage alternatif de l'exon EIII_A. Il peut être épissé en même temps que les introns avoisinants ou conservé comme un exon normal (il en est de même pour l'exon EIII_B). C) épissages différentiels au sein de la région IIICS chez le rat et chez l'homme. La région IIICS est en fait une extension du côté 5' (représentée par les différents grisés) du premier exon de l'homologie de type III suivante (en noir) qui est unique à cette homologie. Les traits fins symbolisent les introns. Au moins trois sites 3' (accepteurs d'épissage) existent dans cette extension chez le rat. Chez l'homme, deux sites 3' accepteurs et un site 5' donneur ont été décrits. D'autres épissages potentiels sont représentés par les lignes discontinues.

dent, avaient porté sur les différents domaines fonctionnels des fibronectines (pour revues [12, 13]). C'est ainsi qu'après digestion partielle de la fibronectine par différentes protéases, on a pu mettre en évidence plusieurs domaines de liaison (figure 1). A l'extrémité aminoterminal, se trouve une région de 30 kD se liant à l'héparine, puis un domaine de 40 kD se liant au collagène et à la gélatine avec une plus grande affinité. Plus loin, on trouve une région liant l'ADN et une séquence responsable de la liaison avec la surface cellulaire. Enfin, vers l'extrémité carboxyterminale, il existe une région liant l'héparine et une autre liant la fibrine. Ces données mettaient l'accent sur la propriété fondamentale des fibronectines d'être

des protéines multifonctionnelles. On comprendra aisément que ces protéines puissent jouer un rôle clé dans la matrice extracellulaire ou dans les fluides biologiques, dans la mesure où elles interagissent à la fois avec la surface cellulaire et avec des composants de la matrice comme le collagène ou du plasma comme le fibrinogène.

Le site de liaison à la cellule

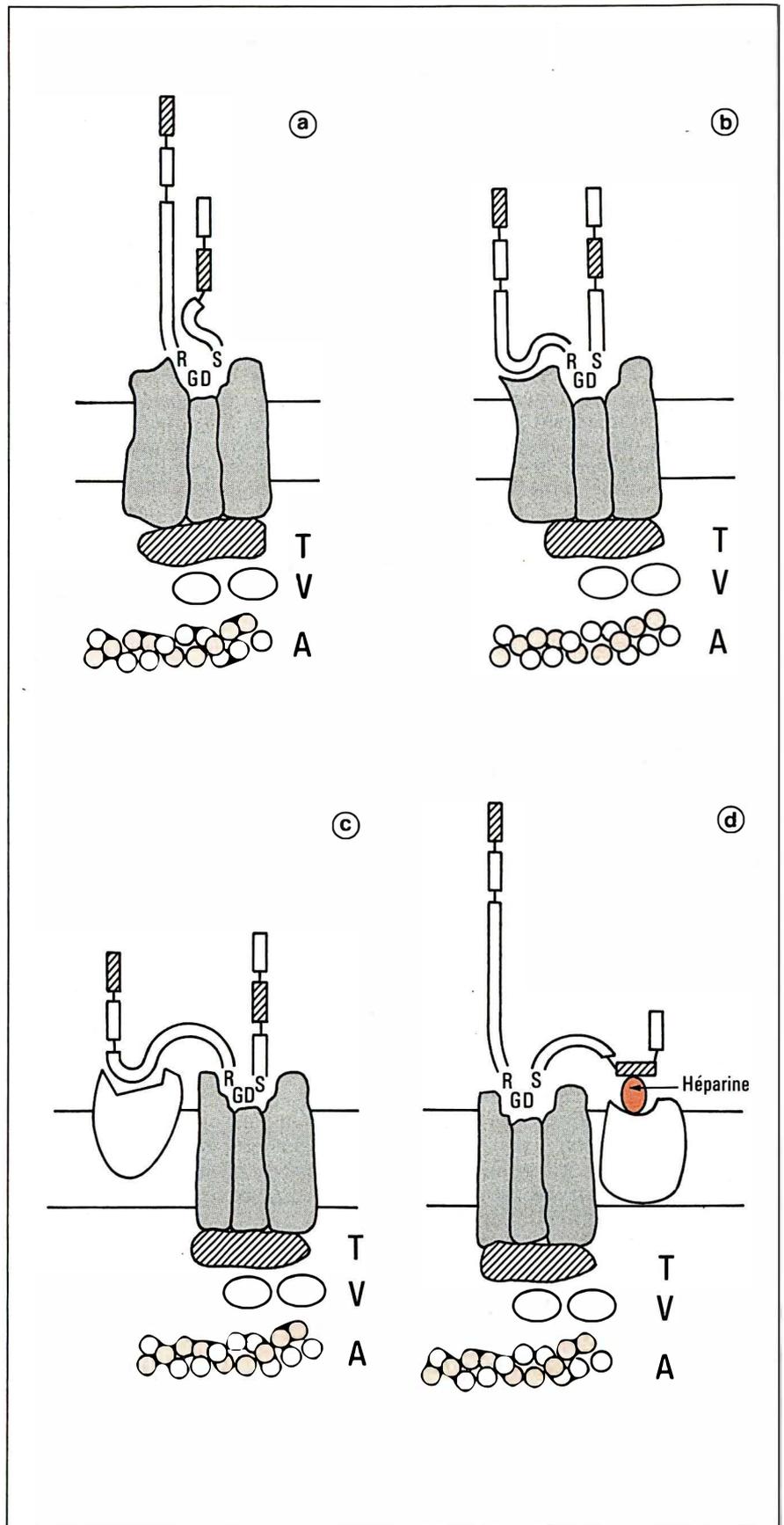
Plusieurs équipes ont essayé de définir la structure de la séquence impliquée dans les différents sites de liaison. Très récemment encore, il fallait utiliser une technique très laborieuse pour isoler des peptides de plus en plus courts et tester leur propriété de liaison. Cette méthode a pourtant

