



HAL
open science

Etude de l'auto-assemblage de la fibronectine plasmatique humaine : mécanismes et réponses cellulaires

Rümezya Bascetin

► **To cite this version:**

Rümezya Bascetin. Etude de l'auto-assemblage de la fibronectine plasmatique humaine : mécanismes et réponses cellulaires. Biologie cellulaire. Université de Cergy Pontoise, 2014. Français. NNT : 2014CERG0704 . tel-01146807

HAL Id: tel-01146807

<https://theses.hal.science/tel-01146807>

Submitted on 29 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur
de l'Université de Cergy-Pontoise
Ecole doctorale science et ingénierie

Domaine : Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biochimie - Biologie cellulaire

Présentée par Rûmeyza BASCETIN

Le 20 Novembre 2014

Sur le sujet

Etude de l'auto-assemblage de la fibronectine plasmatique humaine : Mécanismes et réponses cellulaires

Équipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule, EA 1391

Membres du jury :

Franz Bruckert	Professeur, Institut National Polytechnique de Grenoble	Rapporteur
Maxime Lehmann	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
Muriel Vayssade	Maître de conférences, Université de Technologie de Compiègne	Examinatrice
Olivier Gallet	Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Directeur de thèse
Johanne Leroy-Dudal	Maître de conférences, Université de Cergy-Pontoise	Encadrante
Charlotte Vendrely	Maître de conférences, Université de Cergy-Pontoise	Encadrante

*« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais pas »
Socrate*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), dans le groupe thématique Matrice Extracellulaire-Comportement cellulaire et Physiopathologie (MEC-uP), à l'Université de Cergy-Pontoise.

Cette étude a été effectuée d'une part grâce au financement d'un contrat doctoral de l'Université de Cergy-Pontoise et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, et d'autre part, à l'aide d'un financement de l'Agence Nationale de la Recherche pour le programme GreenFib.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux rapporteurs pour avoir accepté de juger ce travail : le Professeur Franz Bruckert responsable de l'équipe Interfaces entre Matériaux et Matière Biologique (UMR 5628) de l'Université de Grenoble Alpes, et le Professeur Maxime Lehmann chercheur au laboratoire de biophotonique et pharmacologie (UMR 7213) à l'Université de Strasbourg.

Je remercie également le Docteur Muriel Vayssade, chercheuse au laboratoire de BioMécanique et Bioingénierie (UMR 7338) à l'Université de Technologie de Compiègne d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Je remercie les deux directeurs successifs, les Professeurs Véronique Larreta-Garde et Olivier Gallet, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire ERRMECe.

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Professeur Olivier Gallet, et mes co-encadrantes, les Docteurs Johanne Leroy-Dudal et Charlotte Vendrely, pour m'avoir accordé leur confiance en me laissant mener ce projet de doctorat. Merci de m'avoir guidé et aidé au cours des différentes étapes de cette thèse. Merci de m'avoir transmis votre savoir-faire, vos connaissances et votre façon de travailler méticuleuse. Merci pour les différents encouragements dans les moments difficiles au cours de ce doctorat. Je vous remercie également pour les nombreuses chances de congrès que vous m'avez offertes sans lesquelles je n'aurais pas pu m'ouvrir vers l'extérieur. Merci car je pense que cette opportunité de thèse m'a permis d'évoluer et de m'améliorer professionnellement mais aussi humainement.

Je tiens également à remercier Rémy sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Merci pour ta présence, ton aide, tes conseils perpétuels et ton travail acharné au cours de ces trois ans. Un grand merci, car sans toi, je n'aurais pas pu purifier la fibronectine, qui est le protagoniste majeur de ma thèse.

Je remercie également fortement Thomas Boudou et l'ensemble de son laboratoire des Matériaux et du Génie Physique, Tristan Doussineau de l'institut Lumière Matière, Vincent Forge du laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Alexandre Chenal de l'unité Biochimie des Interactions Macromoléculaires et Sébastien Peralta du laboratoire de Physicochimie de Polymères et des Interfaces pour leur collaboration qui m'ont permis d'obtenir des résultats plus qu'importants pour mon travail de doctorat.

Je remercie Sabrina qui m'a formé à la culture cellulaire et qui a toujours eu des petits mots de réconfort mais qui ont, finalement, été un grand soutien moral depuis mon Master 2.

Je remercie également Franck Carreiras, le directeur du groupe thématique Matrice Extracellulaire-Comportement cellulaire et Physiopathologie, pour m'avoir accueilli dans son groupe.

Merci pour les différents conseils scientifiques et humains. Merci également, car sans votre aide, je sais que je n'aurais pas pu participer aux différentes opportunités de congrès.

Je remercie également les différents membres du groupe thématique Matrice Extracellulaire-Comportement cellulaire et Physiopathologie - Cédric, Sabrina, Lyvia, Hamanou - qui ont pu laisser certaines opportunités à la petite thésarde que j'ai été. Merci pour votre aide et vos conseils.

Merci Michel pour avoir participé, pendant mon stage de Master 2 mais également pendant les trois ans de thèse, au développement de la personne que je suis actuellement.

Merci à Emmanuel Pauthe pour m'avoir pris d'abord en stage de Master 1 puis pour son aide discrète et sa convivialité.

Merci aussi à Véronique Larreta-Garde pour m'avoir pris en stage de Master 2 et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet à l'interface cellule-matériaux. Merci car cette opportunité m'a donné l'envie de continuer à travailler à cette interface cellule-environnement.

Merci à Patrick Dimartino pour sa convivialité et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier vivement Laurent, Pierre et Ludovic, les anciens thésards avec qui nous avons partagé le bureau des thésards. Merci pour toutes les aides scientifiques, les soutiens moraux et les moments conviviaux que nous avons passés au sein du laboratoire.

Je remercie bien sûr Elodie, Eléonore et Lyvia pour avoir participé à la bonne ambiance du bureau des THESARDES. Merci pour les soutiens scientifiques mais surtout moraux. Merci pour votre amitié qui a été et restera important à mon cœur. Merci pour toutes les minutes culturelles qui ont apporté la bonne humeur au cours des trois années de thèse.

Merci Marie et Julie, les plus jeunes thésardes, pour avoir participé à la formation et à la bonne ambiance du bureau des THESARDES.

Je remercie également Isabelle tout d'abord pour sa gentillesse puis pour son travail méticuleux. Je te remercie pour toutes les aides que tu m'as fournies et sans quoi je n'aurais pas pu résoudre les problèmes administratifs. Merci pour avoir pris le temps de m'expliquer certains rouages de l'administration.

Adeline, Gilles, Damien et Agnès, Merci pour votre bonne humeur.

Je remercie Mathilde, Lamia, Christophe, Cécile et Elodie, les membres du staff technique qui ont apporté leur efficacité, leur aide et leur convivialité.

Je remercie également les différents membres du département de Biologie de l'Université de Cergy-Pontoise - Caroline, Karine et Bruno - les membres de la prépa bio pour leur gentillesse et leur aide efficace et permanente.

Enfin, je remercie ma famille - ma maman, mon papa, ma sœur, mes petits frères - ainsi que mes amis pour leur encouragement et leur soutien. Mais surtout merci pour votre réconfort, votre patience et vos efforts de compréhension pendant les 3 ans de thèse au cours desquels je n'ai pas pu être présente comme je l'aurais souhaité. Merci pour votre présence perpétuelle sans laquelle je ne serais pas arrivée au bout de ce travail.

RESUME

La matrice extracellulaire est un réseau enchevêtré de macromolécules variées, en étroite relation avec les cellules qu'elle environne. Les interactions bidirectionnelles qui s'établissent entre les cellules et leur microenvironnement matriciel régulent mutuellement leur comportement et devenir. La diversité biochimique des constituants moléculaires de la matrice, leurs propriétés biophysiques, leur architecture tout comme leur dynamique représentent autant de signaux régulateurs. Parmi les constituants de la matrice, la fibronectine (FN) est une glycoprotéine structurale et fonctionnelle majeure intervenant dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ces fonctions diverses sont directement liées à la dynamique structurale de cette protéine et à sa capacité à interagir avec les autres molécules matricielles, dont elle-même. Retrouvée sous forme soluble dans les fluides biologiques, la FN est incorporée dans les matrices insolubles sous forme d'assemblages supramoléculaires principalement fibrillaires mais aussi sous forme d'agrégats. Ces assemblages sembleraient être impliqués dans des processus physiologiques et pathologiques distincts.

Si l'étude des assemblages de FN est rendue possible par l'élaboration de modèles *in vitro*, les mécanismes de polymérisation et l'effet d'assemblages de structures définies sur le comportement cellulaire restent cependant à mieux élucider et constituent le cœur de ce travail.

Les travaux ont donc consisté à élaborer des assemblages de FN, à caractériser les mécanismes et structures impliqués dans leur polymérisation, et à étudier leur influence sur un modèle de cellules cancéreuses ovariennes. D'autre part, des études préliminaires comparatives ont été menées avec un analogue végétal de la FN.

L'irréversibilité de la dénaturation thermique de la FN entraîne la formation d'agrégats de type amyloïde. Deux populations d'agrégats coexistent en solution. Cette agrégation est corrélée à une diminution de l'accessibilité des sites de liaison à la gélatine et des sites RGD, et à une diminution de l'incorporation dans les réseaux matriciels. De plus, si la FN sous sa forme agrégée n'est pas cytotoxique pour les cellules étudiées, la modification de la conformation de la FN favorise leur migration isolée et aléatoire.

Ces résultats soulèvent la question de l'implication de ces agrégats de FN dans des processus pathologiques tels que le développement tumoral.

Mots clés

matrice extracellulaire, fibronectine, auto-assemblage, migration cellulaire, cellule cancéreuse, analogue végétal de la fibronectine

ABSTRACT

Extracellular matrix is a complex meshwork of various macromolecules that have a tight relationship with the surrounding cells. Bidirectional interactions between cells and the microenvironment control their respective behaviors and fate. The biochemical diversity of matrix molecular components, their biophysical properties, their architecture but also their dynamic represent as many regulator signals. Among the components of the matrix, fibronectin (FN) is a major structural and functional glycoprotein involved in numerous physiological and pathological processes. These various functions are directly linked to the structural dynamic of this protein and its ability to interact with others matrix components, in particular with itself. Found as a soluble protein in biological fluids, FN is also incorporated in insoluble matrix as supramolecular assemblies, mainly fibrils but also aggregates. These assemblies could be involved in distinct physiological and pathological processes. If the study of the assembly of the FN is possible with the help of *in vitro* models, the mechanism of polymerization and the effects of defined assemblies on the cell behavior still have to be better defined.

Therefore, this work consisted in elaborating FN assemblies, in characterizing the mechanisms and structures involved in their polymerization and in studying their influence on behaviors of a model of ovarian cancer cells. Besides, preliminary comparative studies have been performed with a plant analogous of FN.

We show that irreversible thermal unfolding of FN triggers amyloid-like aggregation. Two states of aggregates could coexist in solution. FN aggregation correlates with a decrease of gelatin-binding domain and RGD sequence accessibility, and a decrease of the incorporation in the matrix network. Moreover, if aggregates are not cytotoxic for the studied cells, conformation change of FN promotes their single-cell and random migration.

These results raise questions about the role of FN aggregates in pathological processes like tumor development.

Keywords

extracellular matrix, fibronectin, self-assembly, cell migration, cancer cell, fibronectin plant analogous

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Résumé	
Table des matières	
Liste des abréviations	15
Table des figures et tableaux	17
Liste des communications et collaborations	21
Introduction	23
Revue bibliographique	27
Partie 1 : Microenvironnement matriciel et Réponses cellulaires	29
I. La matrice extracellulaire	32
<i>I. A. Composition moléculaire de la matrice extracellulaire</i>	<i>32</i>
I. A. 1. Les protéines fibreuses : organisation structurale et élasticité de la matrice	32
I. A. 2. Les polysaccharides matriciels : résistance de la matrice et réservoir de molécules bioactives	33
I. A. 3. Les glycoprotéines : cohésion de la matrice	35
I. A. 4. Les protéines associées à la matrice : organisation de la matrice et régulation des comportements cellulaires	36
<i>I. B. Dynamique de la matrice</i>	<i>38</i>
I. B. 1. Dépôt des protéines matricielles	38
I. B. 2. Activité cryptique des molécules de la matrice	38
I. B. 3. Restructuration des matrices	39
II. Interactions cellules-matrice et comportement cellulaire	41
<i>II. A. Les récepteurs cellulaires : intermédiaires entre matrice et cellules</i>	<i>41</i>
II. A. 1. Les protéoglycanes transmembranaires	41
II. A. 2. Les récepteurs spécifiques des molécules matricielles : les intégrines	41
II. A. 3. Dynamique des structures d'adhérence	43
<i>II. B. Signalisation matrice-dépendante et réponse cellulaire</i>	<i>45</i>
II. B. 1. Rôle des intégrines dans la signalisation : activation et interaction avec le ligand	45
II. B. 2. Signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule	46
II. B. 3. Différentes réponses cellulaires	47
III. Matrice extracellulaire et migration cellulaire	50
<i>III. A. Morphologie de la cellule en migration</i>	<i>50</i>
<i>III. B. Les différents types de migration</i>	<i>51</i>
III. B. 1. La migration isolée vs collective	51
III. B. 2. Migration directionnelle vs aléatoire	53
III. B. 3. Stratégies migratoires	54
<i>III. C. Mécanismes de migration cellulaire et signalisations associées</i>	<i>55</i>
III. C. 1. Les étapes du processus migratoire	55
III. C. 2. Transition épithélio-mésenchymateuse	56

III. C. 3. Signalisations et mécanismes régulateurs de la migration	56
Partie 2 : Dynamique structurale et Assemblages des protéines	63
I. Le repliement des protéines – généralités	65
I. A. <i>Les chemins de repliement et l'état natif des protéines</i>	65
I. B. <i>Systèmes de contrôle du repliement des protéines</i>	66
I. B. 1. Facteurs intrinsèques aux protéines	66
I. B. 2. Protéines chaperonnes	67
I. B. 3. Systèmes de dégradation des protéines mal repliées	67
I. B. 4. Contrôle qualité des protéines extracellulaires	68
II. Assemblages des protéines	70
II. A. <i>Types d'assemblage</i>	70
II. B. <i>Mécanismes d'assemblage</i>	72
II. B. 1. La polymérisation nucléation-dépendante	72
II. B. 2. La polymérisation isodesmique	73
II. C. <i>Stabilité des assemblages</i>	74
II. C. 1. Les interactions intra et intermoléculaires	74
II. C. 2. Rôle des interactions dans l'assemblage	75
II. C. 3. Facteurs extérieurs influençant la polymérisation	76
III. Les assemblages amyloïdes	78
III. A. <i>Caractéristiques</i>	78
III. B. <i>Mécanisme de formation</i>	80
III. C. <i>Origine de la cytotoxicité</i>	80
Partie 3 : La (les) fibronectine(s)	83
I. Caractéristiques de la fibronectine	85
I. A. <i>La fibronectine, une glycoprotéine modulaire</i>	86
I. A. 1. Les modules constitutifs de la fibronectine	86
I. A. 2. Les modules variables EDA, EDB, IIICS	87
I. B. <i>Les modules d'interaction de la fibronectine</i>	88
I. B. 1. Les modules d'interaction fibronectine-molécules matricielles	88
I. B. 2. Les modules d'interaction fibronectine-fibronectine	89
I. B. 3. Les séquences d'interaction fibronectine-cellules	90
I. C. <i>Modifications post-traductionnelles de la fibronectine</i>	90
II. Fibronectine matricielle et réponse cellulaire	93
II. A. <i>La fibronectine au sein des matrices extracellulaires</i>	93
II. A. 1. Organisation et stabilisation de la matrice	93
II. A. 2. Dynamique de la fibronectine dans la matrice extracellulaire	93
II. A. 3. Les fragments cryptiques de la fibronectine	94
II. B. <i>Interaction fibronectine-cellule</i>	95
II. B. 1. Structures d'interaction cellule-fibronectine	95
II. B. 2. Rôle de la fibronectine dans la migration cellulaire	96
II. C. <i>Substitut vert de la fibronectine : analogue végétal des protéines animales</i>	98
III. Assemblages de fibronectine	100

III. A.	<i>La fibrillogenèse : assemblage induit par les cellules</i>	100
III. B.	<i>Le maintien de la structure fibrillaire des fibres de fibronectine et leur extensibilité</i>	102
III. C.	<i>Autres types d'assemblage de la fibronectine</i>	103
III. D.	<i>Etudes in vitro d'assemblages de la fibronectine</i>	104
	Objectifs et stratégie de la thèse	107
	Section expérimentale	111
I.	Purification, assemblage & caractérisation de la fibronectine	113
I. A.	<i>Purification de la fibronectine</i>	113
I. B.	<i>Conditions d'assemblage de la fibronectine</i>	114
I. C.	<i>Caractérisation des mécanismes et structures d'assemblage de la fibronectine</i>	119
I. C. 1.	Fluorescence intrinsèque des tryptophanes	119
I. C. 2.	Test d'incorporation de la thioflavine T	119
I. C. 3.	Test à l'acide 8-anilino-1-naphtalenesulfonique	121
I. C. 4.	Microscopie à force atomique en milieu liquide	122
I. C. 5.	Infrarouge à Transformée de Fourier	123
I. C. 6.	Dichroïsme circulaire	123
I. C. 7.	Spectrométrie de masse à ionisation par électronébuliseur et par détection de charge (ESI-CDMS)	125
I. C. 8.	Électrophorèse- Coloration au bleu de Coomassie	126
II.	Etude des fonctions biologiques de la fibronectine	126
II. A.	<i>Cultures cellulaires</i>	126
II. B.	<i>Cytotoxicité des tampons sur les cellules</i>	127
II. C.	<i>Cytotoxicité de la fibronectine</i>	127
II. D.	<i>Accessibilité des sites de liaison de la fibronectine à ses partenaires</i>	127
II. D. 1.	Accessibilité des sites d'affinité à la gélatine	127
II. D. 2.	Dosage immunoenzymatique de l'accessibilité de la séquence RGD (ELISA)	127
II. E.	<i>Test d'adhérence sur coating ou avec apport exogène de fibronectine</i>	128
II. F.	<i>Étalement cellulaire sur coating ou avec apport exogène de fibronectine</i>	129
II. G.	<i>Analyse de la migration cellulaire</i>	129
II. H.	<i>Pulse-chasse des intégrines lors de la migration</i>	131
II. I.	<i>Incorporation matricielle de la fibronectine</i>	131
II. J.	<i>Protocole de marquage des cellules</i>	131
II. K.	<i>Statistiques</i>	132
	Résultats-Discussion	137
	Partie 1 : Etude des mécanismes d'assemblage de la fibronectine	139
I.	Dénaturation thermique de la fibronectine	141
II.	Caractérisation des assemblages de la fibronectine	144
II. A.	<i>Caractérisation morphologique</i>	144
II. A. 1.	Analyse de masse et charge	144
II. A. 2.	Analyse de morphologie	146
II. B.	<i>Caractérisation conformationnelle</i>	148
II. B. 1.	Environnement des acides aminés aromatiques	148