été utilisée avec succès dans le cas du site de liaison des fibronectines à la cellule. A partir d'un fragment de 75 kD, on a pu isoler d'abord un peptide de 110 acides aminés puis un de 30 acides aminés. L'examen de cette courte séquence a mis en évidence une région hydrophilique qui se trouve exposée à l'extrémité d'une homologie de type III dans un feuillet β (figure 1). La synthèse de nombreux peptides correspondant soit à la séquence figurant réellement dans cette région, soit à une séquence contenant des substitutions, inversions ou délétions, a permis de définir la séquence minimale nécessaire à la liaison des fibronectines aux récepteurs cellulaires. Cette séquence est composée de quatre acides aminés Arginine-Glycine-Aspartate-Sérine (RGDS) [14]. Cependant, la sérine peut être remplacée par une alanine, une valine, une thréonine sans changer de façon importante les propriétés de liaison. En revanche, une modification de l'un des trois autres acides aminés entraîne une perte totale d'activité. On a remarqué en particulier que les deux acides aminés chargés doivent être espacés par une glycine. Il faut toutefois souligner que la constante d'affinité de la liaison du peptide pour le récepteur est très faible, 10^4 M^{-1} , alors que le fragment 75 kD a une affinité 100 fois supérieure [15].

On peut donc faire l'hypothèse qu'il existe d'autres séquences interagissant soit avec le même récepteur des fibronectines, soit avec d'autres récepteurs qui restent dans ce cas à identifier (figure 3). L'existence de telles séquences a déjà reçu une confirmation expérimentale dans un système modèle utilisant des cellules tumorales. In vitro, l'adhérence des mélanomes B16/F10 aux fibronectines fait intervenir deux séquences, dont l'une est la séquence Arginine-Glutamate-Aspartate-Valine (REDV), situées dans l'exon IIICS. Une autre séquence, située en position plus aminoterminal par rapport à la séquence RGDS, est également

RÉFÉRENCES

16. Humphries MJ, Akiyama SK, Komoriya A, Olden K, Yamada KM. Identification of an alternatively-spliced site in human plasma fibronectin that possess cell-type specificity. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 2637-47.
17. Obara M, Mohinder SK, Rocher-Dufour S, Kornblihtt A, Thiery JP, Yamada KM. Expression of the cell-binding domain of human fibronectin in *E. coli* : Identification of sequences promoting full to minimal adhesive function. *FEBS Lett* 1987 (sous presse).
18. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Arg-Gly-Asp : A versatile cell recognition signal. *Cell* 1986 ; 44 : 517-8.
19. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, et al. Structure of integrin a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986 ; 46 : 271-82.
20. Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin. A transmembrane linkage. *Nature* 1986 ; 320 : 531-2.
21. Hirst R, Horwitz A, Buck C, Rohrschneider L. Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 6470-4.
22. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins : Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982 ; 95 : 369-77.
23. Boucaut J-C, Darribère T. Fibronectin in early amphibian embryo. *Cell Tissue Res* 1983 ; 234 : 135-45.
24. Boucaut J-C, Darribère T, Boulekbaiche H, Thiery JP. Prevention of gastrulation but not neurulation by antibodies to fibronectin in amphibian embryos. *Nature* 1984 ; 307 : 364-7.
25. Boucaut J-C, Darribère T, Poole TJ, Aoyama H, Yamada KM, Thiery JP. Biological active synthetic peptides as probes of embryonic development : A competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. *J Cell Biol* 1984 ; 99 : 1822-30.
26. Duband J-L, Thiery JP. Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev Biol* 1982 ; 94 : 337-50.
27. Wartiovaara J, Leivo I, Vaheri A. Expression of the cell surface-associated glycoprotein FN in the early mouse embryo. *Dev Biol* 1979 ; 69 : 247-57.
28. Semoff S, Hogan BLM, Hopkins CR. Localization of fibronectin, laminin, and entactin in Reichert's membrane by immunoelectron microscopy. *EMBO J* 1982 ; 1 : 1171-5.
29. Newgreen DF, Thiery JP. Fibronectin in early avian embryos : Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res* 1980 ; 211 : 269-91.



un site de haute affinité pour la surface cellulaire [16, 17]. Nous faisons donc l'hypothèse qu'il existe différents couples de sites de liaison à la cellule, chaque couple étant constitué d'un site de haute affinité (10^6 M^{-1}) et d'un site de faible affinité (environ 10^4 M^{-1}). Ainsi, le site REDV serait associé dans la région IIICS à un site de plus haute affinité et RGDS serait associé au site décrit en position plus aminoterminal. Certaines cellules utiliseraient préférentiellement l'un de ces couples pour adhérer aux molécules de fibronectine. En tout état de cause, le tripeptide RGD, initialement considéré comme un signal adhésif [18], pourrait se trouver sur beaucoup de protéines sans pour autant conférer à ces protéines un pouvoir de liaison à la cellule. Pour qu'une protéine possède cette capacité de liaison à la cellule, il y aurait donc nécessité d'une conformation favorable et de la présence de sites de plus haute affinité.

Le récepteur des fibronectines

La faible affinité des fibronectines pour leur récepteur cellulaire n'a pas permis d'utiliser, comme

méthode de purification des récepteurs, la chromatographie d'affinité avec des gels de sépharose couplés à la fibronectine. Mais récemment, on a trouvé des anticorps monoclonaux bloquant l'attachement *in vitro* des cellules à des supports recouverts de fibronectines. Et c'est ainsi que la purification du récepteur a été effectuée par colonne d'affinité avec un anticorps spécifique chez l'homme et chez le poulet. Chez les mammifères, le récepteur de la fibronectine est composé de deux protéines transmembranaires. Curieusement, l'une de ces protéines est en fait composée de deux polypeptides reliés entre eux par un pont disulfure. Chez les oiseaux, on a pu mettre en évidence trois chaînes polypeptidiques transmembranaires dont l'une a déjà été complètement séquencée. Une région du domaine cytoplasmique de ces trois chaînes polypeptidiques interagit fortement avec la taline, une protéine du cytosquelette de 215 kD localisée au niveau des plaques adhésives que forment les cellules avec leur support [19, 20]. Cette interaction est abolie lorsque le domaine cytoplasmique du récepteur est phosphorylé sur une tyrosine. De même, une fois phos-

phorylé, le récepteur se lie avec beaucoup moins d'affinité aux fibronectines. Dans cette optique, il est très intéressant de constater que le récepteur des fibronectines est très fortement phosphorylé dans les cellules transformées [21]. Or, les cellules transformées adhèrent mal au support et gardent une morphologie arrondie. De plus, elles ne synthétisent que peu de fibronectines et ne les retiennent pas à leur surface. C'est d'ailleurs cette observation qui avait conduit à l'identification, en 1973, d'une protéine appelée *large external transformed-sensitive protein* (LETS) qui n'est autre qu'une des fibronectines.