II. B. 2.	Importance des ponts disulfures	150
II. B. 3.	Rôle des interactions hydrophobes	151
II. B. 4.	Rôle des feuillets β	152
II. B. 5.	Stabilité des assemblages	155
III.	Cinétique d'assemblage de la fibronectine	157
III. A.	<i>Cinétique d'assemblage concentration dépendante</i>	157
III. B.	<i>Cinétique d'assemblage température induite</i>	159
III. B. 1.	Analyse par SDS-PAGE	159
III. B. 2.	Cinétique d'assemblage suivie par fluorescence de la thioflavine T	161
III. B. 3.	Cinétique suivie par fluorescence de l'ANS et des tryptophanes	164
Partie 2 : Etude de la fonctionnalité et de l'influence des agrégats de fibronectine sur le comportement cellulaire		167
I.	Caractérisation de l'accessibilité des sites de liaison de la fibronectine	169
I. A.	<i>Accessibilité du domaine d'affinité pour la gélatine</i>	169
I. B.	<i>Accessibilité de la séquence RGD</i>	170
II.	Caractérisation de l'influence des agrégats de fibronectine sur les cellules	172
II. A.	<i>Analyse de la viabilité cellulaire</i>	172
II. B.	<i>Analyse de l'incorporation matricielle</i>	174
II. C.	<i>Analyse de l'adhérence et de l'étalement cellulaire</i>	176
III.	Caractérisation de l'influence des agrégats de fibronectine sur la migration cellulaire	181
III. A.	<i>Comblement de blessure par les cellules SKOV3</i>	181
III. B.	<i>Analyse du profil de migration</i>	182
III. C.	<i>Localisation des intégrines de la famille αv et β1 au cours de la migration</i>	186
Conclusion - Perspectives		189
Références bibliographiques		195
Articles soumis		217

LISTE DES ABREVIATIONS

A_{DAM} : **a** disintegrin and metalloproteinase

ADAMTS : **a** disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

ANS : 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (acide 8-anilino-1-naphtalenesulfonique)

B_{iP} : **b**inding protein (protéine de liaison, protéine chaperonne)

D_{API} : 4,6-**d**iamino-2-**p**henylindol dihydrochloride

DOC : **d**eoxycholate

E_{DTA} : ethylend**d**iamintetra**a**cetic (éthylène diamine tétra acétique)

EGF : epithelial **g**rowth **f**actor (facteur de croissance épithélial)

F_{AK} : focal **a**dhesion **k**inase (protéine kinase des contacts focaux)

FB : facteur bioactif

FGF : **f**ibroblast **g**rowth **f**actor (facteur de croissance des fibroblastes)

FN : **f**ibronectine

G_{AGs} : glycosaminoglycans

GBD : **g**elatin **b**inding **d**omain (domaine de liaison à la gélatine)

Gly : **g**lycine

H_{EPES} : 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)

Hsp : **h**eat **s**hock **p**rotein (protéine de choc thermique)

L_{OX} : lysyl **o**xydase

M_{EC} : **m**atrice **e**xtracellulaire

MMP : **m**atrix **m**etalloproteinase (métalloprotéase matricielles)

P_{BS} : **p**hosphate **b**uffer **s**aline (tampon phosphate salin)

PAI : **p**lasminogen **a**ctivator **i**nhibitor (inhibiteur de l'activateur du plasminogène)

PGs : **p**rotéoglycans

Phe : **p**hénylalanine

PND : **p**olymérisation **n**ucléation-**d**épendante

S_{VF} : sérum de veau fœtal

T_{BS} : TRIS buffer saline (tampon TRIS salin)

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TGase : transglutaminase

TGF α : tissu growth factor α (facteur de croissance tissulaire α)

TGF β : tissu growth factor β (facteur de croissance tissulaire β)

TTBS : tween TRIS buffer saline (tampon TRIS-tween salin)

ThT : thioflavine T

TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases)

TRIS : trishydroxyméthylaminométhane (trishydroxyméthylaminométhane)

Trp : tryptophane

Tyr : tyrosine

U_{PA} : urokinase plasminogen activator (activateur du plasminogène urokinase)

α -SMA : α smooth muscle actin

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Exemples de glycoprotéines circulantes et matricielles.....	35
Tableau 2 : Exemples d'enzymes liantes et dégradantes	37
Figure 1 : Représentation des fibres de collagène	33
Figure 2: Représentation des protéoglycanes et glycosaminoglycanes	34
Figure 3 : Exemples de glycoprotéines.....	35
Figure 4 : Réorganisation du réseau matriciel de collagène au cours du développement tumoral	39
Figure 5 : Classification des intégrines.....	42
Figure 6 : Intégrines avec et sans domaine I.....	43
Figure 7 : Représentation des structures d'adhérence	44
Figure 8 : Les différents type de structure d'adhérence.....	45
Figure 9 : Activation des intégrines	46
Figure 10 : Voies de signalisation induites suite à la liaison intégrine-matrice	47
Figure 11 : Morphologie de la cellule en migration	51
Figure 12 : Types de migration collective.....	52
Figure 13 : Représentation de la migration directionnelle et aléatoire.....	53
Figure 14 : Stratégies de migration.....	54
Figure 15 : Etapes majeures de la migration cellulaire.....	55
Figure 16 : Phénotype des cellules épithéliales et mésenchymateuses.....	56
Figure 17 : Contrôle de la polarité des cellules pendant la migration par les Rho GTPases.....	57
Figure 18 : Régulation de l'internalisation des intégrines par l'endocytose clathrine-dépendante	58
Figure 19 : Le trafic des intégrines et la migration directionnelle.....	59
Figure 20 : Inhibition de contact lors de la migration	60
Figure 21 : Inhibition de contact hétérotypique	60
Figure 22 : Chemins de repliement des protéines.....	66
Figure 23 : Système ubiquitine-protéasome.....	68
Figure 24 : Exemples de structures supramoléculaires des protéines	71
Figure 25 : Polymérisation nucléation-dépendante.....	73
Figure 26 : Polymérisation isodesmique	74
Figure 27 : Structure commune aux assemblages amyloïdes	79
Figure 28 : Modèle d'interactions des fibres amyloïdes avec les membranes cellulaires	81
Figure 29 : Structure de la fibronectine.....	86
Figure 30 : Structure des modules de type I, II et III de la fibronectine.....	87
Figure 31 : Séquences d'interaction de la fibronectine à différentes molécules.....	89
Figure 32 : Modules d'interaction de la fibronectine avec les récepteurs cellulaires.....	90
Figure 33 : Représentation de la matrice extracellulaire végétale	98
Figure 34 : Réseau fibrillaire de fibronectine.....	100
Figure 35 : Etapes principales de la fibrillogenèse	101
Figure 36 : Représentation du dépliement des modules de types III de la fibronectine.....	105

SECTION EXPERIMENTALE

Tableau 3 : Taux de purification de la fibronectine.....	114
Figure 37 : Incorporation de la thioflavine T dans la fibronectine en présence de différents tampons	116
Figure 38 : Effet de différents tampons sur la viabilité des cellules SKOV3	116
Figure 39 : Etude de l'effet de la vitesse d'agitation sur l'assemblage de la fibronectine.....	117
Figure 40 : Concentration de la fibronectine avant et après assemblage	118
Figure 41 : Emission de fluorescence de la ThT suite à la dilution de la fibronectine.....	118
Figure 42 : Représentation de la molécule de thioflavine T.....	119
Figure 43 : Intensité de fluorescence de la thioflavine T.....	121
Figure 44 : Représentation de l'acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique	121
Figure 45 : Représentation du microscope à force atomique	122
Figure 46 : Principe du dichroïsme circulaire.....	124

RESULTATS-DISCUSSION

Figure 47 : Dénaturation thermique de la fibronectine suivie par dichroïsme circulaire en UV lointain ..	142
Figure 48 : Analyse des agrégats de fibronectine par spectrométrie de masse.....	145
Figure 49 : Analyse morphologique de la fibronectine native ou assemblée par AFM en milieu liquide...	146
Figure 50 : Spectres de fluorescence intrinsèque et dichroïsme circulaire en UV proche de la fibronectine native ou assemblée.....	149
Figure 51 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la fibronectine native ou assemblée	151
Figure 52 : Spectre de fluorescence de l'ANS en présence de fibronectine native ou assemblée	152
Figure 53 : Spectre infrarouge à transformée de Fourier de la fibronectine native et assemblée.....	153
Figure 54 : Spectre de fluorescence de la thioflavine T en présence de fibronectine native ou assemblée	154
Figure 55 : Fluorescence de la thioflavine T en présence de fibronectine native ou assemblée au cours du temps de stockage et profil électrophorétique	155
Figure 56 : Effet de la concentration sur l'assemblage de la fibronectine	158
Figure 57 : Analyse par électrophorèse de la cinétique d'assemblage de la fibronectine	160
Figure 58 : Effet de la température sur l'assemblage et l'énergie d'activation de la fibronectine	163
Figure 59 : Incorporation de l'ANS au cours de l'assemblage de la fibronectine.....	164
Figure 60 : Fluorescence des tryptophanes au cours de l'assemblage de la fibronectine	165
Figure 61 : Accessibilité des sites d'affinité à la gélatine de la fibronectine native ou agrégée	169
Figure 62 : Accessibilité de la séquence RGD de la fibronectine native ou agrégée	170
Figure 63 : Viabilité des cellules cancéreuses SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée	173
Figure 64 : Formation <i>in vitro</i> du réseau matriciel de fibronectine en présence ou non de fibronectine native ou agrégée	175
Figure 65 : Adhérence et étalement des cellules SKOV3 sur coating de fibronectine native ou agrégée ...	177
Figure 66 : Adhérence des cellules SKOV3 avec apport exogène en solution de fibronectine native ou agrégée	178
Figure 67 : Morphologie des cellules SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée	179
Figure 68 : Pourcentage de comblement par les cellules en présence de fibronectine native ou agrégée	181
Figure 69 : Marquage des cellules en migration en présence de fibronectine native ou agrégée.....	182
Figure 70 : Profil de migration et champ de déplacement des cellules SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée	183

Figure 71 : Distance parcourue et vélocité des cellules SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée	184
Figure 72 : Localisation des intégrines de la famille αv et $\beta 1$ dans les cellules en migration en présence de fibronectine native ou agrégée	187

LISTE DES COMMUNICATIONS ET COLLABORATIONS

- **Publications**

Unfolding of plasma Fibronectin leads to the formation of amyloid-like aggregates, Rümezya Bascetin, Khadija Admane, Rémy Agniel, Thomas Boudou, Tristan Doussineau, Rodolphe Antoine, Olivier Gallet, Johanne Leroy-Dudal, Charlotte Vendrely (*Soumis*, Journal of Molecular Biology)

Amyloid-like aggregates of Fibronectin display altered cell interactions and promote scattered migration of SKOV3 ovarian cancer cells, Rümezya Bascetin, Rémy Agniel, Olivier Gallet, Johanne Leroy-Dudal, Charlotte Vendrely (*Manuscrit en préparation*)

Lectins as probes to assess glycosylation accessibility of Fibronectin related to its folding dynamic, Rémy Agniel, Charlotte Vendrely, Laurent Poulouin, Rümezya Bascetin, Hamanou Benachour, Olivier Gallet, Johanne Leroy-Dudal (*Pré-soumis*, ACS Chemical Biology)

- **Communications orales**

Fibronectin self-assembly and influence on cell behaviour, Bascetin Rümezya
XXIst Annual meeting of the French Society of Extracellular Matrix Biology (SFBMEC)
Strasbourg, France, 21-23 Mars 2013

Fibronectin assemblies and influence on cell behaviour, Bascetin Rümezya
50th anniversary of the French Society of the extracellular matrix (SFMEC)
Paris, France, 29-30 Mars 2012

- **Communications par affiche**

Fibronectin amyloid-like aggregates promote random migration of cancer cells, Bascetin Rümezya, Agniel Rémy, Doussineau Tristan, Boudou Thomas, Carreiras Franck, Vendrely Charlotte, Leroy-Dudal Johanne, Gallet Olivier
1st Matrix Biology Europe Conference (MBE)
Rotterdam, Netherlands, 21-24 Juin 2014

Fibronectin amyloid-like aggregates formation and influence on the cell behavior, Bascetin Rümezya, Admane Kadija, Agniel Rémy, Pauthe Emmanuel, Carreiras Franck, Leroy-Dudal Johanne, Vendrely Charlotte, Gallet Olivier
Spetsai summer school on Protein interactions, assemblies and human disease (EMBO, FEBS, IUMB)
Spetses, Greece, 16-26 Spetembre 2013

- **Collaborations**

Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP), CNRS, UMR 7361, *Grenoble, France*

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM), CEA, UMR 5249, *Grenoble, France*

Institut Lumière Matière (ILM), CNRS, UMR 5306, *Lyon, France*

Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), CNRS, UMR 7361, *Mulhouse, France*

Laboratoire Polymères Biopolymères Surface (PBS), CNRS, UMR 6270, *Rouen, France*

Unité Biochimie des Interactions Macromoléculaires (BIM), Institut Pasteur, *Paris, France*

Laboratoire de Physicochimie de Polymères et des Interfaces (LPPI), EA 2528, *Cergy, France*

INTRODUCTION

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau enchevêtré de macromolécules variées, en étroite relation avec les cellules qu'elle environne. Les interactions bidirectionnelles qui s'établissent entre les cellules et leur microenvironnement matriciel régulent mutuellement leur comportement et devenir. Les cellules synthétisent et organisent cette MEC, et en retour, la nature de chacune des molécules matricielles et leur concentration respective fournissent des signaux biochimiques aux cellules. Les composants matriciels adoptent également différentes conformations et différentes organisations structurales générant des signaux topographiques. Les molécules de la MEC présentent des conformations structurales en perpétuelle dynamique en réponse aux variations physiologiques et/ou pathologiques des caractéristiques biochimiques de l'environnement telles que le pH, et également en réponse aux mouvements cellulaires tels que la migration et la protéolyse associée. En outre, les molécules matricielles interagissent au sein des MECs pour former des assemblages et auto-assemblages également très labiles. Cependant, le rôle régulateur qu'exercent ces assemblages sur la réponse cellulaire reste encore à mieux élucider.

Ainsi, dans notre travail, nous nous intéressons à cette relation étroite qui existe entre l'organisation supramoléculaire des molécules matricielles et leur fonction biologique qui permet de réguler le comportement cellulaire.

Dans notre étude, nous étudions plus particulièrement une des glycoprotéines des MECs : la fibronectine. Elle correspond à une glycoprotéine structurelle et fonctionnelle importante de la matrice. En effet, elle contribue à l'organisation et à la stabilisation de la matrice. De plus, elle est également impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques (réparation tissulaire ou développement tumoral par exemple). Cette protéine, dimérique et soluble dans les liquides biologiques, peut former des assemblages supramoléculaires fibrillaires dans les MECs. Outre leur incorporation, médiée par les cellules, dans les réseaux matriciels sous forme de fibres, des études récentes tendent à montrer *in vivo* sa présence sous forme d'assemblages de type agrégat dans des conditions pathologiques. En revanche, l'influence de ces agrégats sur le comportement cellulaire est peu connue.

L'objectif du travail de thèse est donc (i) de déterminer si la fibronectine peut s'auto-assembler sous forme d'agrégats, (ii) de caractériser les modifications de structures et les mécanismes impliqués dans ce processus d'assemblage et enfin (iii) d'étudier leur influence sur le comportement cellulaire. Cette étude pourrait permettre de mieux appréhender l'effet de la conformation des protéines matricielles au cours de processus physiopathologiques.

La première section de ce manuscrit, la revue bibliographique, est constituée de trois parties. La première partie décrit la complexité du microenvironnement matriciel et des réponses cellulaires associées. Le microenvironnement est un réseau dynamique et enchevêtré de macromolécules variées. L'interaction de la matrice avec les cellules est médiée par les récepteurs membranaires et mène à différents comportements cellulaires. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur la migration. La deuxième partie de la bibliographie expose les mécanismes généraux de repliement des protéines. Certains systèmes de contrôle de ce repliement sont ensuite décrits avant de présenter les mécanismes de polymérisation des protéines. Les assemblages de type amyloïde nous

intéresserons plus spécifiquement. La dernière partie présente en détails la structure, l'assemblage et les rôles fonctionnels de la fibronectine au sein des matrices extracellulaires et son influence sur le comportement cellulaire.