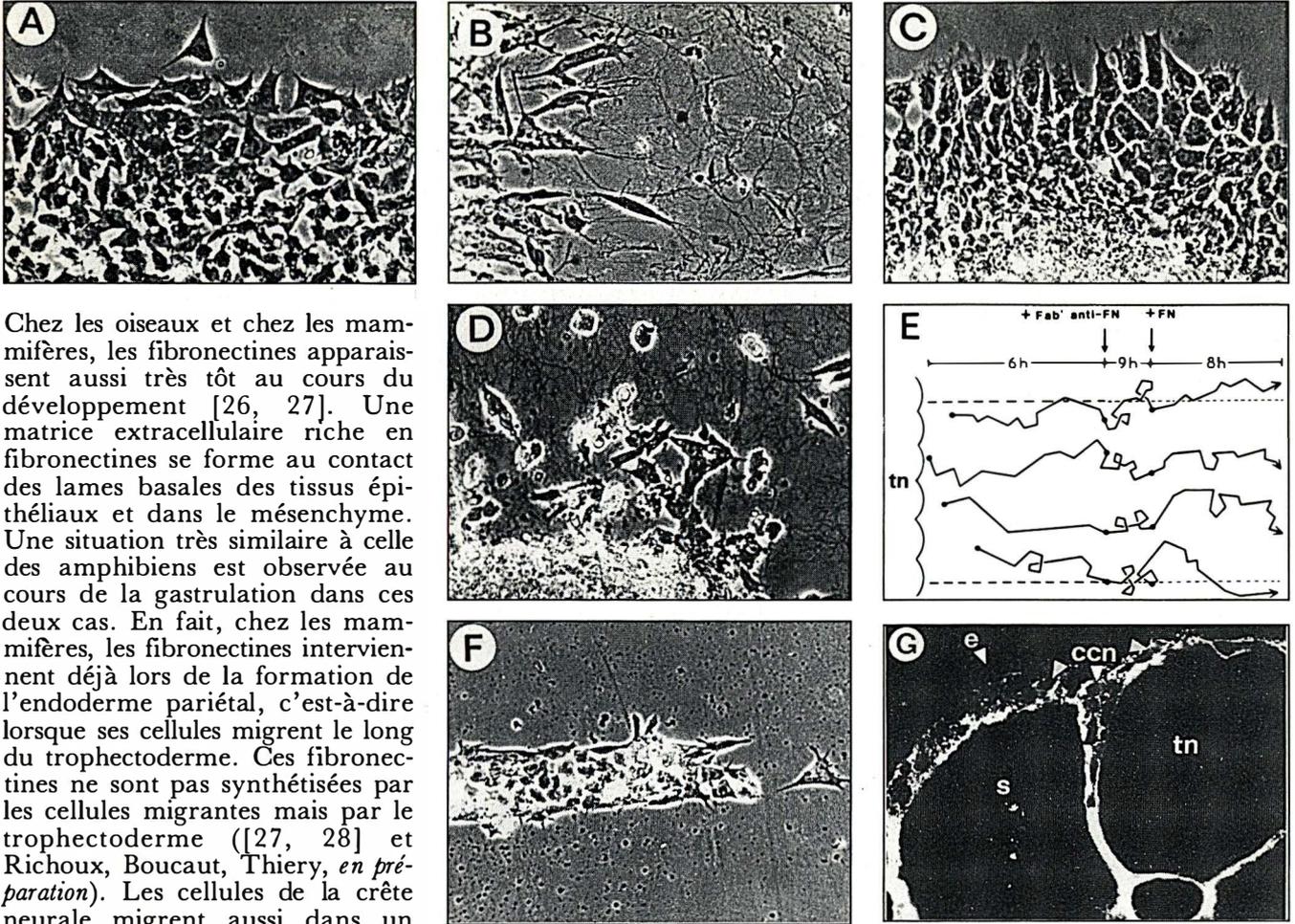
L'obtention d'anticorps spécifiques, grâce auxquels la nature du récepteur aux fibronectines a pu être établie, a permis également d'étudier la distribution des fibronectines et de leurs récepteurs au cours de l'embryogenèse, ainsi que dans de nombreux tissus normaux et tumoraux [22]. Nous ne décrivons ici que les observations faites chez le jeune embryon.

Rôle durant l'embryogenèse des vertébrés

Chez l'amphibien, les fibronectines sont synthétisées dès le stade *blastula* mais les ARN messagers codant pour les fibronectines sont d'origine maternelle et sont stockés au cours de l'ovogenèse. Au moment où la segmentation se termine, le toit de la cavité blastocœliquale se recouvre d'une matrice fibrillaire très riche en fibronectines [23]. C'est sur ce réseau tridimensionnel de fibronectines que migrent les cellules du mésoderme formées lors du processus très complexe de la gastrulation. Des anticorps monovalents dirigés contre les fibronectines ou des peptides synthétiques contenant la séquence RGDS peuvent bloquer la migration des cellules du mésoderme ; l'embryon ne peut poursuivre son développement car les 3 feuilletts primordiaux ne peuvent se mettre en place et l'induction de la plaque neurale par le mésoderme sous-jacent ne peut se produire [24, 25].

◀ **Figure 3. Modèles hypothétiques représentant les interactions entre une molécule de fibronectine et la surface cellulaire** (d'après la référence [44]). Ces modèles sont représentés chez l'oiseau où le récepteur est composé de trois sous-unités mais ils pourraient aussi bien s'appliquer aux mammifères en utilisant un récepteur ayant deux sous-unités. La force d'interaction entre la séquence RGDS et le récepteur des fibronectines étant de faible intensité, l'hypothèse doit être émise que cette interaction est accrue et stabilisée par d'autres régions de la molécule de fibronectine. Plusieurs cas de figure sont possibles : **a.** L'interaction entre la fibronectine et son récepteur au niveau de la séquence RGDS est stabilisée par une conformation de la molécule permettant une liaison maximale à la surface cellulaire. Cette conformation peut être due à une interaction entre deux régions distinctes de la molécule. **b.** et **c.** Une autre portion de la fibronectine peut interagir avec soit le récepteur de la fibronectine lui-même (**b**), soit un autre récepteur de surface (**c**). **d.** Un autre type possible de stabilisation de la liaison entre la fibronectine et la surface cellulaire peut être réalisée grâce à un « intermédiaire ». Il pourrait s'agir, par exemple, de l'héparine. D'un côté, la fibronectine se lie à l'héparine au niveau de son site spécifique de liaison pour cette molécule. L'héparine elle-même interagit soit avec un récepteur spécifique à la surface de la cellule, soit avec la partie protéique d'un protéoglycane intégré dans la membrane cellulaire.

Les protéines représentées du côté cytoplasmique reliant le récepteur de la fibronectine aux filaments d'actine (A) sont la taline (T) et la vinculine (V).