La deuxième section du manuscrit correspond à la section expérimentale où sont décrits les protocoles expérimentaux et les mises au point préalables à l'étude.

Enfin la troisième section du manuscrit présente et discute les résultats obtenus à l'issue des travaux de thèse. Cette section est constituée de deux parties. La première présente la caractérisation des assemblages de fibronectine. Dans cette démarche, nous avons élaboré un modèle *in vitro* d'assemblage de la fibronectine à partir duquel la morphologie des assemblages de fibronectine a été analysée. Les changements de structures et les mécanismes de polymérisation permettant l'assemblage de la fibronectine ont été déterminés. La deuxième partie présente l'étude des fonctions biologiques de la fibronectine. L'effet de son assemblage sur : la viabilité cellulaire, son incorporation dans les matrices cellulaires, l'adhérence, la morphologie et la migration cellulaire est étudié. L'ensemble des résultats apporte des données sur la relation structure-fonction de la fibronectine.

Les différentes références bibliographiques citées dans ce travail ainsi que les articles soumis ou en cours de soumission sont répertoriés à la fin de ce manuscrit.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : MICROENVIRONNEMENT MATRICIEL ET REPONSES CELLULAIRES

PREAMBULE :

Les tissus d'un organisme, décrits pour la première fois au XVIIIème siècle par Marie François Xavier Bichat, sont constitués de **cellules** enveloppées dans une **matrice extracellulaire** (MEC). Au XXème siècle, l'isolement et la caractérisation d'un grand nombre de constituants macromoléculaires à partir des tissus conjonctifs a permis de définir cette MEC (Labat-Robert & Robert 2005) comme étant un réseau enchevêtré de macromolécules. Les constituants de cette matrice sont extrêmement variés et sont en étroite relation avec les cellules. L'avènement des analyses histologiques ont permis d'identifier deux types d'organisation architecturale de la MEC : les lames basales et les stromas.

La **lame basale** est une fine couche de matrice compacte et spécialisée d'une épaisseur de 50-100nm sur laquelle repose une ou plusieurs couches de cellules jointives entre elles. Elle est notamment retrouvée dans les tissus épithéliaux. Cette matrice basale est produite par les cellules qui reposent sur elles. Dans le cas du **stroma**, ou matrice interstitielle, les cellules résidentes, éloignées les unes des autres, baignent dans une matrice abondante. Ces cellules stromales correspondent aux fibroblastes, aux cellules du système immunitaire et aux cellules endothéliales. Le stroma compose notamment la matrice des tissus conjonctifs. Cette matrice est synthétisée essentiellement par les cellules résidentes, en premier lieu les fibroblastes.

Si la lame basale a un rôle de **compartmentation** et de **support structural** pour maintenir la polarité cellulaire, le stroma a un rôle principal de **soutien mécanique**. Ainsi, jusque dans les années 1970, la MEC a été décrite en tant que support structural sans réelles activités biologiques autres (Labat-Robert & Robert 2005). Avec l'étude des composants individuels de la MEC, il a été montré que la matrice est **dynamique** et possède un **rôle fonctionnel** dans la régulation des cellules composant les tissus (Hynes & Yamada 1982).

La matrice va avoir quatre fonctions principales. Elle a son rôle premier de **charpente** pour maintenir l'architecture tissulaire et fournir les propriétés mécaniques (rigidité et élasticité), structurales (porosité, solubilité, topographie) et fonctionnelles des tissus (Cox & Erler 2011). Elle sert également de **barrière** biochimique pour filtrer le passage des molécules dans l'organisme. D'autre part, cette matrice est un **réservoir** de molécules biologiquement actives. Enfin, son contact direct avec les cellules en fait un **régulateur** important des comportements cellulaires.

Par sa composition diverse, la matrice émet de nombreux signaux qui peuvent être biochimiques, mécaniques ou topographiques et modulent ainsi le comportement cellulaire. Les signaux **biochimiques** sont liés à la nature des molécules de la matrice (Hakkinen et al. 2011; Schlie-Wolter et al. 2013). Récemment Naba & al ont ainsi défini le **matrisome** qui correspond à l'ensemble des protéines retrouvées dans la matrice (Naba et al. 2012). On peut différencier les protéines présentes dans tous les tissus de façon constitutionnelle, celles tissus spécifiques et celles présentes de façon transitoire lors de processus éphémères.

Les paramètres **mécaniques** et **topographiques** de la MEC sont liés, entre autre, à la rigidité et à l'organisation architecturale de la matrice. De plus en plus d'études montrent que ces deux paramètres sont primordiaux pour la régulation des comportements cellulaires tels que la migration (Tzvetkova-Chevolleau et al. 2008; Menon & Beningo 2011; Chang et al. 2013; Corall et al. 2014).

L'ensemble de ces propriétés, composition moléculaire et dynamique architecturale des MEC entre autres, contrôlent l'organisation des tissus mais aussi la morphologie et les comportements des cellules (Sevilla et al. 2010).

I. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Quelle que soit le type de matrice, stromale/basale ou constitutionnelle/transitoire, il est possible d'y répertorier quatre classes de molécules distinctes biochimiquement : les protéines fibreuses responsables de la structure et l'élasticité des tissus, les polysaccharides responsables de la résistance et qui servent de réservoir de molécules biologiquement actives, les glycoprotéines intervenant dans l'adhérence et la cohésion des tissus, et les autres protéines associées que sont les facteurs de croissance et les enzymes (Hay 1981; Labat-Robert et al. 1990; Naba et al. 2012). La différence entre les différents types de tissus se fait par la composition cellulaire mais aussi, à titre égal, par la répartition de ces quatre classes de molécule dans l'espace et le temps et par leur dynamique structurale et architecturale. Ces molécules matricielles peuvent être solubles dans les fluides biologiques et/ou incorporées de façon insoluble dans les matrices solides.

I. A. Composition moléculaire de la matrice extracellulaire

I. A. 1. Les protéines fibreuses : organisation structurale et élasticité de la matrice

Cette catégorie regroupe l'ensemble des protéines matricielles qui peuvent former des structures fibrillaires. Il existe ainsi deux types de **protéines fibreuses** : celles qui forment des **fibres structurelles** et celles qui forment des **fibres élastiques**. Les fibres structurelles interviennent dans l'organisation structurale des matrices. Elles ont un rôle de **soutien mécanique** et confèrent la **rigidité/résistance** au tissu. Les fibres élastiques confèrent l'**élasticité** au tissu.

Parmi les protéines formant des fibres structurelles, il est possible de citer les collagènes. Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps et correspondent à environ 30% en masse des protéines totales des mammifères (Ricard-Blum 2011). Il est recensé à ce jour 28 membres dans la famille des collagènes dont les collagènes I, II et III, ubiquitaires, correspondent ensemble à environ 80-90% des collagènes présents dans le corps humain (Lodish et al. 2000a). Certains types de collagène ont une localisation tissulaire plus spécifique tel le collagène IV qui se trouve principalement dans la lame basale. Tous les collagènes sont composés de trois chaînes polypeptidiques qui peuvent être identiques ou différentes. Les trois chaînes contiennent la séquence Gly-X-Y, triplet spiralé, qui favorise l'assemblage des trois chaînes en triple hélice sur une partie ou la totalité de la molécule (Figure 1) (Ricard-Blum 2011). Ces triples hélices de collagène s'auto-assemblent en fibrilles puis en fibres stables et rigides nécessaires au maintien de la matrice. Sur la base de la composition totale ou partielle en triple hélice, les collagènes peuvent s'assembler en fibres et/ou en réseau incorporés dans la MEC. Ces fibres peuvent être liées covalamment entre elles par les enzymes telles que la lysyl oxydase ou la transglutaminase. Ce processus permet d'augmenter la rigidité des tissus (Levental et al. 2009). Les motifs non-collagéniques (partie n'étant pas formée de triple hélice) confèrent à cette protéine des sites de liaison à d'autres partenaires matriciels tels la fibronectine ou les glycosaminoglycanes (Shaw & Olsen 1991; Ricard-Blum 2011).

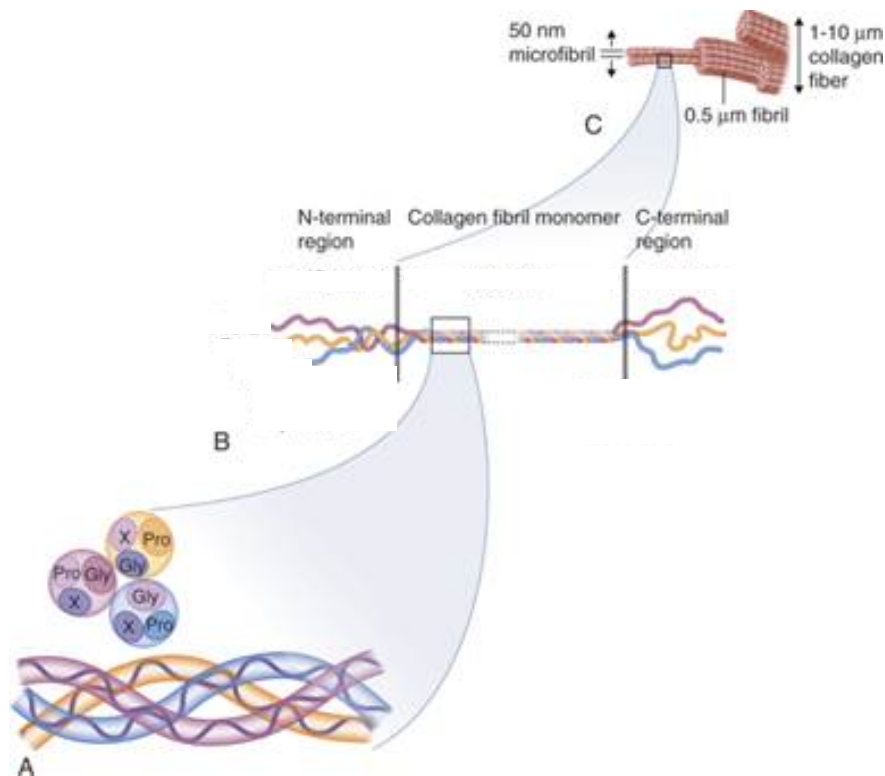


Figure 1 : Représentation des fibres de collagène

A. Trois chaînes de collagènes s'assemblent en triple hélice grâce à la répétition du motif Gly-X-Y. B. Suite à la sécrétion dans la matrice, les domaines N-terminal et C-terminal de la triple hélice sont clivés. C. Les monomères s'assemblent en microfibrilles puis en fibres de collagène (Goldman & Ausiello 2008).

Les fibres élastiques sont composées d'un cœur d'élastine entouré d'une gaine de microfibrilles de fibrilline. Les molécules d'élastine sont elles-mêmes constituées de monomères de tropoélastine (Baldwin et al. 2013). Cette tropoélastine est constituée de deux régions : la boucle élastique N-terminale qui procure le caractère élastique aux fibres et la partie C-terminale qui permet aux fibres d'interagir avec les cellules. Ces fibres peuvent être étirées jusqu'à 100-120% de leur longueur initiale (Chèvremont 1975) et peuvent retourner à leur état initial après relaxation. Ces fibres élastiques sont rendues insolubles suite à l'action d'enzymes telles que la lysyl oxydase qui pontent de façon covalente les fibres (Baldwin et al. 2013). Ces fibres sont retrouvées plus abondamment dans les tissus qui nécessitent une grande élasticité dont les ligaments, les tissus musculaires ou les vaisseaux sanguins.

I. A. 2. Les polysaccharides matriciels : résistance de la matrice et réservoir de molécules bioactives

Les **polysaccharides** matriciels rassemblent les **glycosaminoglycanes** (GAGs) et les **protéoglycanes** (PGs).

Les GAGs sont constitués de l'enchaînement d'unités disaccharidiques dont l'une des deux sous-unités est un glucide aminé c'est-à-dire une N-acetylglucosamine ou une N-acetylgalactosamine. Ces chaînes sont sulfatées et chargées négativement. Les GAGs sont classés en cinq groupes se différenciant par le type de liaison qui relie les deux sous-unités saccharidiques ainsi que par le

nombre et le positionnement des groupements sulfates. Il est ainsi possible de trouver les héparanes-sulfates (HS), les chondroïtines-sulfates (CS), les dermatanes-sulfates (DS), les kératanes-sulfates (KS) ainsi que les acides hyaluroniques (AH) (Figure 2).

Les PGs sont des chaînes protéiques de 10 à 400 kDa auxquelles sont liés des GAGs en quantité variable. Il existe une grande diversité de PGs puisque la longueur et la composition de la chaîne protéique ainsi que le nombre de ramifications et la composition en GAGs sont très variables.

Si les GAGs de type HS, CS, DS et KS sont toujours sulfatés et liés à une protéine centrale donc toujours retrouvés sous forme de protéoglycane, l'acide hyaluronique est la seule famille de GAG non-sulfaté qui est retrouvée sous une forme non-liée covalamment à une protéine (Gandhi & Mancera 2008). Si la majorité de ces polysaccharides est retrouvée sous forme « libre » dans la matrice extracellulaire, il existe également des catégories de polysaccharides qui sont membranaires tels que les syndécans (protéoglycane à héparanes-sulfates).

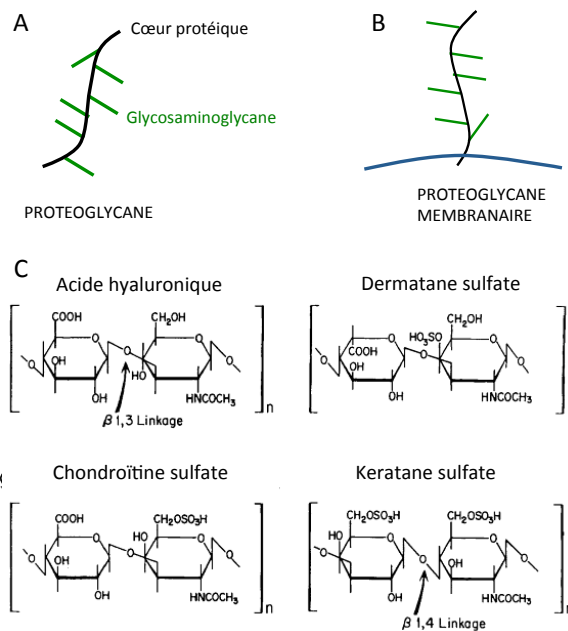


Figure 2: Représentation des protéoglycane et glycosaminoglycane

Représentation schématique des protéoglycane libres (A) et transmembranaires (B). Représentation des unités disaccharidiques composant les glycosaminoglycane (C) (Montreuil, Villegenthart & Schachter 1997).

La diversité de composition de la chaîne protéique et des GAGs confère aux PGs des fonctions biologiques et structurales variées. Grâce à ses différents domaines d'interaction, le cœur protéique des PGs interagit avec les autres composants de la matrice et participe à la formation du réseau enchevêtré qu'est la MEC. Le nombre important de groupements sulfatés présents dans les GAGs charge les PGs négativement. La répulsion entre les charges négatives rend ainsi les PGs hydrophiles. Le rayon hydrodynamique important des GAGs leur permet d'occuper une place importante dans les matrices procurant ainsi une résistance aux forces de compression et servant de réservoir à eau et ions divalents (Gandhi & Mancera 2008). Certains PGs, notamment ceux à héparanes-sulfates membranaires comme les perlécane, interagissent directement avec certains facteurs de croissance tel le FGF et facilitent/limitent leur liaison à leur récepteur (Kim et al. 2011).

I. A. 3. Les glycoprotéines : cohésion de la matrice

Parmi les molécules constituant de la MEC, il existe une sous-catégorie complexe qui permet l'interaction entre les différents composants de la matrice et assurent la cohésion des tissus : les glycoprotéines. Ces molécules sont des chaînes protéiques auxquelles sont liés des motifs glycosylés. Ces protéines sont dites complexes de par leur haut poids moléculaire (plusieurs milliers de Da) et de par leur structure organisée en modules (Figure 3). Ces modules sont repliés de façon individuelle. Au sein de ces modules se trouvent des séquences en acides aminés qui permettent à la molécule de se lier à d'autres protéines et/ou de s'auto-assembler pour former un réseau complexe.

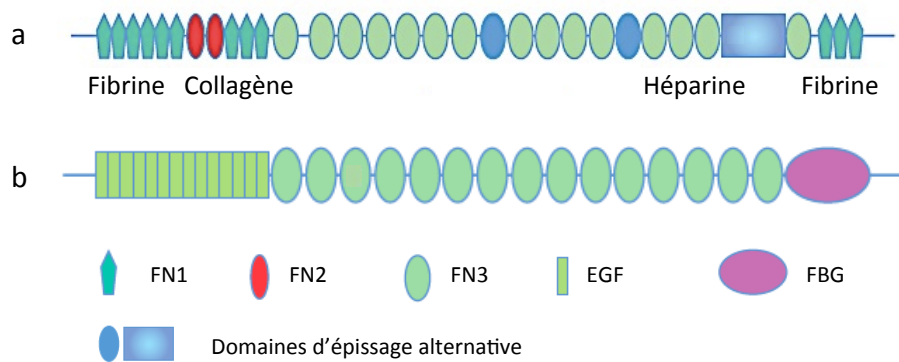


Figure 3 : Exemples de glycoprotéines

Représentation schématique de deux glycoprotéines : la fibronectine (a) et la thrombospondine (b). Ces protéines sont constituées de plusieurs modules représentés par différentes formes géométriques (FN1 : module de type I de la fibronectine, FN2 : module de type II de la fibronectine, FN3 : module de type I de la fibronectine, EGF : module de type EGF, FBG : module de type fibrinogène) et peuvent contenir des motifs de glycosylation. Ces modules sont spécialisés dans l'interaction avec d'autres partenaires moléculaires. Certaines de ces interactions sont représentées dans le cas de la fibronectine (Hynes & Naba 2012).