Chez les oiseaux et chez les mammifères, les fibronectines apparaissent aussi très tôt au cours du développement [26, 27]. Une matrice extracellulaire riche en fibronectines se forme au contact des lames basales des tissus épithéliaux et dans le mésenchyme. Une situation très similaire à celle des amphibiens est observée au cours de la gastrulation dans ces deux cas. En fait, chez les mammifères, les fibronectines interviennent déjà lors de la formation de l'endoderme pariétal, c'est-à-dire lorsque ses cellules migrent le long du trophoctoderme. Ces fibronectines ne sont pas synthétisées par les cellules migrantes mais par le trophoctoderme ([27, 28] et Richoux, Boucaut, Thiery, *en préparation*). Les cellules de la crête neurale migrent aussi dans un réseau de matrice extracellulaire riche en fibronectines [29-31] (figure 4G). Ces cellules se détachent de la bordure dorsale de la plaque neurale, migrent dans de nombreux territoires de l'embryon pour se différencier en tissus conjonctifs et musculaires, mais surtout en tissus nerveux et en mélanocytes. En effet, pratiquement tout le système nerveux périphérique y compris les ganglions entériques et tous les mélanocytes dérivent des cellules de la crête neurale [32].

A tous les niveaux du névraxe, les cellules de la crête neurale restent en contact étroit avec une matrice extracellulaire contenant des fibronectines mais également de grandes quantités de collagènes et de glycosaminoglycans (figure 4G). In vitro, ces cellules peuvent aussi quitter le neuroépithélium, à condition de leur fournir un support de migration approprié (figure 4A, B). Les supports contenant en

Figure 4. **Comportement des cellules de la crête neurale sur différents substrats.** **A.** Sur un substrat de fibronectines amorphe et bidimensionnel obtenu par dépôt de fibronectines plasmatiques sur lamelle de verre, les cellules de la crête neurale quittent le tube nerveux, s'étalent et migrent activement. **B.** Dans le cas d'une matrice extracellulaire tridimensionnelle comprenant des fibronectines et obtenue à partir d'une culture de fibroblastes embryonnaires, les cellules migrent activement comme dans le cas du support de fibronectine ; cependant, elles ont une forme beaucoup plus allongée qui se rapproche de celle observée dans l'embryon. **C.** Sur un substrat formé par des anticorps anti-récepteur des fibronectines, les cellules de la crête neurale semblent comme paralysées et migrent beaucoup plus lentement que sur un substrat contenant des fibronectines. **D.** Sur un substrat de collagène, quelques cellules de la crête neurale parviennent à adhérer mais non à s'étaler et à se déplacer. **E.** Effet d'anticorps dirigés contre le domaine de liaison à la cellule sur le comportement migratoire des cellules de la crête neurale. Sur un substrat de fibronectines, ces cellules migrent en suivant une direction quasi rectiligne. Lorsque l'on ajoute au milieu de culture des anticorps monovalents anti-fibronectines (Fab' anti-FN), les cellules s'arrondissent et migrent très peu et de manière multidirectionnelle, ce qui se traduit par une distance parcourue très faible. Lorsque que l'on enlève les Fab' et que l'on rajoute des fibronectines en excès, les cellules reprennent une migration unidirectionnelle. nt = tube nerveux. **F.** Les cellules de la crête neurale, en contact avec un substrat de verre contenant des stries de fibronectines, migrent exclusivement sur ces dernières. **G.** Immunofluorescence avec des anticorps anti-fibronectines sur une coupe d'un embryon de poulet au stade de la sortie des cellules de la crête neurale au niveau troncal. Les cellules de la crête neurale (ccn) quittent le sommet du tube nerveux (tn) et suivent deux voies de migration, soit entre l'ectoderme (e) et le somite (s), soit entre le tube nerveux et le somite. Elles migrent dans une matrice extracellulaire riche en fibronectines.

particulier des fibronectines permettent une migration directionnelle des cellules de la crête neurale à condition qu'elles soient maintenues à forte densité cellulaire [33] (figure 4E, F). Par contre, les collagènes, la laminine ou les glycosaminoglycanes seuls ou en combinaison ne permettent pas aux cellules d'adhérer ni de migrer (figure 4D). Des anticorps dirigés spécifiquement contre le site de liaison des fibronectines

à la surface cellulaire, de même que des peptides synthétiques contenant la séquence RGDS, inhibent l'attachement et la migration des cellules de la crête neurale [25, 33]. De plus, des anticorps monovalents dirigés contre le récepteur cellulaire des fibronectines ont une action similaire [34]. En fait, les cellules de la crête neurale, comme la grande majorité des cellules embryonnaires, expriment des récepteurs des

fibronectines à leur surface. Cependant, les cellules capables de migrer in vitro ou in vivo gardent une distribution diffuse de leurs récepteurs pour les fibronectines à la surface cellulaire et ne retiennent pas de fibronectines à leur surface. Cette distribution est considérablement modifiée lorsque les cellules atteignent l'état stationnaire [34] (figure 5). Les récepteurs des fibronectines y sont regroupés au niveau des points d'ancrage des cellules au support ; à l'intérieur du cytoplasme, la taline, la vinculine et l'alpha-actinine s'accablent aussi dans ces sites où se forment des câbles de microfilaments d'actine et finalement des fibres de fibronectines s'accablent sur la surface cellulaire. On peut amener artificiellement des cellules mobiles à acquérir un état stationnaire en les déposant sur des supports contenant des anticorps divalents contre les récepteurs aux fibronectines. Les cellules adhèrent très bien à ce support et s'étalent, mais restent pratiquement paralysées [34] (figure 4C). Ce résultat montre que, si la force d'interaction entre les récepteurs des fibronectines et leur ligand est augmentée d'un facteur 100 (rapport des constantes de dissociation), les cellules ne peuvent plus rompre les liaisons formées. Il est possible que le regroupement naturel des récepteurs pour former des plaques adhésives permette d'augmenter l'affinité de ces récepteurs devenus immobiles dans le plan de la membrane et de compenser ainsi la faiblesse de la liaison avec le récepteur.

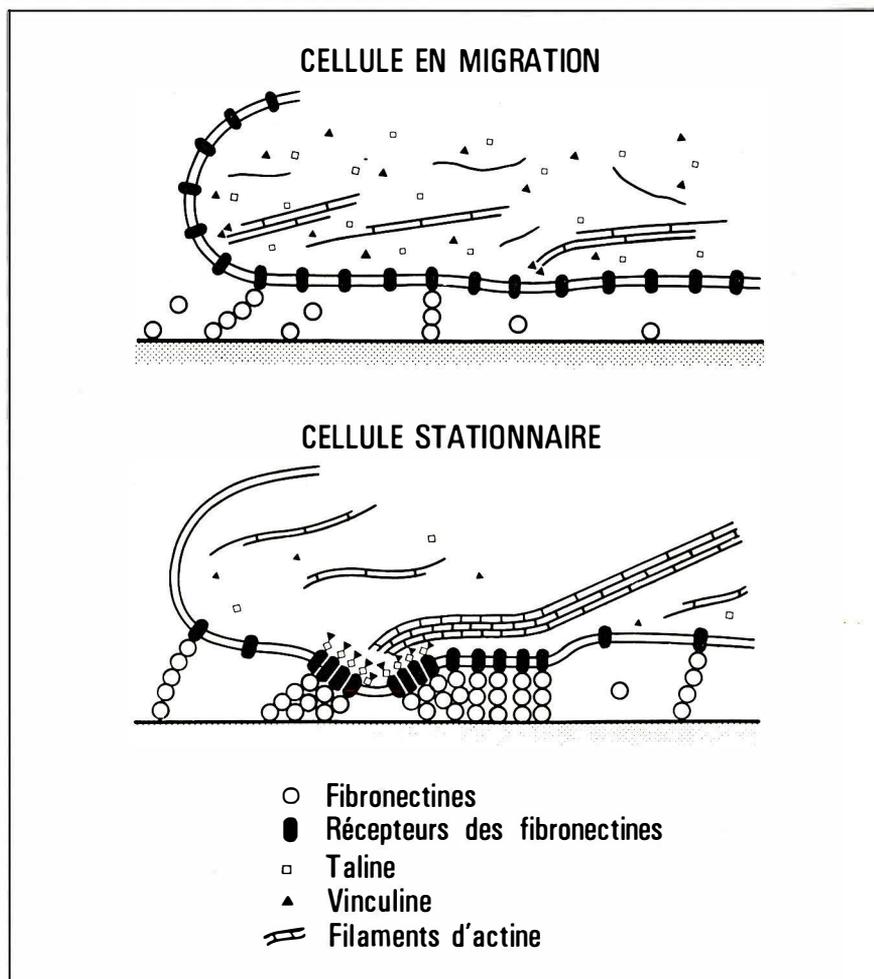


Figure 5. **Schémas spéculatifs représentant les modes d'adhérence cellule-substrat dans le cas des cellules en phase migratoire et stationnaire.** Les cellules en migration ont un cytosquelette désorganisé, elles expriment peu ou pas de fibronectines à leur surface cellulaire, les récepteurs des fibronectines ont une localisation diffuse dans la membrane et peuvent être mobiles. Dans le cas des cellules stationnaires, le cytosquelette bien organisé et les récepteurs des fibronectines sont localisés principalement aux abords des points focaux (points d'ancrage solide sur le substrat) où vraisemblablement ils sont immobilisés. Ils sont liés directement avec les fibres de fibronectines et indirectement avec le cytosquelette par l'intermédiaire de la taline et la vinculine. L'alpha-actinine représentée par les liens entre les filaments d'actine est la protéine spécifique de la jonction entre les filaments d'actine.