En plus de former des réseaux, ces glycoprotéines matricielles ont la possibilité de lier des facteurs de croissance qui peuvent induire des voies de signalisation que les glycoprotéines seules ne pourraient pas. Certaines sont uniquement circulantes mais beaucoup d'entre elles sont solubles dans les liquides biologiques et peuvent être incorporées dans les matrices solides (Tableau 1).

Glycoprotéines solubles	Fibronectine Vitronectine Fibrinogène Facteur Von Willebrand Immunoglobulines
Glycoprotéines matricielles	Fibronectine Vitronectine Laminine Thrombospondine Ostéopontine Ténascine Fibrine Fibrilline

Tableau 1 : Exemples de glycoprotéines circulantes et matricielles

Les glycoprotéines circulantes sont retrouvées sous forme soluble dans les liquides biologiques. Les glycoprotéines matricielles sont liées aux cellules et/ou incorporées dans les réseaux matriciels insolubles.

I. A. 4. Les protéines associées à la matrice : organisation de la matrice et régulation des comportements cellulaires

D'après la définition récente du matrisome par Hynes (Naba et al. 2012), aux trois catégories de molécules décrites précédemment sont associées les enzymes et les facteurs bioactifs (FB). Ces deux types de molécules jouent un rôle indirect dans l'organisation de la matrice. Les enzymes agissent sur la matrice extracellulaire en la modifiant (dégradation et pontage) alors que les FB agissent sur les cellules en stimulant certaines réponses cellulaires dont la réorganisation de la matrice.

I. A. 4. a. Les enzymes

Les enzymes associées à la matrice sont de deux sortes : les **enzymes liantes** ou ligases (lyases) et les **enzymes dégradantes** dont les protéases.

Les enzymes liantes ont pour fonction première de **lier covalement** les molécules entre elles afin de renforcer les réseaux formés dans la matrice. Parmi ces enzymes se trouvent la transglutaminase (TGase) et la lysyl oxydase (LOX) qui peuvent ponter les fibres de collagène et de fibrilline (Qian & Glanville 1997; Ricard-Blum 2011). La TGase catalyse la formation de liaisons peptidiques entre les groupements amines de la chaîne latérale de la lysine et le groupement carboxyle de la chaîne latérale du glutamate. La LOX catalyse la production de fonctions aldéhydes sur les résidus lysine des protéines. Ces aldéhydes réagissent avec les autres aldéhydes et/ou les autres lysines pour former des liaisons covalentes. Ces enzymes peuvent également avoir des activités connexes indépendantes de leur activité catalytique. La TGase et LOX peuvent servir respectivement de récepteur membranaire pour les molécules matricielles et de protéines d'adhérence permettant de faire le lien entre les cellules et la matrice environnante (Akimov & Belkin 2001; Bignon et al. 2011; données non-publiées Umana Diaz, Matrix Biology Europe 2014).

Les molécules extracellulaires peuvent **être dégradées** par les enzymes dégradantes. Ces enzymes sont nombreuses et ont des modes d'actions variés dépendants de l'activité de leur site actif (Tableau 2). La dégradation est effectuée par trois mécanismes différents mais complémentaires : la protéolyse diffuse par les protéases solubles sécrétées dans la matrice, la protéolyse péricellulaire localisée à la surface cellulaire par l'intermédiaire des enzymes membranaires, la dégradation enzymatique intracellulaire suite à l'internalisation des molécules extracellulaires (Wolf & Friedl 2011). Les enzymes dégradantes ont plusieurs rôles. L'action de ces dernières permet le renouvellement de la matrice tout en frayant un chemin pour le déplacement des cellules au sein de cette matrice (Corall et al. 2014). De plus, cette dégradation par les enzymes permet la libération des facteurs de croissance qui sont séquestrés dans la matrice (Feige & Baird 1992). Ces enzymes ont également un rôle important dans les processus de modifications post-traductionnelles des molécules. Elles permettent aux précurseurs d'acquérir leur forme « active » avec notamment le clivage des pro-MMPs en MMP et des pro-collagènes en collagènes (Nishida et al. 2008; Fukui et al. 2002). Cette maturation est primordiale pour l'organisation des molécules dans les réseaux matriciels.

Enzymes liantes	Transglutaminase, <i>réaction de liaison entre la lysine et le glutamate</i> Lysyl oxydase, <i>réaction de liaison entre deux fonctions aldéhydes ou entre aldéhyde et lysine</i>
Enzymes dégradantes	Métalloprotéases matricielles et métalloprotéases transmembranaires, <i>fonctionnement dépendant d'ion métallique zinc, calcium et manganèse</i> (Nagase et al. 2006) ADAMs, <i>fonctionnement dépendant du zinc</i> (Seals & Courtneidge 2003) ADAMTs, <i>fonctionnement dépendant du zinc</i> (Porter et al. 2005) Sérine protéases, <i>clive autour des résidus sérines</i> (Hedstrom 2002) Cathepsine, <i>mécanismes d'action variés, fonctionne à pH basique</i>

Tableau 2 : Exemples d'enzymes liantes et dégradantes

Les enzymes liantes correspondent aux enzymes qui lient covalamment les molécules de la matrice entre elles. Les enzymes dégradantes correspondent aux enzymes qui dégradent les molécules matricielles.

I. A. 4. b. Les facteurs bioactifs liés à la matrice

La MEC est un réservoir de **facteurs bioactifs** (FB). Ces derniers n'ont pas de rôle structural mais ont un rôle fonctionnel à proprement dit puisqu'ils correspondent à des molécules qui stimulent la croissance, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. Ces FB sont localisés à l'extérieur de la cellule sous forme de précurseurs biologiquement inactifs. Sous cette forme latente, les FB sont désignés sous l'appellation de **crynopectine**. Ces crynopectines sont classées en deux catégories dites I et II (Feige & Baird 1992).

Les **crynopectines de type I** correspondent aux molécules qui sont sécrétées à l'extérieur de la cellule et sont séquestrées dans la MEC par interaction avec les autres composants matriciels. Ces crynopectines se lient aux collagènes et aux glycoprotéines, mais sont principalement séquestrées par interaction avec les héparanes-sulfates. Ainsi, ces facteurs bioactifs peuvent être présentés à la cellule en phase solide liés aux molécules matricielles, ou sous forme solubles après protéolyse de ces dernières. Le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et le TGF β (Tissue Growth Factor β) font parties de cette catégorie. Les **crynopectines de type II** sont quant à elles séquestrées sous forme de précurseurs transmembranaires et leur libération est dépendante de l'action des enzymes de la matrice. C'est le cas du TGF α (Tissue Growth Factor α) et de l'EGF (Epithelial Growth Factor) (Feige & Baird 1992).

Les mécanismes de régulation de la biodisponibilité des crynopectines sont réunis sous le terme de **crinopexie**. Ainsi, l'action des crynopectines est dépendante d'une part de leur maturation et clivage en facteur de croissance, et d'autre part de leur libération de leur milieu de séquestration. La disponibilité des FB est contrôlée dans le temps et l'espace par un remaniement contrôlé de la matrice et une régulation de leur biosynthèse.

La matrice extracellulaire est donc une charpente complexe et dynamique constituée de molécules diverses enchevêtrées mais est également un réservoir de molécules bioactives. L'ensemble coopère pour former des assemblages et maintenir une homéostasie architecturale et fonctionnelle des tissus.

I. B. Dynamique de la matrice

La matrice n'est pas un compartiment statique mais dynamique puisque sa composition et son organisation changent perpétuellement dans le temps et l'espace. Ce remaniement de la matrice, appelé **remodelage matriciel**, résulte d'une balance entre la synthèse et le dépôt des molécules de la MEC d'une part et la dégradation par les protéases et glycosidases d'autre part. De plus, l'organisation et les propriétés de cette matrice en terme d'architecture, de rigidité et de capacité de contraction sont également des paramètres primordiaux dans les comportements cellulaires.

I. B. 1. Dépôt des protéines matricielles

La production et le **dépôt** des molécules de la MEC sont des processus cellulaires contrôlés qui se font en réponse à différents signaux tels que les facteurs de croissance ou la rigidité de la matrice. Ce dépôt de molécules est nécessaire pour différents processus physiologiques comme par exemple la production transitoire de fibronectine lors du développement embryonnaire et l'angiogenèse (Kostourou & Papalazarou 2014). Des dépôts aberrants de la matrice sont généralement des indicateurs pathologiques. Par exemple, une accumulation de fibronectine est observée dans les carcinomes buccaux (Harada & al. 1994 ; Salo et al. 2014). Des études récentes ont montré que différents types de tumeurs sont associés à une accumulation fibrillaire anormale de collagène IV (Fang et al. 2013). Cette accumulation est responsable de la rigidification du tissu et une accumulation anormale de néovaisseaux. *In vitro*, cette rigidification de la matrice limite la maturation de la membrane basale et empêche par conséquent la formation des acini mammaires (Kass et al. 2007).

I. B. 2. Activité cryptique des molécules de la matrice

Comme il a été évoqué précédemment la dégradation de la matrice joue un rôle important dans le contrôle de la biodisponibilité des facteurs de croissance piégés dans la MEC (cf. I.A.4). D'autre part, les molécules de la MEC possèdent souvent des sites d'interaction ou d'activité biologique qui sont cryptiques c'est-à-dire masqués dans la conformation native de la molécule. Ainsi, les **fragments et les séquences cryptiques** correspondent à des régions d'une protéine qui sont enfouies dans la protéine et qui ne sont exposées que lorsque la protéine est respectivement **digérée** ou **change de conformation**. Ces fragments et séquences ont des activités distinctes de celle de la molécule initiale entière. L'exposition de ces sites cryptiques peut se faire par trois mécanismes : changement d'accessibilité suite à une **modification de conformation**, accessibilité modulée par **interaction** avec d'autres partenaires ou libération par **protéolyse**. La dégradation par les protéases permet de libérer des fragments protéiques à activité biologique comme par exemple l'endostatine, la tumstatine ou l'anastelline qui sont des fragments anti-angiogéniques issus du collagène et de la fibronectine, ou les fragments de collagène I qui sont chimioattractants pour les cellules endothéliales et immunitaires dont les macrophages (Hamano et al. 2003; Tran et al. 2005; Neskey et al. 2008; Lu et al. 2011).

I. B. 3. Restructuration des matrices

Le remodelage matriciel est souvent accompagné d'une **modification de l'organisation** de la matrice. Cette restructuration de la matrice peut être due à la **modification de l'architecture/assemblage**, au **pontage covalent** des molécules et à la **rigidification** de la matrice. Dans les tumeurs mammaires, la liaison covalente des fibres de collagène suite à une surexpression de l'enzyme LOX (Lysyl oxydase) est accompagnée d'une rigidification et d'une réorientation des fibres de collagènes d'une structure désordonnée à une structure linéaire et rigide (Figure 4) (Levental et al. 2009). Cette rigidification du tissu liée au pontage covalent par LOX semble être une cause à l'origine de la progression tumorale. Il a également été suggéré que les fibroblastes associés au cancer (*cancer associated fibroblasts*) permettent de réorganiser les fibres désordonnées de fibronectine en fibres parallèles les unes aux autres. Cette réorganisation en fibres linéaires favorise ainsi la migration rapide et directionnelle et l'invasion des cellules de tumeur mammaire (Yang et al. 2011; Corall et al. 2014). La réorganisation structurale lors du remodelage de la matrice est donc un paramètre déterminant pour la progression des cellules puisqu'elle favorise la formation de structures rigides et fibrillaires de molécules qui servent de support conducteur pour le déplacement des cellules.

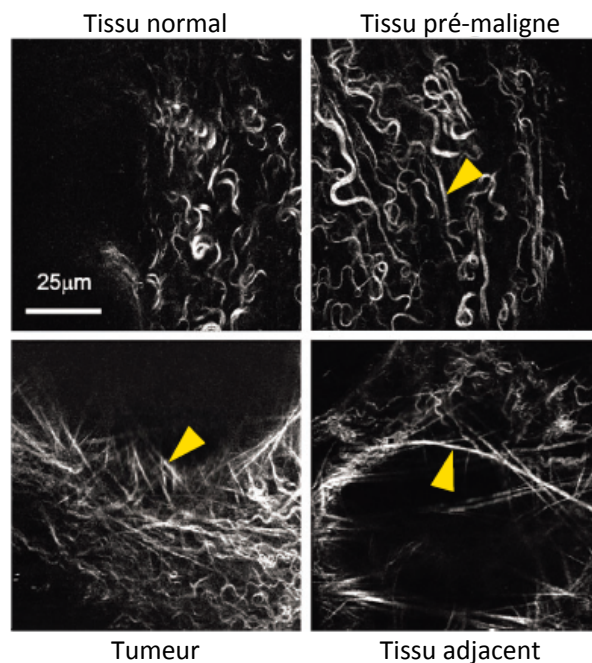


Figure 4 : Réorganisation du réseau matriciel de collagène au cours du développement tumoral

Image de microscopie multiphotonique par génération de seconde harmonique montrant la linéarisation des fibres de collagène au cours de la progression tumorale mammaire. En haut à gauche, tissu normal. En haut à droite, tumeur pré-maligne. En bas à gauche, tumeur. En bas à droite, tissu adjacent à la tumeur (d'après Levental et al. 2009).

Lors du remodelage de la matrice, les trois processus que sont le dépôt, la dégradation et la réorganisation agissent ensemble mais dans des proportions différentes. Un remodelage anormal peut se traduire par une dérégulation des comportements cellulaires et des processus pathologiques comme la fibrose ou les cancers. L'organisation anormale de la matrice dans le cas des pathologies reflète l'importance du rôle de cette dernière dans la régulation des comportements cellulaires.

En résumé :

La matrice extracellulaire est un réseau enchevêtré de macromolécules diverses. Cette matrice est constituée de :

- protéines fibreuses qui servent de soutien mécanique et confèrent l'élasticité des tissus
- polysaccharides qui assurent la fonction de résistance et de réservoir des tissus
- glycoprotéines qui assurent la cohésion des tissus
- molécules associées régulatrices : facteurs de croissance (molécules qui stimulent ou inhibent certains comportements cellulaires) et enzymes (jouent un rôle dans la structuration et le renouvellement de la matrice)

Cette matrice est soumise à un remodelage dynamique qui correspond à une balance étroite entre :

- la synthèse/dépôt des molécules
- la dégradation par les enzymes
- l'organisation structurale des composants matriciels

De part sa diversité constitutionnelle et de sa dynamique, cette matrice peut moduler le comportement cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Ces derniers sont décrits dans la suite.

II. INTERACTIONS CELLULES-MATRICE ET COMPORTEMENT CELLULAIRE

II. A. Les récepteurs cellulaires : intermédiaires entre matrice et cellules

Les molécules de la matrice extracellulaire interagissent entre elles mais également avec les cellules environnantes. Les **récepteurs cellulaires** intégrés à la membrane plasmique servent d'intermédiaire dans cette interaction entre les cellules et les molécules extracellulaires et permettent de relier le compartiment extracellulaire au compartiment intracellulaire.

II. A. 1. Les protéoglycanes transmembranaires

Même s'ils sont majoritairement retrouvés sous forme libre dans la matrice extracellulaire (cf. I.A.2), il existe également des **protéoglycanes membranaires** dont notamment les syndécans. Ils possèdent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire hydrophobe et une queue cytoplasmique. Les syndécans constituent une famille de 4 membres de protéoglycanes membranaires comprenant les syndécans-1, -2, -3 et -4. Ces protéoglycanes sont constitués d'une chaîne protéique sur laquelle s'attachent essentiellement des GAGs à héparanes-sulfates sauf les syndécans-1 qui contiennent également des chaînes chondroïtines-sulfates (Tkachenko 2005). Sur cette base commune, ces protéoglycanes membranaires possèdent une composition variée déterminant leur capacité à lier différents partenaires. Ces protéoglycanes membranaires agissent en **synergie** avec les autres récepteurs cellulaires dont les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance. Ces syndécans peuvent reconnaître diverses molécules de la matrice dont les protéines fibreuses comme le collagène ou les glycoprotéines comme la fibronectine, la thrombospondine ou la ténascine (Koda et al. 1985; Stepp et al. 2010; Sun et al. 1989; Salmivirta et al. 1991). Grâce à ces différentes interactions, ces protéoglycanes membranaires interviennent dans la régulation de différents comportements cellulaires. Les **syndécans-4** sont très peu exprimés par les cellules sauf dans des contextes spécifiques tels que la réparation tissulaire (Bernfield & al. 1999; Midwood et al. 2006). Les syndécans-2 ont été montrés comme favorisant la migration des cellules cancéreuses mammaires alors qu'en présence de fibronectine, les syndécans-1 limitent la migration des fibroblastes (Stepp et al. 2010; Lim & Couchman 2014).

II. A. 2. Les récepteurs spécifiques des molécules matricielles : les intégrines

Les **intégrines** constituent une famille de **récepteurs hétérodimériques transmembranaires** impliqués dans la reconnaissance des molécules de la MEC. Les intégrines sont constituées de deux sous-unités, α et β , associées de façon non-covalente. Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β dont la combinatoire génère 24 hétérodimères fonctionnels qui ont une répartition cellulaire/tissulaire différente (Zent & Pozzi 2010a; Campbell & Humphries 2011). Les intégrines jouent un rôle primordial dans l'adhérence cellule-matrice, en intervenant dans la formation des **contacts focaux**, et dans l'adhérence cellule-cellule. Les intégrines peuvent être regroupées en fonction de la séquence reconnue dans le ligand matriciel. Par exemple, les intégrines α_v , α_5 , α_8 et α_{IIb} reconnaissent la séquence RGD. Elles peuvent aussi être regroupées en fonction de leur combinaison entre sous-unités α et β (Figure 5). Certaines sous-unités peuvent se combiner avec

différentes autres sous-unités, alors que certaines ne vont avoir qu'un seul partenaire possible comme dans le cas de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Cette association entre les sous-unités α et β confèrent la **spécificité d'affinité au ligand**. Par exemple, les intégrines $\alpha 5\beta 1$ lient spécifiquement la fibronectine. Il n'en reste pas moins que chaque ligand peut lier différents récepteurs cellulaires. La fibronectine est reconnue par 12 des combinaisons d'intégrines : $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ (spécifique aux plaquettes) et $\alpha M\beta 2$ (spécifique aux leucocytes) (Leiss et al. 2008; Niu & Chen 2011).

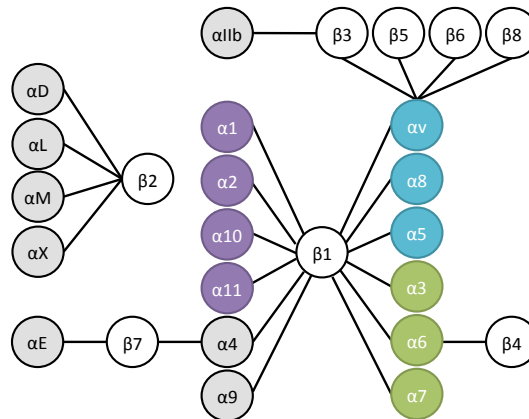


Figure 5 : Classification des intégrines

Regroupement des intégrines en fonction de leur association entre sous-unités α et β . Certaines spécificités des intégrines sont représentées : en bleu se trouvent les intégrines liant la séquence RGD, en violet les intégrines reconnaissant les collagènes, en vert les intégrines reconnaissant les laminines (d'après Zent & Pozzi 2010a).

Structure des intégrines

Toutes les intégrines sont composées d'un large domaine extracellulaire qui permet de lier le ligand extracellulaire, d'une partie transmembranaire et d'une courte partie cytoplasmique permettant de lier les partenaires du cytosquelette intracellulaire (sauf $\beta 4$) (Zent & Pozzi 2010a).

La partie transmembranaire des intégrines est constituée d'une hélice α et permet à l'intégrine de s'insérer dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique.

La partie extracellulaire des intégrines, l'ectodomaine, lie le ligand extracellulaire. La reconnaissance du ligand se fait grâce au domaine I (« *inserted* »), noté αI et βI respectivement selon qu'il se trouve sur la sous-unité α ou β . Ce domaine I représente environ la moitié de l'ectodomaine. Il est présent chez toutes les intégrines β et seulement une partie des intégrines α (Figure 6). Dans le cas des intégrines α ne possédant pas de domaines I, l'intégrine β sert de sous-unité liant le ligand. Ce domaine I contient un site de liaison des ions métalliques divalents (« *metal-ion-dependant adhesion site* » : MIDAS). Dans les milieux physiologiques, les intégrines peuvent acquérir deux conformations dépendantes de la présence en cations : fermée ou ouverte (Niu & Chen 2011).

La partie cytoplasmique des intégrines est généralement une courte chaîne peptidique. Les parties proximales à la membrane des parties cytoplasmiques interagiraient entre elles par un pont salin et une interaction hydrophobe pour garder les deux sous-unités α et β associées dans une conformation inactive.

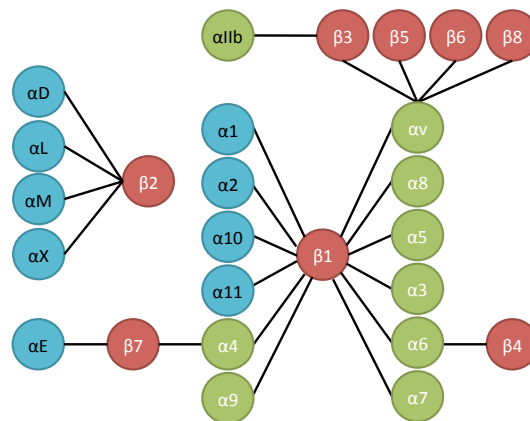


Figure 6 : Intégrines avec et sans domaine I

Représentation des sous-unités α avec et sans domaine I et leur association avec leur sous-unité β . En bleu les intégrines α avec le domaine I, en vert les intégrines α sans domaine I et en rouge les intégrines β (d'après Niu & Chen 2011).

II. A. 3. Dynamique des structures d'adhérence

La liaison entre les intégrines transmembranaires et les molécules extracellulaires est renforcée par l'assemblage spatio-temporel de molécules cytosoliques sur la face interne de la membrane plasmique (Zaidel-Bar et al. 2007; Geiger & Zaidel-Bar 2012). L'interaction intégrine-molécule matricielle n'est donc que la première étape de la formation de larges complexes dynamiques de communication entre les cellules et la matrice que sont les **structures d'adhérence**. Ces structures d'adhérence peuvent contenir plus de 150 molécules différentes. Ces molécules sont recrutées en fonction des propriétés moléculaires/structurales/mécaniques de l'environnement (Geiger & Zaidel-Bar 2012). Ces points d'adhérence ont donc une composition et organisation variable dans le temps dont l'étude est regroupée sous le concept d'**adhésome** (Geiger & Zaidel-Bar 2012).

La mise en place de ces structures d'adhérence est nécessaire pour stabiliser et renforcer les points d'ancrage à la matrice et initier la signalisation intracellulaire.

Constitution des structures d'adhérence

Suite à l'interaction du ligand avec l'intégrine, trois groupes de molécules vont s'assembler sur la face cytosolique pour former les structures d'adhérence (Figure 7) (Zaidel-Bar et al. 2007). Les **protéines de structure**, comme la taline, servent d'intermédiaire pour lier la partie cytoplasmique des intégrines à l'actine du cytosquelette. Les **protéines adaptatrices** lient à la fois les protéines de structure et l'actine pour consolider ce point d'ancrage, telles la vinculine et l' α -actinine liant la taline à l'actine. Enfin, les **protéines de signalisation** telles que Arp2/3, FAK ou les Rho GTPases, possèdent des activités catalytiques permettant respectivement la polymérisation de l'actine, l'enclenchement de voies de signalisation telles que la voie des MAP kinases et des remaniements du cytosquelette actino-myosinique (Zent & Pozzi 2010a).

La mise en place de ces structures d'adhérence complexes permet de recruter et d'initier la polymérisation des filaments d'actine. Cette polymérisation favorise à son tour le regroupement des intégrines (signalisation *inside-out*) amplifiant ainsi le phénomène d'ancrage à la matrice.

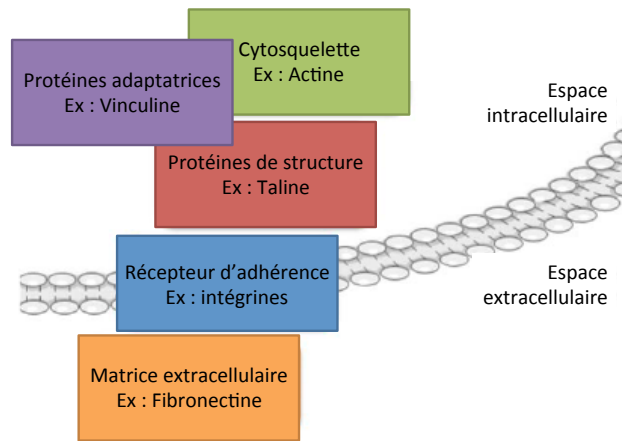


Figure 7 : Représentation des structures d'adhérence

Types de structure d'adhérence

Trois types de structure d'adhérence sont généralement décrits dans la littérature. Elles ont toutes la même composition moléculaire de base (cf. II.A.3.a) mais se différencient par leur morphologie et leur distribution à la surface cellulaire. Il s'agit des complexes focaux, des contacts focaux et des adhésions fibrillaires (Geiger 2001; Biggs & Dalby 2010).

Les **complexes focaux**, de moins de 1 μm de diamètre, sont retrouvés à l'extrémité des cellules et des protubérances membranaires. Ils peuvent murir en structures plus stables que sont les contacts focaux (Figure 8.a).

Les **contacts focaux** sont organisés sous forme de tiret de 1 à 5 μm à l'extrémité des faisceaux d'actine à la périphérie des cellules. La présence de ces structures est inversement corrélée à la motilité des cellules (Figure 8.b).

Les **adhésions fibrillaires** correspondent à des structures d'adhérence de plus de 5 μm de long. Elles sont surtout localisées au centre de la cellule. Elles sont absentes des cellules en migration et sont caractérisées par la présence de larges fibres de stress structurées parallèlement aux fibres de fibronectine sous-jacentes à la cellule (Figure 8.b).

Il existe des variantes à ces structures qui sont plus spécifiques à l'invasion et qui sont regroupés sous la notion d'**invadosome** : les **podosomes** et les **invadopodes** (Figure 8.c et d). Ces deux types d'invadosomes ont une structure tubulaire d'un diamètre inférieur à 2 μm et sont associés à la sécrétion de protéases (Linder 2009; Murphy & Courtneidge 2011). Les podosomes ont une longueur inférieure à 2 μm , une durée de vie de quelques minutes et sont constitués d'un cœur de filaments d'actine entourés de molécules des contacts focaux telles que la vinculine. Les invadopodes ont quant à eux une longueur supérieure à 2 μm , une durée de vie de quelques heures, sont constitués de molécules similaires aux podosomes et les filaments d'actine sont entourés de cortactine. Les invadopodes ont une capacité de dégradation plus importante et sont associées aux cellules cancéreuses alors que les podosomes sont retrouvés dans les cellules saines telles que les cellules endothéliales ou cellules immunitaires (Linder 2009; Murphy & Courtneidge 2011; Hu et al. 2011; Guet et al. 2012; Siddiqui et al. 2012).

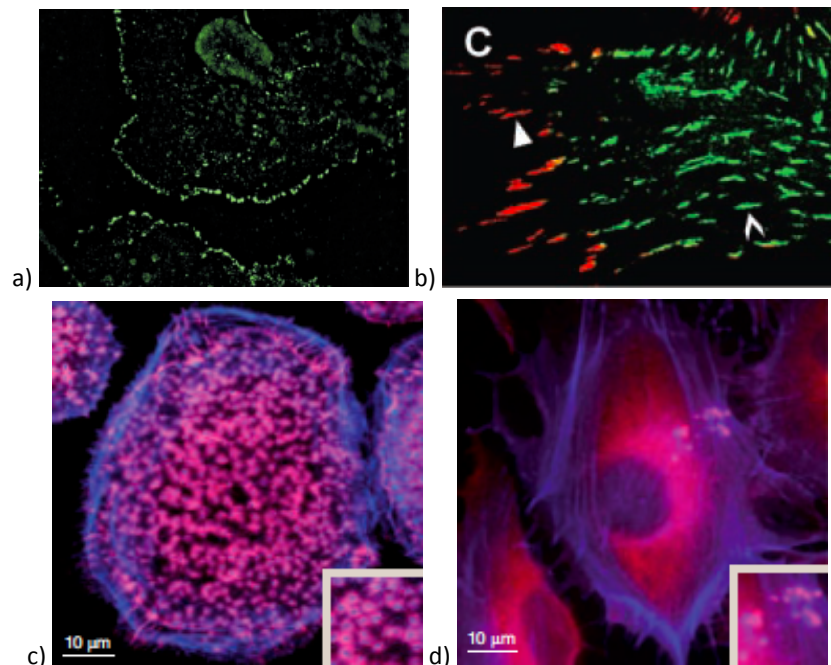


Figure 8 : Les différents type de structure d'adhérence

Image de microscopie à fluorescence des différents types de structure d'adhérence. a) Complexes focaux. b) Triangle blanc : contacts focaux localisés au bord de la cellule et représentés en rouge par le marquage de la paxilline, Flèche blanche : adhésions fibrillaires localisées au centre de la cellule et représentées en vert par le marquage des intégrines $\alpha 5$. c) Podosomes (insert) marqués en bleu pour l'actine (cœur du podosome) et rose pour la vinculine (contour du podosome) dans les macrophages. d) Invadopodes (insert) marqués en bleu pour l'actine (cœur de l'invadopode) et en rose pour la cortactine (contour) dans les cellules cancéreuses de mélanome (d'après Geiger 2001; Cukierman et al. 2001; Linder 2009).

II. B. Signalisation matrice-dépendante et réponse cellulaire

La MEC a un rôle important de **transmission des signaux** extracellulaires à la cellule. Les signaux émanant de la matrice sont intégrés par les cellules et induisent des voies de signalisation et des réponses cellulaires adaptées aux propriétés du microenvironnement.

II. B. 1. Rôle des intégrines dans la signalisation : activation et interaction avec le ligand

Les intégrines sont au cœur de la transmission des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (*outside-in*) mais également de l'intérieur vers l'extérieur (*inside-out*).

Leur activation est dépendante de la présence de cations divalents. En absence de liaison des ions magnésiums, calcium ou manganèse, les intégrines ont une **conformation « fermée » et inactive** qui ne liera que faiblement le ligand (Figure 9.a). Dans cette conformation fermée, les sous-unités α et β sont très proches l'une de l'autre et la partie extracellulaire des intégrines est repliée vers la membrane plasmique. Les parties proximales à la membrane des parties cytoplasmiques des sous-unités interagiraient entre elles par un pont salin et une interaction hydrophobe. La liaison des cations permet aux intégrines d'acquérir une **conformation « ouverte » et active** qui leur permet de lier le ligand extracellulaire avec une plus forte affinité (Figure 9.b) (Zent & Pozzi 2010a). Cette liaison permet ainsi de réguler l'adhérence des cellules dans le temps et l'espace. Le cytosquelette et ses

protéines associées contrôlent l'affinité des intégrines pour leur ligand extracellulaire *via* une signalisation *inside-out*. Des protéines de structure d'adhérence comme la taline et la kindline se lient aux intégrines facilitant ainsi l'acquisition de leur conformation active et la liaison à leurs ligands extracellulaires. Dans cette conformation ouverte, les deux sous-unités α et β s'éloignent l'une de l'autre et la tête extracellulaire s'étend. Le ligand se lie ainsi dans la cavité libre entre les deux sous-unités α et β . La liaison du ligand extracellulaire permet de regrouper les intégrines et de mettre en place une signalisation bidirectionnelle en activant des voies de signalisation *outside-in* modifiant le comportement cellulaire (Figure 9.c).

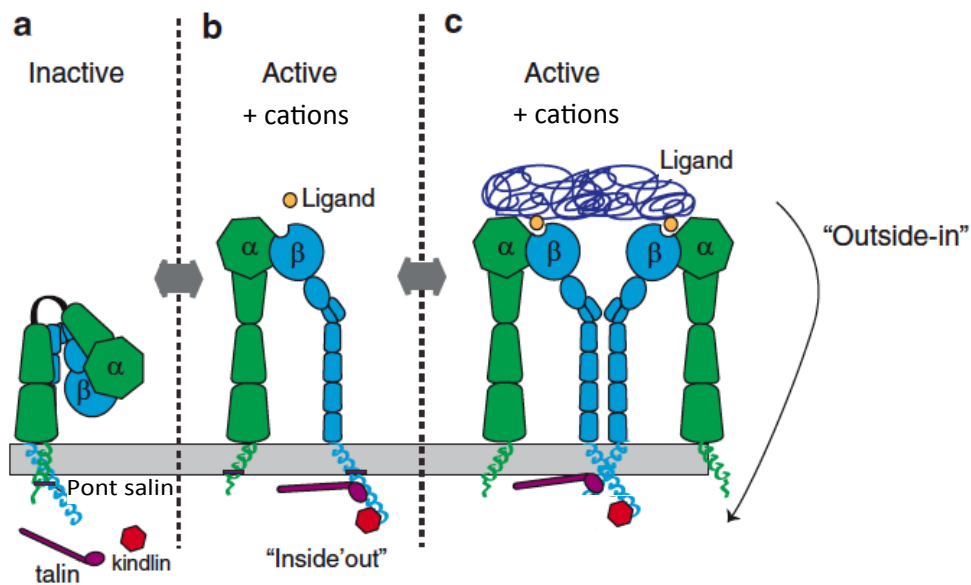


Figure 9 : Activation des intégrines

a) Conformation repliée et inactive des intégrines en absence de cations divalents. b) Conformation ouverte et active des intégrines en présence des cations divalents. Les protéines intracellulaires dont la taline et la kindline se lient aux intégrines facilitant ainsi l'acquisition de leur conformation active et la liaison à leurs ligands extracellulaires *via* une signalisation *inside-out*. c) Regroupement des intégrines pour mettre en place une signalisation *outside-in* (d'après Zent & Pozzi 2010a).

II. B. 2. Signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule

La liaison des ligands matriciels aux intégrines permet d'initier une signalisation **de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule** (*outside-in*) qui aboutit à une modulation du comportement cellulaire. La partie cytoplasmique des intégrines ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. La transmission des signaux nécessite donc le recrutement de molécules intracellulaires qui peuvent exercer un rôle de consolidation de l'interaction cellule-matrice et/ou présenter une activité enzymatique, telles que les protéines kinases (cf. II.A.3). Ainsi, le recrutement des protéines cytosoliques suite à l'interaction cellule-matrice *via* les intégrines initie différentes **voies de signalisation** dont celles des FAK/MAPK, celles des PI3K et celles des PKC. Ces dernières aboutissent à l'expression de gènes, à l'influx de messagers biochimiques (ouverture de canaux par exemple) et/ou à des remaniements du cytosquelette intracellulaire, et induisent ainsi une grande diversité de réponses cellulaires (Figure 10) (Hood & Cheresch 2002).