m/s n° 6 vol. 3, juin 87

Rôle dans la colonisation du thymus

Tout récemment, il a été possible de mettre en évidence une interaction entre les fibronectines et leurs récepteurs au cours de la colonisation du thymus par les cellules hématopoïétiques. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs pour les fibronectines leur permettant d'adhérer transitoirement à la matrice extracellulaire entourant l'épithélium thymique [35]. In vitro, les cellules

RÉFÉRENCES

30. Duband J-L, Thiery JP. Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. *Dev Biol* 1982 ; 93 : 308-23.
31. Thiery JP, Duband J-L, Delouée A. Pathways and mechanism of avian trunk neural crest cell migration and localization. *Dev Biol* 1982 ; 93 : 324-43.
32. Le Douarin NM. The Neural Crest. Cambridge : Cambridge University Press, 1982 : 259 p.
33. Rovasio RA, Delouée A, Yamada KM, Timpl R, Thiery JP. Neural crest cell migration : Requirement for exogenous fibronectin and high cell density. *J Cell Biol* 1983 : 96 : 462-73.
34. Duband J-L, Rocher S, Chen W-T, Yamada KM, Thiery JP. Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo : Location and possible role of the putative fibronectin-receptor complex. *J Cell Biol* 1986 ; 102 : 160-78.
35. Savagner P, Imhof BA, Yamada KM, Thiery JP. Homing of hemopoietic precursor cells to the embryonic thymus : Characterization of an invasive mechanism induced by chemotactic peptides. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 2715-27.
36. Cardarelli PM, Pierschbacher MD. T-lymphocyte differentiation and the extracellular matrix : Identification of a thymocyte subset that attach specifically to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2647-2751.
37. Marguerie G. Le fibrinogène : facteur multifonctionnel de l'hémostase. *médecine/sciences* 1986 ; 2 : 260-6.
38. Naidet C, Sémériva M, Yamada KM, Thiery JP. Peptides containing the cell-attachment recognition signal Arg-Gly-Asp sequence prevent gastrulation in *Drosophila* embryos. *Nature* 1987 (sous presse).
39. Akiyama SK, Yamada KM. The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 4492-500.
40. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 5985-8.
41. Pierschbacher MD, Hayman ED, Ruoslahti E. The cell attachment determinant in fibronectin. *J Cell Biochem* 1985 ; 28 : 115-26.
42. Auffray C. Un modèle moléculaire de l'interaction entre l'antigène T4 et les antigènes HLA de classe II ou le virus LAV. *CR Acad Sci Paris* 1986 ; 302 : 287-92.
43. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Wilkinson KD, Cook WJ. Three dimensional structure of ubiquitin at 2,8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 3582-5.
44. Yamada KM, Kennedy DW. Amino acid sequence specificities of an adhesive recognition signal. *J Cell Biochem* 1985 ; 28 : 99-104.

Tableau I

PROTÉINES CONTENANT LA SÉQUENCE
ARGININE-GLYCINE-ASPARTATE-SÉRINE (RGDS)
OU DES SÉQUENCES APPARENTÉES

| Séquence | Protéine |
|----------------------|---|
| RGD | - récepteur de l'EGF (epithelial growth factor) - β -transforming growth factor (TGF- β) - facteur von Willebrand - laminine |
| RGDS (active)* | - protéase alpha-lytic Myxobacter 495 - protéine récepteur du phage Lambda (<i>E. coli</i>) - polyprotéine d'enveloppe (Sindbis virus) - VPI (virus des maladies des pieds et de la bouche) - protéine basique testiculaire (rat) - fibrinogène chaîne alpha (homme) - fibronectines : site de liaison à la cellule |
| RGDA (active)* | - collagène chaîne alpha-1 (type I) (bœuf et homme) - collagène chaîne alpha-2 (type I) (poulet) - thrombine (bœuf et homme) - discoidine I, chaîne A - précurseur de la vitellogenine I (drosophile) - 3 Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (porc) |
| RGDT (active)* | - collagène chaîne alpha-2 (type I) (homme) - P1 (homme : virus de l'influenza) |
| RGDV (active)* | - second site de liaison à la cellule fibronectine de rat - vitronectine |
| RGDP (inactive)** | - collagène chaîne alpha-1 (type IV) |
| RGDK (inactive)** | - collagène chaîne alpha-2 (type I) |
| RFDS (inactive)** | - domaine alpha-1 des protéines de classe I du CMH - domaine alpha-1 des protéines de classe II du CMH - chaîne polypeptidique codée par la famille de virus HIV (SIDA) |
| SDGR (active)* | - domaine alpha-2 des protéines de classe I du CMH |
| DGR | - fibroblast growth factor (FGF) - ubiquitine |

Cette liste est tirée des références [18, 39-43] et de Pierschbacher (communication personnelle).

* Action inhibitrice des peptides sur l'attachement cellulaire à un substrat de fibronectines.