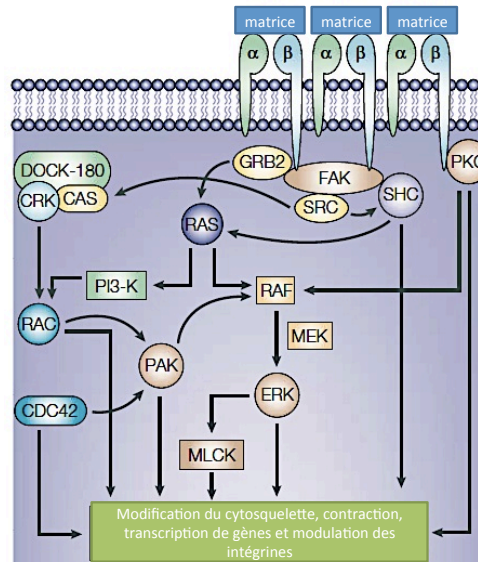


Figure 10 : Voies de signalisation induites suite à la liaison intégrine-matrice

Représentation de certaines voies de signalisation mis en place suite à l'interaction intégrine-cellule (d'après Hood & Cheresch 2002).

Parmi la signalisation *outside-in*, il est possible de citer la **mécanotransduction**. Elle correspond aux mécanismes par lesquels les cellules perçoivent et convertissent un **signal mécanique et topographique extracellulaire** en **signal intracellulaire**. Les signaux mécaniques correspondent aux propriétés mécaniques de l'environnement comme la rigidité, la compression, l'extension ou la charge de surface. Les signaux mécaniques et topographiques peuvent être convertis en différentes réponses cellulaires : signal électrique des cellules nerveuses, ouverture/fermeture de canaux ioniques, modification de l'expression des gènes etc. (Ingber 2006; Liu et al. 2010). Cette mécanotransduction est médiée par la MEC, les récepteurs cellulaires, le cytosquelette et les molécules de signalisation intracellulaires (Huang et al. 2004).

L'activation des intégrines et la mise en place des contacts focaux participent à cette transmission des signaux mécaniques dans la cellule. Les forces de tensions exercées sur les molécules transmembranaires dont les intégrines et les canaux à ions pourraient engendrer des modifications de leur conformation et induirait ainsi des voies de signalisation cytosoliques (Ingber 2003; Schwartz 2010; Orr et al. 2006). Ces modifications de conformation pourraient être nécessaires pour l'assemblage de la fibronectine médié par les intégrines $\alpha5\beta1$. Des études ont montré que, sur des supports recouverts de fibronectine, les forces de traction exercées par les intégrines $\alpha5\beta1$ augmentent avec la rigidité des supports (Elosegui-Artola et al. 2014). La réponse des cellules aux forces mécaniques peut également se traduire par un remodelage de la matrice extracellulaire avec par exemple des dépôts de collagène et de fibronectine (Schwartz 2010). La production de ces molécules pourrait aider à résister à ces forces mécaniques.

II. B. 3. Différentes réponses cellulaires

Les signaux émanant de la matrice sont intégrés par les cellules pour induire des réponses cellulaires adaptées aux propriétés du microenvironnement à un endroit et un temps donné.

Les signaux de la matrice peuvent mener les cellules vers différents comportements. L'**adhérence** et l'**étalement** correspondent aux processus par lesquels les cellules s'attachent à leur support et

fournissent les premiers signaux de survie à la cellule (Bruckert et al. 2002; Chamaraux et al. 2008; Socol et al. 2010). Suite à leur adhérence, les cellules acquièrent une **morphologie** c'est-à-dire une forme qui est caractéristique de chaque type cellulaire. Sur un support en 2D, alors que les cellules épithéliales ont une morphologie pavimenteuse, les fibroblastes ont une forme étirée propice à la migration. La **polarité apico-basale** est une propriété des cellules épithéliales. Cette polarité est caractérisée par l'expression de molécules transmembranaires et cytosoliques différentes selon la localisation apicale ou basale (Gibson & Perrimon 2003). La **différenciation** correspond au processus par lequel une cellule se spécialise en un type cellulaire spécifique (Keller 2005). Par opposition, les cellules souches sont indifférenciés mais peuvent se différencier en différent type cellulaire. Suite à leur adhérence et différenciation, la **prolifération** permet aux cellules de se multiplier. Enfin, la **migration** correspond au processus qui permet aux cellules de se déplacer en fonction des propriétés du microenvironnement matriciel (Petrie et al. 2009).

La modulation de ces comportements cellulaires aura des répercussions sur les processus physiologiques et pathologiques. Par exemple, la prolifération et la migration cellulaire sont primordiales dans la mise en place des différents tissus lors du développement embryonnaire. Dans les tissus adultes, une dérégulation de ces deux comportements mène à des processus pathologiques comme le développement tumoral.

Finalement, les interactions cellule-matrice sont très complexes dues :

- *à la variété de ligand reconnaissant les récepteurs*
- *au nombre important de combinaison d'intégrines et de récepteurs*
- *au nombre important de combinaison récepteur-ligand*
- *au nombre important de paramètres mécaniques*
- *au nombre important de molécules intervenant dans la formation des structures d'adhérence*
- *au nombre important de voies de signalisation pouvant être mises en place*

En résumé :

L'interaction de la matrice extracellulaire avec les cellules est médiée par les récepteurs transmembranaires à la surface cellulaire. Les récepteurs spécifiques des molécules matricielles correspondent aux intégrines. Les intégrines participent à la constitution des structures d'adhérences :

- les complexes focaux
- les contacts focaux
- les adhésions fibrillaires

Ces structures d'adhérence sont des complexes protéiques ayant pour rôle de transmettre les signaux de l'environnement extracellulaire vers la cellule en mettant en place des voies de signalisation intracellulaire. Ces signaux peuvent être :

- biochimiques, dépendants de la composition moléculaire de la matrice
- mécaniques, dépendants des propriétés mécaniques (rigidité, élasticité etc.) de la matrice
- topographiques, dépendants de l'organisation architecturale de la matrice
- électriques, dépendants des charges de surface environnante

Les réponses cellulaires aux différents signaux extracellulaires sont variées :

- adhérence
- polarisation apico-basale
- différenciation
- prolifération
- migration

Dans la suite, nous nous focaliserons plus particulièrement sur la migration.

III. MATRICE EXTRACELLULAIRE ET MIGRATION CELLULAIRE

Dans les organismes multicellulaires, la **migration cellulaire** est un processus physiologique nécessaire au développement embryonnaire et aux processus de réparation tissulaire. Un dérèglement de cette migration des cellules peut mener à des processus pathologiques tels que le développement tumoral. La MEC représente un **support structural** dont la composition et l'organisation topographique sert de « **guide** » pour cette migration.

III. A. Morphologie de la cellule en migration

Lors de la migration, les cellules ont une **morphologie asymétrique** et **polarisée** caractéristique avec un **front avant** ou front de migration, et un **front arrière** de migration (Figure 11.a).

Au niveau du front avant de migration de la cellule se forment des **protubérances membranaires** nécessaires à la reconnaissance et à l'adhérence à la matrice *via* la formation de contacts focaux. Ces protubérances membranaires sont essentiellement des **lamellipodes** et **filipodes**, extensions cytoplasmiques dont la structure est maintenue par des architectures différentes des filaments du cytosquelette d'actine intracellulaire. Les filipodes sont des extensions cytoplasmiques de moins de 0.5 μm de diamètre et de 10-200 μm de long alors que les lamellipodes sont beaucoup plus larges à l'avant de la cellule en migration (Adams 2002). Des structures protubérantes associées à une activité de protéolyse péricellulaire accrue, les **invadosomes** (cf. II.A.3) peuvent également se former sur la face ventrale des cellules à l'interface avec la matrice (Linder 2009; Murphy & Courtneidge 2011).

La direction de formation des protubérances détermine l'axe de migration des cellules. La formation de ces protubérances est dictée par la chimioattraction, la topographie et la localisation de complexes protéiques cytosoliques spécifiques (Petrie et al. 2009). A l'intérieur de ces protubérances se stabilisent des microtubules qui permettent le transport antérograde depuis l'appareil de Golgi vers l'avant de la cellule de matériels nécessaires à la formation des contacts focaux. L'appareil de Golgi et le centrosome se trouvent dans la zone périnucléaire antérieure au noyau. Le front arrière de la cellule est impliqué dans le maintien de la directionnalité et de la polarité des cellules en générant la contraction des filaments d'actomyosine, un désassemblage des contacts focaux et une inhibition des protubérances latérales permettant à la cellule de se déplacer vers l'avant (Figure 11.a) (Petrie et al. 2009).

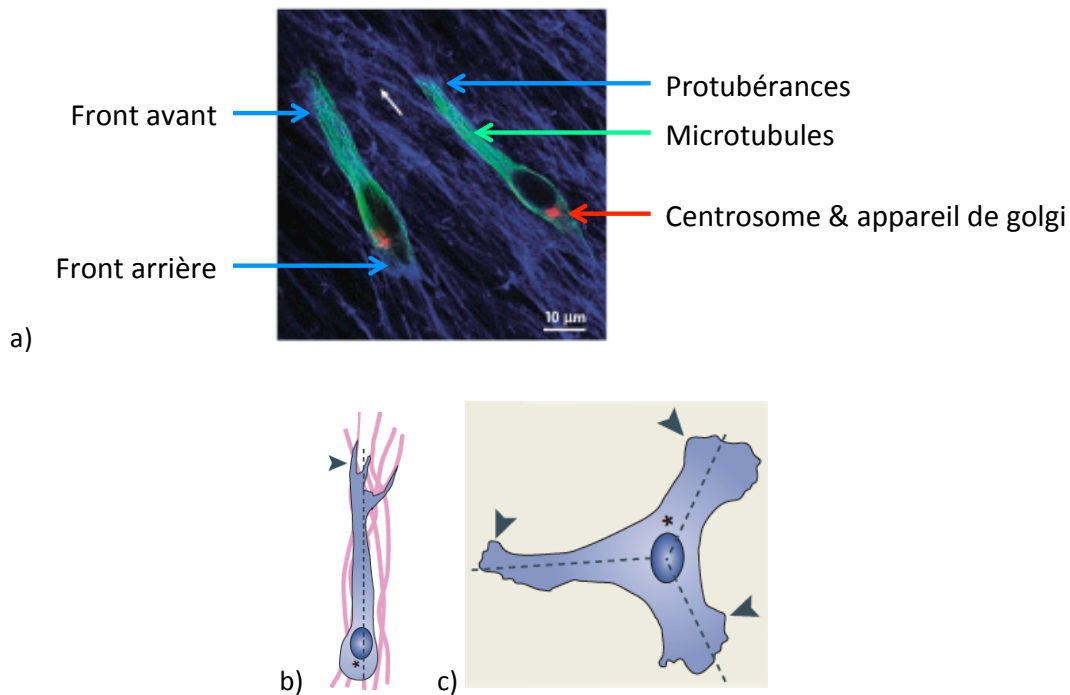


Figure 11 : Morphologie de la cellule en migration

a) Image de microscopie confocale de fibroblastes en migration sur une matrice à topographie linéaire et ne présentant qu'un seul axe de migration. La flèche blanche représente la direction de migration (barre d'échelle : 10 μm). b) Représentation d'une cellule en migration sur un support à topographie linéaire ne présentant qu'un seul axe de migration. c) Représentation d'une cellule en migration sur un support en deux dimensions sans topographie de surface et présentant plusieurs axes de migration. Les flèches bleues pointent les protubérances (d'après Petrie et al. 2009).

Dans le cas des cellules cultivées sur un support à topographie de surface linéaire, les cellules ne présentent qu'une protubérance et n'ont donc qu'un seul axe de migration (Figure 11.a et b). Cet axe de migration permet aux cellules d'avoir une migration directionnelle. Lorsqu'elles sont cultivées sur un support sans topographie de surface définie, les cellules forment plusieurs protubérances et ont une migration plus aléatoire (Figure 11.c). Les cellules migrent alors dans la direction de la protubérance la plus stable (Petrie et al. 2009).

III. B. Les différents types de migration

III. B. 1. La migration isolée vs collective

Il existe plusieurs modes de migration cellulaire : il est possible de différencier les cellules à **migration collective** des cellules à **migration isolée**. Dans le cas de la migration isolée, les cellules restent très peu en contact entre elles au cours de leur déplacement et ont des directions de déplacement aléatoires. Dans le cas de la migration collective, les cellules restent en contact entre elles lors de leur déplacement. La vitesse de déplacement des cellules et le degré de coordination entre les cellules pendant la migration sont variables entre les types cellulaires. La migration collective permet aux cellules mobiles de transporter les cellules « statiques » avec elles et à l'ensemble des cellules d'agir collectivement pour avoir un impact plus robuste que lors de la migration isolée. Différents types de migration collective sont recensés. Lors de la **migration en**

feuille, les cellules restent en contact étroit leur permettant ainsi de migrer ensemble vers l'avant (Figure 12.a). Il est possible de distinguer quelques cellules au niveau du front de migration qui « dirigent » le reste des cellules et se déplacent ensemble vers l'espace libre. Cette migration en feuille se fait essentiellement sur des supports en deux dimensions. Dans ce type de migration, toutes les cellules contribuent activement au mouvement de migration. Néanmoins, par rapport aux cellules qui se trouvent à l'arrière du feuille, les cellules dans le front avant ont une migration et une polarisation plus importante et forment plus de protubérances.

Le deuxième type de migration collective est la **migration en cohorte**. Les cellules restent également en contact étroit entre elles mais ne migrent pas toutes ensemble (Figure 12.b). Une ou plusieurs cellules commencent à migrer, et les autres cellules suivent. Les cellules dans le front de migration sont polarisées avec un front avant libre et un front arrière lié aux cellules à l'arrière. Les protubérances formées par ces cellules vont dicter la direction de déplacement.

Enfin, la migration collective peut être **en flux**. Ce terme indique que les cellules migrent ensemble mais avec un arrangement plus lâche et moins ordonné que dans les deux types de migration précédents (Figure 12.c). Dans ce cas, les cellules migrent ensemble mais ne sont pas tout le temps en contact entre elles. Les cellules sont toutes allongées et polarisées et ont une vitesse de migration élevée (Rørth 2009).

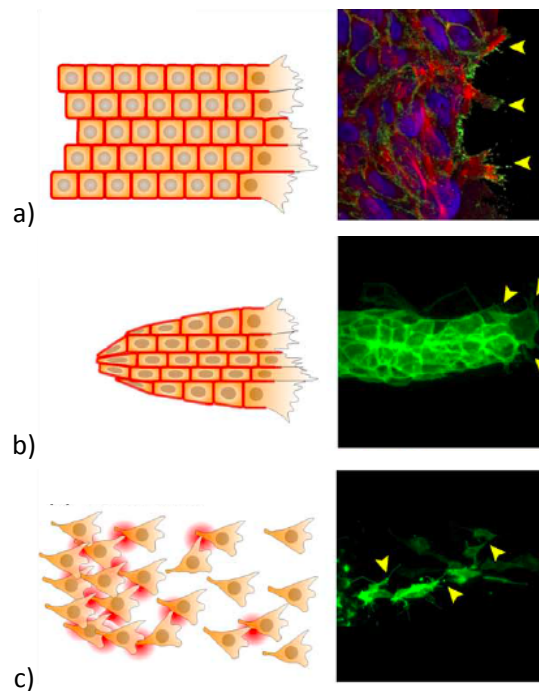


Figure 12 : Types de migration collective

Représentation des trois principaux types de migration collective. a) Migration en feuille. b) Migration en cohorte. c) Migration en flux (d'après Mayor & Carmona-Fontaine 2010).

Lors des processus pathologiques impliquant la migration comme la dissémination tumorale, le déplacement des cellules correspond à une collaboration entre les deux types de migration collective et isolée. Cependant, un mode de migration collective est préférentiellement utilisé par les cellules de cancers épithéliaux alors que la migration individuelle semble plus propice à la dissémination des

cellules de leucémies, lymphomes et tumeurs solides comme les sarcomes (Hegerfeldt & al. 2002 ; Friedl & Wolf 2003).

Le comportement migratoire des cellules peut être modifié en fonction des conditions du milieu environnant. Ainsi, les cellules à migration individuelle peuvent passer à un mode de migration collective et inversement (Moll & al. 1993; Haeger et al. 2014).

III. B. 2. Migration directionnelle vs aléatoire

Selon les différents paramètres de la matrice extracellulaire (biochimiques, mécaniques, topographiques) et le type cellulaire, les cellules peuvent avoir une **migration directionnelle** ou une **migration aléatoire** (Figure 13). Ces deux types de migration découlent généralement de la capacité des cellules à migrer de façon isolée ou collective. Ces deux types de migration sont dépendants de la composition biochimique et la structure du support. Une étude récente a par exemple montré que les isoformes de la laminine et leur ratio déterminent la capacité des cellules à migrer de façon directionnelle ou aléatoire (Greciano et al. 2012). Les cellules ont une préférence à migrer de façon directionnelle en fonction d'un gradient de facteur de croissance ou encore selon la topographie linéaire des supports. Il a ainsi été montré que les cellules migrent plus vite et de façon plus directionnelle sur un support 3D avec une topographie linéaire (Tzvetkova-Chevolleau et al. 2008; Corall et al. 2014). Les cellules se déplacent également préférentiellement vers des supports rigides (Plotnikov & al. 2012; Plotnikov & Waterman 2013).

La formation de protubérances stables détermine également l'axe de direction des cellules. Les récepteurs d'adhérence exprimés par ces cellules interviennent dans la stabilité de ces protubérances. Par exemple, sur des supports de fibronectine, il a été montré que les intégrines $\alpha 5\beta 1$ seraient responsables de la migration aléatoire des cellules alors que les intégrines $\alpha \nu\beta 3$ seraient responsables de la migration directionnelle (Danan et al. 2005). Sur un support de laminine, les intégrines $\alpha 3\beta 1$ favorisent la migration directionnelle des cellules alors les intégrines $\alpha 6\beta 4$ n'ont pas d'influence (Greciano et al. 2012).

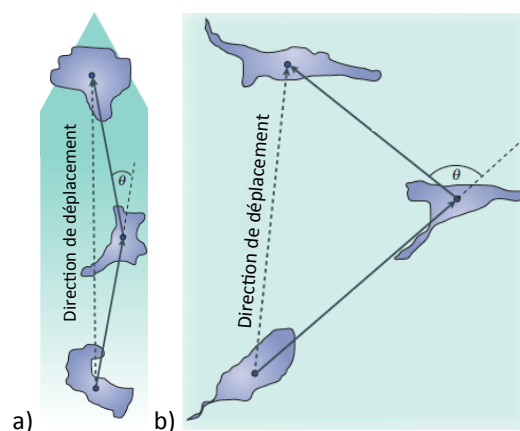


Figure 13 : Représentation de la migration directionnelle et aléatoire

Représentation du chemin de déplacement d'une cellule qui est directionnelle en présence d'un gradient croissant de facteur de croissance (a) et aléatoire en présence d'une répartition homogène de facteur de croissance (b). Dans le cas d'une migration directionnelle, les cellules empruntent un chemin de déplacement (flèche pleine) de distance presque égale à la distance la plus courte pour parcourir ce même chemin (flèche en pointillée). Dans le cas d'une migration aléatoire, les cellules empruntent un chemin de déplacement de distance plus importante que la distance la plus courte pour parcourir ce même chemin. L'angle de déviation θ de ce chemin est plus important que dans le cas d'une migration directionnelle.

III. B. 3. Stratégies migratoires

Les cellules peuvent avoir différentes stratégies de migration : individuelle amiboïde, mésenchymateuse individuelle ou mésenchymateuse collective (Figure 14) (Kwon et al. 2011). Lors de la migration **individuelle amiboïde**, les cellules migrent en réorganisant la matrice indépendamment de toute activité protéolytique. Les cellules adoptent une stratégie de mouvement dépendante de l'élasticité locale de la matrice et de l'espace disponible : les cellules changent de morphologie pour s'adapter à l'espace préexistant, puis la modification de leur cytosquelette d'actine induit la déformation de la matrice environnante. Si l'espace est trop petit, les cellules se rétractent et migrent dans une autre direction où se trouve plus d'espace libre. Les cellules adoptant ce mode de migration sont extrêmement déformables et ont une adhérence au support diminuée par rapport à d'autres types cellulaires (Friedl & Wolf 2003; Wolf & Friedl 2011). Dans le cas de la migration **individuelle mésenchymateuse**, les cellules ont une morphologie allongée. Le déplacement de la cellule à travers la matrice est possible grâce à la contraction de l'actomyosine intracellulaire et grâce à la dégradation de la matrice par les protéases sécrétées de la cellule en migration. Ce mode de migration est souvent associé à une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules. Enfin, les cellules peuvent présenter une **migration collective mésenchymateuse** (Kwon et al. 2011; Oyanagi et al. 2012; Yu & Machesky 2012). Dans ce cas, les cellules restent en contact et celles situées au niveau du front avant de migration ont une activité protéolytique déterminant la direction de déplacement.

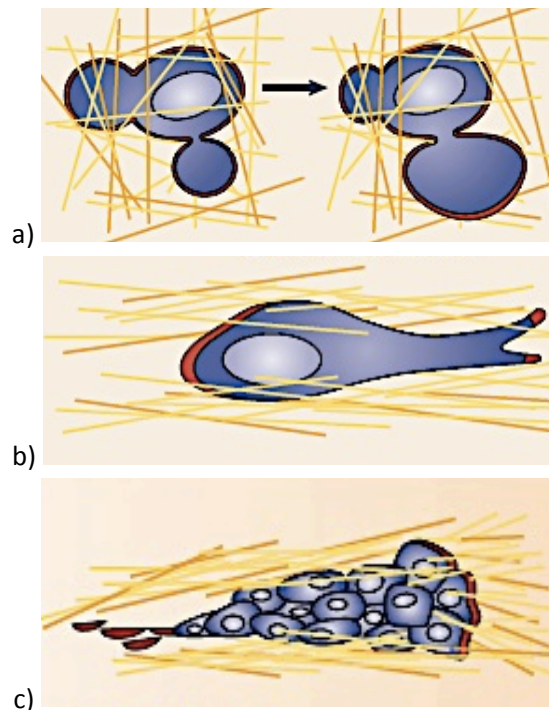


Figure 14 : Stratégies de migration

a) Migration amiboïde. La cellule individuelle se déforme pour s'adapter à l'espace disponible. b) Migration individuelle mésenchymateuse. La cellule individuelle restructure et dégrade l'environnement pour se déplacer. c) Migration collective mésenchymateuse. Plusieurs cellules migrent ensemble en restructurant et dégradant la matrice (d'après Friedl & Wolf 2003).

Le mode de migration mis en place est différent selon le type cellulaire. Kwon & al ont classifiés certaines cellules cancéreuses ovariennes en fonction de leur mécanisme d'invasion. Il a ainsi été montré que les cellules OVCAR5 et SKOV3 envahissent la matrice environnante selon un modèle de migration collective et protéolyse-dépendant alors que les cellules OVCAR10 ont un mécanisme d'invasion amiboïde (Kwon et al. 2011). En fonction des conditions du milieu environnant et en raison de la capacité des cellules à s'adapter, la stratégie migratoire des cellules peut être modifiée. Ce passage d'une stratégie de migration à une autre est médié par une modification des interactions cellule-cellule et/ou une modification de l'activité protéolytique (Friedl & Wolf 2003). Par exemple, Il a été montré que les cellules de mélanome et fibrosarcome passent d'une invasion individuelle à une invasion collective lorsque la concentration en collagène augmente dans la matrice (Haeger et al. 2014). Lors de ces conversions de mode migratoire, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules est observable. La TEM permet aux cellules de passer d'une migration collective à individuelle en diminuant notamment l'expression des molécules d'interaction cellule-cellule et en augmentant l'expression des protéases (Oyanagi et al. 2012; Friedl & Wolf 2003).

III. C. Mécanismes de migration cellulaire et signalisations associées

III. C. 1. Les étapes du processus migratoire

Le déplacement des cellules se fait en plusieurs étapes (Figure 15) (Wolf & Friedl 2011) :

- Formation des protubérances à l'avant de la cellule et interactions avec la matrice
- Liaison du front avant de la cellule au support et/ou protéolyse locale autour de la cellule pour libérer de l'espace
- Contraction des filaments d'actomyosine permettant à la cellule de changer de forme et de générer des forces de traction
- Turn-over des structures d'adhérence à l'arrière de la cellule permettant à la cellule de rétracter son front arrière pour permettre le glissement de la cellule vers l'avant

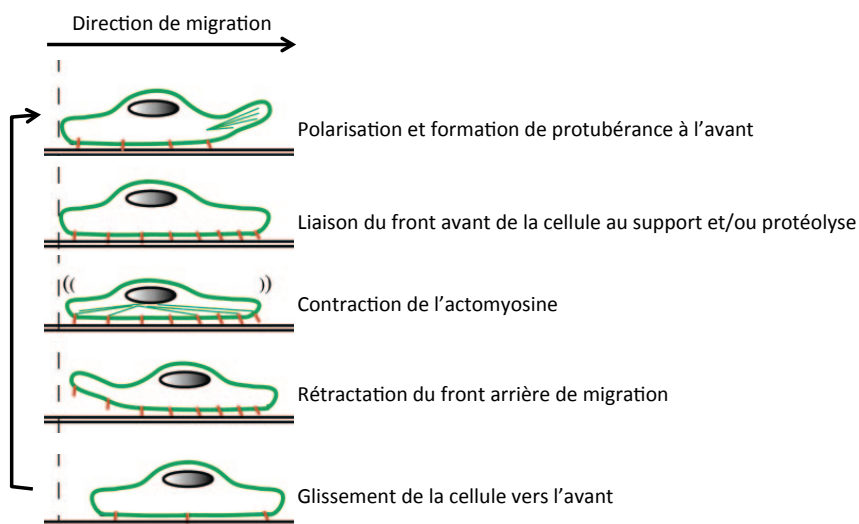


Figure 15 : Etapes majeures de la migration cellulaire

(d'après Lamalice et al. 2007)

III. C. 2. Transition épithélio-mésenchymateuse

Les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses ont des morphologies distinctes (Figure 16). Les cellules épithéliales forment des tapis cellulaires très jointifs. Elles ont une morphologie régulière et sont polarisées avec une face basale et une face apicale. A l'inverse, les cellules mésenchymateuses sont beaucoup moins jointives et ont une morphologie plus étirée. Les cellules mésenchymateuses ont des capacités migratoires accrues par rapport aux cellules épithéliales. Les molécules de la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance présents dans la matrice peuvent être à l'origine d'un passage d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux au cours du processus appelé **transition épithélio-mésenchymateuse** (TEM). Cette TEM est associée à une augmentation des marqueurs mésenchymateux : les cellules ont une morphologie allongée, elles se dispersent lors de la migration, l'expression des E-cadhérines au niveau de la membrane plasmique est diminuée au profit des N-cadhérines, la vimentine et l' α -SMA (α -smooth muscle actin) ainsi que les facteurs de transcription tels que Snail et Slug sont également surexprimés. Enfin, la matrice produite est également modifiée avec une accumulation plus importante de fibronectine et une surexpression des protéases dont les MT1-MMP, les MMP-2 et les MMP-9 (Oyanagi et al. 2012; Lee 2006; Lim & Thiery 2012; Scanlon et al. 2013).

Il est possible de trouver des cellules intermédiaires à ces deux phénotypes. Ces cellules ont un phénotype métastable exprimant certain des marqueurs épithéliaux et certains des marqueurs mésenchymateux comme par exemple une expression de N-cadhérine et la conservation d'une légère polarisation apico-basale (Lee 2006).



Figure 16 : Phénotype des cellules épithéliales et mésenchymateuses

Représentation de différents phénotypes cellulaires. A gauche, cellules épithéliales jointives, pavimenteuses, statiques, présentant une polarisation apico-basale et de l'actine corticale et exprimant les E-cadhérines. A droite, cellules mésenchymateuses individualisées, allongées, motiles, présentant une polarisation antéro-postérieure, résistantes à l'anoïkis et exprimant les N-cadhérines, l' α -SMA et la fibronectine. Au centre, cellules métastables ayant un phénotype intermédiaire entre épithélial et mésenchymateux (d'après Lee 2006).

III. C. 3. Signalisations et mécanismes régulateurs de la migration

III. C. 3. a. Polarisation cellulaire antéro-postérieur

La **polarisation** antéro-postérieur de la cellule en migration correspond à la mise en place d'un **front avant** et d'un **front arrière**. Cette polarisation est déterminée en partie par des facteurs externes aux cellules. La reconnaissance du milieu environnant par les cellules se fait par l'intermédiaire des intégrines et des syndécans-4 tandis que la détection des cellules environnantes se fait, entre autres, par des interactions cadhérines-cadhérines.

L'activation des intégrines permet le recrutement des aPKC, enzymes qui permettent de phosphoryler les protéines de signalisation cytosoliques dont les Rho GTPases. Les protéines de la famille **Rho GTPases** sont des **protéines de signalisation** intervenant dans divers comportements

cellulaires dont la migration, notamment en régulant la dynamique des filaments d'actine. Elles sont essentielles dans le contrôle de la polarité lors de la migration cellulaire. Parmi les Rho GTPases, Cdc42 et Rac1 interviennent dans le front avant de migration en favorisant respectivement la polymérisation du cytosquelette d'actine dans les filipodes et les lamellipodes (Figure 17), tandis que RhoC favorise la formation du lamellipode tout en limitant son élargissement trop important au front avant de migration. Les molécules RhoA se localisent préférentiellement dans le front arrière où elles favorisent la formation et la contraction des fibres de stress (Mayor & Carmona-Fontaine 2010) et limitent la formation des protubérances latérales. RhoA et RhoC interviennent dans le contrôle de la localisation de **Rac1 dans le front avant de migration** (Danen et al. 2005; Bass et al. 2007; Vega et al. 2011; Bravo-Cordero et al. 2013). La cavéoline intervient également dans le contrôle de la polarisation. L'absence de cavéoline diminue l'activité de RhoA dans le front arrière de migration et empêche l'internalisation de Cdc42 et Rac1 dont les activités augmentent dans le front avant (Grande-Garcia et al. 2007). Cette dérégulation des cavéolines mène à la formation de protubérances latérales responsables de la migration aléatoire (Petrie et al. 2009).

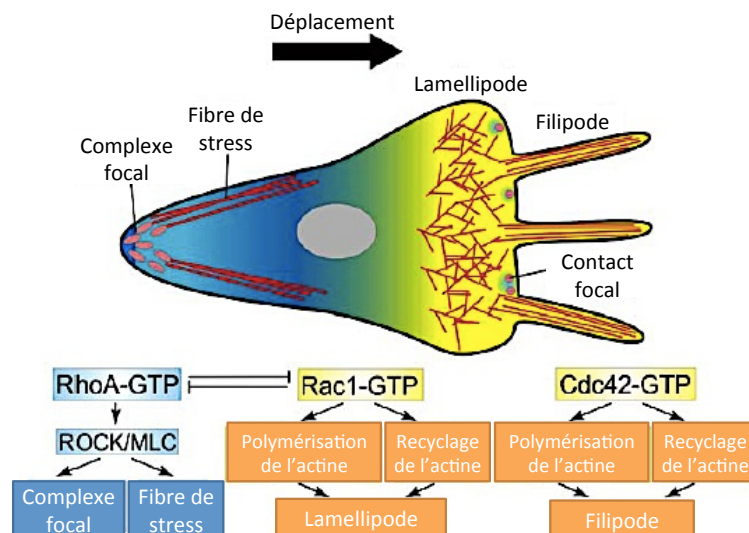


Figure 17 : Contrôle de la polarité des cellules pendant la migration par les Rho GTPases

Représentation des voies de signalisation Rho GTPases. Cdc42 se localisent essentiellement à l'avant de la cellule en migration et favorise la polymérisation de l'actine dans les filipodes. Rac1 favorise la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes. RhoA favorise la formation et la contraction des fibres de stress dans le front arrière de la cellule (d'après Mayor & Carmona-Fontaine 2010).

III. C. 3. b. Interaction cellule-matrice au niveau du front de migration

Lors de la migration, les syndécans agissent en collaboration avec les intégrines pour favoriser l'activité de Rac1 dans la protubérance principale et limiter son activité dans les zones latérales afin d'empêcher la formation de pseudopodes latéraux, l'ensemble favorisant la migration directionnelle des cellules (Bass et al. 2007).

L'interaction intégrine-matrice permet également le recrutement et l'activation de Cdc42 au niveau de la membrane plasmique du front avant de migration (Etienne-Manneville & Hall 2001). Cdc42 permet ainsi le recrutement à la membrane du complexe Par, qui est constitué de Par3, Par6 et aPKC (atypical protein kinase C). Par6 et aPKC stabilisent les microtubules dans les protubérances membranaires. Sur ces microtubules la dynéine, qui est un moteur moléculaire, permet d'une part

de maintenir le centrosome dans la zone cellulaire antérieure au noyau et d'autre part le transport antérograde, de l'appareil de Golgi vers le front avant de migration, de matériels nécessaires à la mise en place des protubérances (actine, protéines de signalisation par exemple) (Prigozhina & Waterman-Storer 2004 ; Petrie et al. 2009).

La protéine Par3 interagit et induit la phosphorylation de NUMB, inhibant ainsi son interaction avec la sous-unité β des intégrines et empêchant les intégrines d'être internalisées par les vésicules de clathrines (Figure 18). Les intégrines résidentes à la membrane favorisent alors la formation d'une large protubérance favorisant la migration directionnelle (Nishimura & Kaibuchi 2007 ; Petrie et al. 2009).

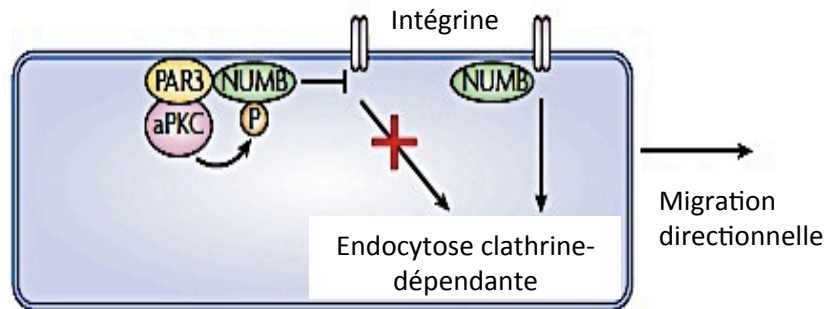


Figure 18 : Régulation de l'internalisation des intégrines par l'endocytose clathrine-dépendante

La phosphorylation de NUMB par la protéine Par3 empêche l'internalisation des intégrines par la voie d'endocytose clathrine-dépendante. La migration directionnelle est ainsi favorisée (d'après Petrie et al. 2009).

III. C. 3. c. Protéolyse cellulaire

La protéolyse cellulaire intervient dans la migration des cellules. Elle permet notamment de dégrader la matrice, frayant ainsi un chemin aux cellules en migration. La protéolyse diffuse et la protéolyse péricellulaire interviennent toutes les deux dans cette migration.

L'action de l'uPA et la MMP-9 favorisent la migration des cellules épithéliales bronchiales. Leur inhibition ralentit leur vitesse de migration alors que leur apport exogène l'accélère (Legrand et al. 2001). L'inhibition de l'expression des métalloprotéases membranaires MT1-MMP réduit également la vitesse de migration des cellules de fibrosarcomes (Woskowicz et al. 2013; Corall et al. 2014).

Dans les deux études, les protéases exprimées sont localisées à la périphérie cellulaire indiquant que la migration cellulaire semble favorisée par une protéolyse péricellulaire, même si la protéolyse diffuse y contribue.

III. C. 3. d. Recyclage des structures d'adhérence

Les molécules cytosoliques trouvées au niveau des contacts focaux contribuent au recyclage des intégrines. Les cofilines, protéines régulant la polymérisation de l'actine, permettent aux petites GTPases de la famille Rab (impliquée dans le trafic cellulaire) d'enclencher une signalisation de recyclage des intégrines au niveau du front avant de migration. Par exemple, RAB4 activée par les cofilines permet le recyclage des intégrines $\alpha\beta3$ depuis les endosomes vers la membrane plasmique pour favoriser la migration directionnelle (Figure 19.a). En revanche, suite à l'inactivation des cofilines phosphorylées par RhoA et ROCK1, RAB11 permet le recyclage des intégrines $\alpha5\beta1$ à la

membrane et une migration plus aléatoire (Figure 19.b) (Roberts et al. 2001 ; Woods et al. 2004 ; White et al. 2007; Petrie et al. 2009). La phosphorylation des syndécanes permet également de contrôler le recyclage des intégrines. En effet, la phosphorylation des syndécane-4 permet le recyclage à la surface membranaire des intégrines $\alpha\beta3$ au détriment des intégrines $\alpha5\beta1$ pour favoriser la migration directionnelle, alors que l'inhibition de cette phosphorylation favorise le recyclage des intégrines $\alpha5\beta1$ et bloque la migration en générale (Figure 19.c) (Morgan et al. 2013).

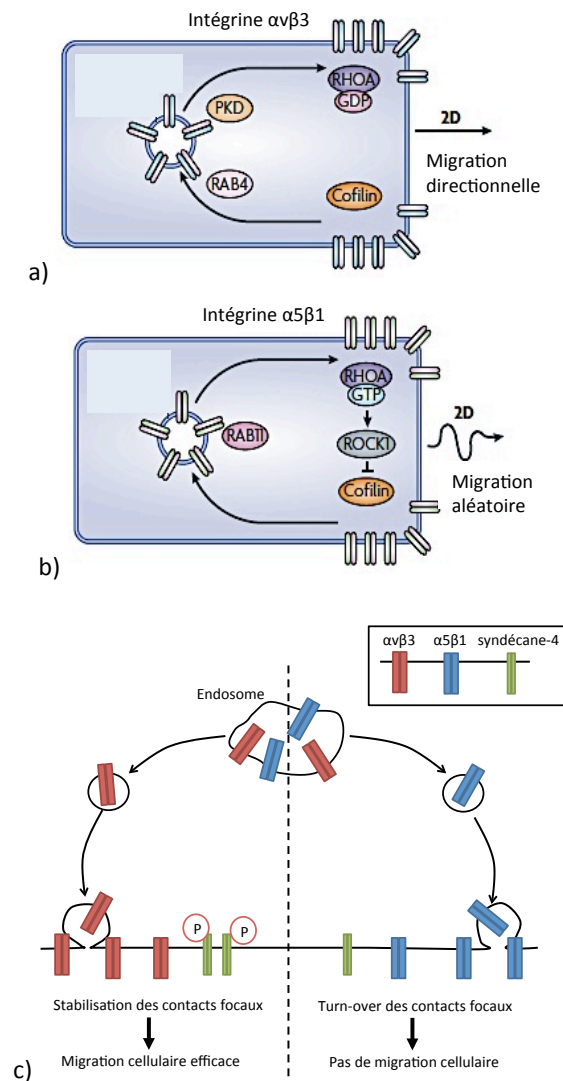


Figure 19 : Le trafic des intégrines et la migration directionnelle

Le trafic spécifique des intégrines contribue à la migration directionnelle des cellules. a) L'activation des coflines permet le recyclage des intégrines $\alpha\beta3$ depuis les endosomes vers la surface membranaire et favorise la migration directionnelle. b) L'inactivation des coflines permet le recyclage des intégrines $\alpha5\beta1$ vers la membrane et favorise la migration aléatoire (d'après Petrie et al. 2009). c) Représentation schématique du contrôle du recyclage des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$ lors de la migration cellulaire (d'après Morgan et al. 2013).

Toutefois, ces voies de signalisation ne peuvent pas être généralisées puisque le rôle des protéines GTPases et du recyclage des intégrines est différent selon la structure de la matrice (2D et 3D) (Corall et al. 2014) et la nature du support (Petrie et al. 2009; Greciano et al. 2012).

III. C. 3. e. Inhibition de contact lors de la migration

Pendant la migration, les cellules sont amenées à se rencontrer générant ainsi des signaux d'**inhibition de contact**. Cette inhibition de contact met un terme aux mouvements de migration de la cellule dans sa direction originelle : ainsi, plutôt que de se chevaucher, les cellules arrêtent leur déplacement ou se dispersent dans d'autres directions. La vitesse de migration diminue avec le nombre de cellules rencontrées. Pendant le déplacement, deux cellules qui se rencontrent rentrent en contact par l'intermédiaire de récepteurs d'adhérence membranaires comme les cadhérines. L'activité protubérante est ainsi inhibée au niveau de la zone de contact par des voies de signalisation en aval des cadhérines. Cela permet à la cellule de se **repolariser** en générant une nouvelle zone de protubérance et de migrer dans sa direction. Dans le cas des cellules isolées, ce processus permet la **redirection des cellules** alors que dans le cas des cellules en groupe, cette inhibition de contact favorise la **migration directionnelle** des cellules vers l'avant (Figure 20) (Mayor & Carmona-Fontaine 2010).

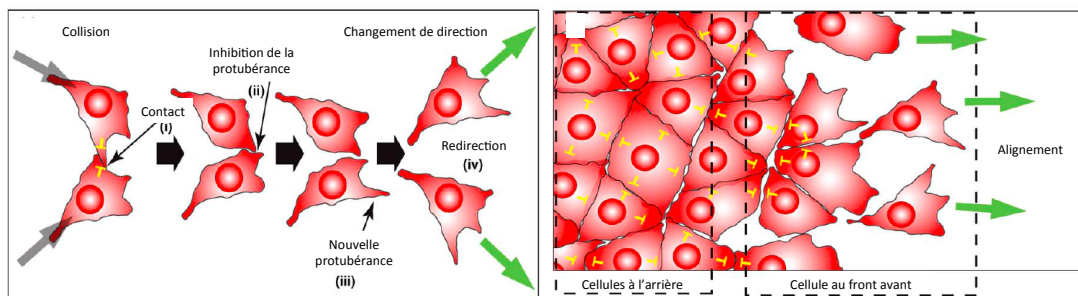


Figure 20 : Inhibition de contact lors de la migration

L'inhibition de contact est représentée par des flèches jaunes. A gauche, inhibition de contact lors de la migration des cellules isolées. La collision des cellules isolées lors de la migration mène au changement de direction du déplacement cellulaire. A droite, inhibition de contact lors de la migration collective. L'inhibition de contact entre cellules mène à la polarisation de ces dernières à l'avant du front de migration et à la migration directionnelle du groupe cellulaire entier (d'après Mayor & Carmona-Fontaine 2010).

Les inhibitions de contact lors de la migration peuvent être **homotypiques** entre deux cellules de même type ou **hétérotypiques** entre deux types cellulaires différents (Figure 21). Lors du développement tumoral, par exemple, l'invasivité des cellules n'est pas uniquement corrélée à une augmentation des capacités migratoires mais aussi à une diminution de l'inhibition de contact par les cellules environnantes. Dans ce cas, la diminution de l'inhibition de contact hétérotypique permet aux cellules tumorales d'envahir le tissu sain (Mayor & Carmona-Fontaine 2010).

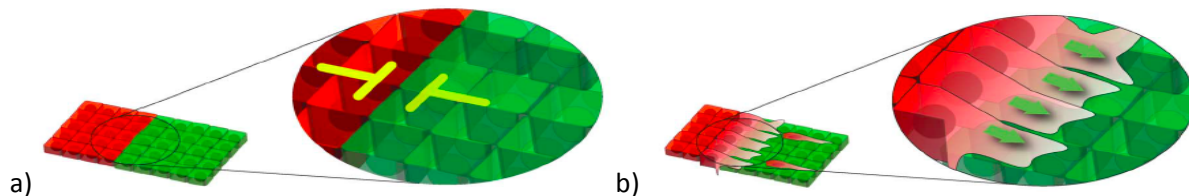


Figure 21 : Inhibition de contact hétérotypique

a) Représentation de l'inhibition de contact (flèche jaune) entre deux populations cellulaires saines de couleurs différentes (rouge et vert).
 b) Représentation de la perte d'inhibition de contact d'une population cellulaire (rouge) menant à l'invasion du second groupe cellulaire (vert) dans certains cas pathologiques (d'après Mayor & Carmona-Fontaine 2010).

La direction lors de la migration cellulaire est contrôlée, entre autre, par la polarisation antéro-postérieure, la protéolyse cellulaire, le recyclage des intégrines et l'inhibition de contact entre cellules.

En résumé :

La migration est un comportement cellulaire complexe qui peut être de plusieurs types :

- individuelle ou collective
- directionnelle ou aléatoire

Cette migration cellulaire peut être :

- protéolyse-dépendante dite mésenchymateuse
- protéolyse-indépendante dite amiboïde

Le mode de migration des cellules n'est pas exclusif. Les cellules peuvent enclencher des transitions d'un mode de migration à un autre en fonction des conditions de l'environnement.

La direction de déplacement lors de la migration est dictée par la polarisation antéro-postérieure des cellules. Cette polarisation est contrôlée par les voies de signalisation mises en place en réponse aux signaux extracellulaires. La protéolyse cellulaire, le recyclage des intégrines et l'inhibition de contact entre cellules lors de la migration font partie des mécanismes contrôlant la migration.

L'organisation de la matrice joue également un rôle important dans la migration cellulaire. Cette organisation se fait en partie par l'assemblage des protéines entre elles.

PARTIE 2 : DYNAMIQUE STRUCTURALE ET ASSEMBLAGES DES PROTEINES

PREAMBULE :

L'objectif de notre étude est d'étudier la relation structure-fonction de la fibronectine. En effet, la fonction des molécules matricielles est en partie déterminée par leur structure. Or les différentes molécules constituant la matrice extracellulaire sont des éléments structurellement dynamiques. En fonction des conditions environnementales, elles peuvent acquérir différentes conformations moléculaires mais également supramoléculaires. Ainsi, les protéines peuvent former des assemblages. Ces derniers correspondent à l'association de plusieurs molécules par l'intermédiaire de différents types de liaison.

I. LE REPLIEMENT DES PROTEINES – GENERALITES

I. A. Les chemins de repliement et l'état natif des protéines

L'acquisition de la **structure tridimensionnelle** des protéines est un processus moléculaire **dynamique** nécessitant des mécanismes de repliement dont certains points restent encore obscurs à ce jour. D'après le paradoxe de Levinthal, une protéine possède un nombre incalculable de conformations possibles présentant des énergies libres (énergie nécessaire pour maintenir la structure) différentes. L'une de ces conformations, l'état « natif » et fonctionnel, posséderait l'énergie la plus faible (Levinthal 1968 ; Zwanzig et al. 1992; Karplus 1997). Or, le temps de repliement des petites protéines (<100 acides aminés) étant de l'ordre de la **milliseconde**, il est impossible que le repliement dans leur état natif et fonctionnel se fasse selon un modèle de recherche aléatoire où la molécule se replierait dans tout ses états conformationnels possibles avant d'acquiescer son état natif.

Ces considérations amènent à s'interroger sur la définition de l'**état natif** d'une protéine. La structure « native » a souvent été définie comme la conformation de la protéine dont l'énergie libre est la plus faible dans les conditions physiologiques (Dobson 2003). Néanmoins, il semble plus juste de décrire cet état natif comme l'état de la protéine la plus métastable (stable cinétiquement mais pas forcément thermodynamiquement) dans un environnement donné, et qui a une énergie libre suffisamment faible pour permettre à la protéine de « survivre » face aux perturbations du système biologique (Ben-Naim 2012). L'état « natif » pourra donc être **différent selon le système biologique** étudié. Il ne faut pas exclure que, dans un système biologique donné, **plusieurs états conformationnels** d'une même molécule pourront **coexister**.

Le repliement des protéines est accéléré et guidé par des forces qui permettent la formation rapide d'interactions locales intramoléculaires, formant ainsi des noyaux de repliement à partir desquels le reste des structures se forment plus facilement et déterminent le repliement de la protéine (Dobson 2003). Les forces sont déterminées par la nature des constituants de la protéine (acides aminés, glycosylations, phosphorylations) et les conditions de l'environnement dont notamment le solvant, la température, l'encombrement moléculaire (Ben-Naim 2012; Maisuradze et al. 2012; Zhou 2013). A chaque étape du repliement d'une protéine, il existe plusieurs états de transition possibles (Figure 22). Certains de ces états ont une probabilité égale ou plus importante d'exister alors que certains sont moins probables voire improbables. Ainsi, la diminution de l'entropie (la diminution du nombre de conformation possible à chaque étape) et l'amplitude des forces déterminent la rapidité de

formation des interactions. Ces interactions mènent ainsi à des **chemins de repliement préférentiels**. Ainsi la protéine se replie selon une probabilité importante le long de ces chemins préférentiels et une probabilité négligeable le long des autres chemins. Ces forces, telles que les interactions hydrogènes ou électrostatiques, mènent la protéine à se replier selon une gamme étroite de possibilité où le repliement par le hasard est réduit, non pas pour la mener vers la « bonne » configuration, mais vers une conformation relativement stable en un temps très court et en fonction des conditions du microenvironnement (Anfinsen 1973; Ben-Naim 2012).

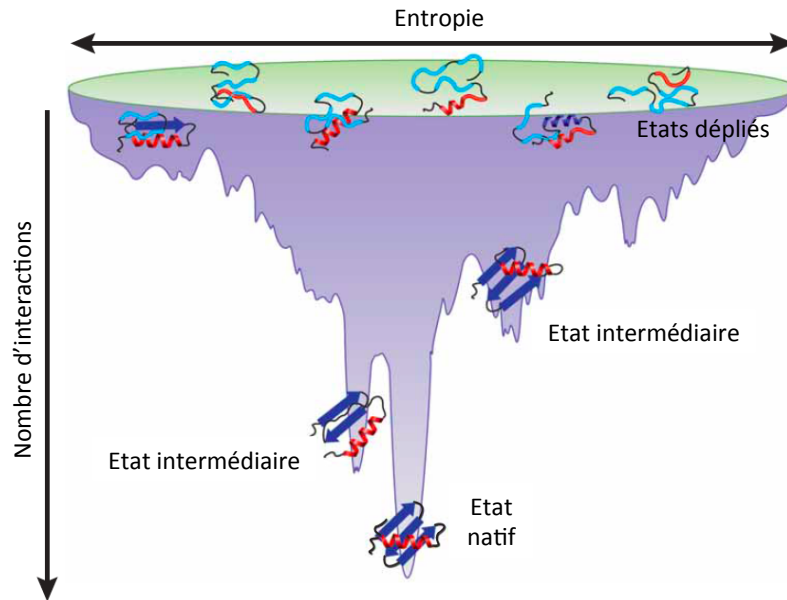


Figure 22 : Chemins de repliement des protéines

Représentation des chemins de repliement depuis plusieurs états dépliés d'une protéine vers des états intermédiaires puis l'état natif (d'après Bartlett & Radford 2009).

I. B. Systèmes de contrôle du repliement des protéines

Les protéines peuvent acquérir différentes conformations dont chacune pourra avoir une fonction spécifique. Lors du repliement, les protéines qui ne se sont pas encore totalement repliées exposent inévitablement certaines régions enfouies et sont donc susceptibles d'interagir de façon inappropriée avec d'autres macromolécules de l'environnement encombré des systèmes biologiques. Afin de limiter l'accumulation de protéines mal repliées, des mécanismes de contrôle sont mis en place à différentes étapes de la « vie » d'une protéine.

I. B. 1. Facteurs intrinsèques aux protéines

Le premier mécanisme mis en place dans les cellules pour lutter contre le mauvais repliement et les assemblages aberrants des protéines est la régulation de l'**expression des protéines**. Les protéines s'agrégeant plus facilement sont moins exprimées par les cellules que les autres. Dans le cas où leur expression est élevée, ces protéines ont une durée de vie plus courte (Tartaglia et al. 2007). Les chaînes protéiques ayant une tendance à s'agréger correspondent notamment aux protéines contenant des **régions hydrophobes**.

Il existe des **protéines intrinsèquement désordonnées** (avec une absence de structures secondaires et tertiaires) et des protéines contenant de **larges régions non-structurées**. L'absence de structures secondaires procure aux protéines une grande « plasticité » structurale. Ces dernières peuvent donc acquérir différentes conformations pour interagir avec différents partenaires (Tompa 2002; Uversky et al. 2008). La conformation que ces protéines adoptent est dans ce cas définie par leur interaction avec leur partenaire et non pas par leur séquence en acides aminés. Cette particularité confère aux régions déstructurées une haute spécificité d'interaction mais avec une affinité faible. Suite à des modifications de l'environnement, ces régions peuvent également interagir avec le mauvais partenaire et/ou s'agréger. Néanmoins, ces protéines sont constituées de séquences d'acides aminés avec une **hydrophobicité faible** et une **charge nette élevée**, qui sont deux paramètres atténuant le risque d'agrégation (Tompa 2002; Uversky et al. 2008).

Même si elles sont produites de sorte à empêcher leur agrégation, il a été montré que les pathologies induites par un dépôt anormal de protéines sont associées à la présence de ces séquences spécifiques (Uversky et al. 2008). Les protéines p53 et l' α -synucléine, respectivement impliquées dans les agrégations anormales de protéines