** Pas d'effet inhibiteur sur l'attachement cellulaire à un substrat de fibronectines.

hématopoïétiques sont capables d'adhérer à la surface d'une membrane basale préparée à partir d'amnios humain. Cette membrane basale peut être traversée par les cellules lorsque celle-ci est placée dans une chambre de Boyden dont le compartiment inférieur contient des peptides chimiotactiques sécrétés par l'épithélium thymique. L'adhérence des cellules hématopoïétiques à la membrane amniotique est inhibée par des anticorps anti-fibronectines, par des peptides synthétiques incluant RGDS et par des anticorps anti-récepteurs des fibronectines. De la même façon que les cellules de la gastrulation et les cellules de la crête neurale, les cellules hématopoïétiques utilisent le système fibronectines-récepteurs des fibronectines pour se déplacer dans l'embryon et en particulier pour coloniser le thymus.

Rôle dans l'hémostase

Les données acquises chez les vertébrés montrent qu'au cours de l'embryogenèse, l'interaction entre les fibronectines et leurs récepteurs est nécessaire à l'adhérence transitoire de nombreuses cellules en mouvement. Ce système de faible affinité permet effectivement aux cellules de pouvoir se transloquer et d'établir de nouveaux contacts avec leur support. Toute augmentation de l'adhésivité provoque un arrêt de la migration et le développement d'un cytosquelette organisé au niveau des points d'ancrage. Existe-t-il un système d'adhérence semblable chez l'adulte ? De nombreux éléments militent en faveur d'un tel système dans le cas des cellules hématopoïétiques [36] et en particulier pour les plaquettes. En effet, le récepteur inductible IIb/IIIa est un récepteur reconnaissant la séquence RGD contenue dans le fibrinogène, le facteur Von Willebrand, les fibronectines et la vitronectine (Tableau 1). Ce récepteur joue probablement un rôle très important dans le mécanisme d'agrégation plaquettaire et dans la formation du caillot [37].

m/s n° 6 vol. 3, juin 87

Chez les invertébrés

Grâce à de nombreuses données expérimentales, les fibronectines ont pu être mises en évidence chez les invertébrés et, en particulier, chez l'oursin où elles se trouvent principalement à la surface des cellules mésenchymateuses primaires ainsi que dans le blastocœle et sont probablement impliquées dans la formation du mésoderme primitif. En fait, des protéines porteuses de variants de la séquence RGDS existent même chez les bactéries ; il s'agit par exemple du récepteur au phage lambda. Chez la drosophile, une expérience de blocage de la morphogénèse par un peptide contenant RGDS a été réalisée avec succès [38]. Il est possible, en effet, de bloquer le développement de l'embryon au stade de la gastrulation après injection de peptides contenant RGDS. Il est donc vraisemblable qu'un système analogue à celui décrit chez les vertébrés et permettant les migrations cellulaires existe chez cet animal.

En conclusion, la séquence RGDS ou ses variants portés par le site de liaison cellulaire principal des fibronectines permet à de nombreux types cellulaires normaux ou tumoraux de se déplacer et d'adhérer transitoirement à des matrices extracellulaires contenant des fibronectines. Il n'est cependant pas exclu que d'autres protéines portant la séquence RGDS puissent jouer un rôle similaire à celui des fibronectines. De plus, il est probable que d'autres récepteurs cellulaires interagissant aussi avec d'autres sites sur les fibronectines puissent contribuer soit à une adhérence plus stable, soit à certains types de mouvements. Bien que la structure primaire des fibronectines soit connue depuis plus d'un an, il reste encore beaucoup à apprendre pour rendre compte de leurs propriétés biologiques et pour mieux définir les différents sites protéiques impliqués dans le développement embryonnaire normal, l'homéostasie et au cours de certaines maladies ■

Summary

Fibronectins are among the best known adhesive molecules and are widely distributed in the body. This class of multifunctional glycoproteins can be subdivided into two groups, soluble fibronectins and cell-associated fibrillar fibronectins, depending on their localization, physical properties, and primary structures. Soluble forms of fibronectins are found in body fluids such as plasma, cerebrospinal, and amniotic fluids. Cellular fibronectins are synthesized by a wide variety of cells ; they are organized into fibrillar structures and represent an important component of extracellular matrices. The multiplicity of fibronectin functions arises from the ubiquitous distribution of these glycoproteins and from their interactions with a variety of molecules. Indeed, fibronectins carry binding sites specific for cells, other components of extracellular matrices, and several macromolecules. The interaction between fibronectins and cells is mediated by specific cell-surface receptor complexes that interact with defined fibronectin sequences, particularly with an Arginine-Glycine-Aspartate-Serine sequence. Fibronectins and their receptors constitute a major cell-substratum adhesion system which mediates labile interactions between cells and the extracellular matrices ; this system thus plays a key role in various cell processes such as cell adhesion, cell spreading, cell morphology, and cell migration, occurring during embryogenesis and during other physiological processes.

TIRÉS A PART

S. Dufour : institut d'embryologie du Cnrs et du Collège de France, 49 bis avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex.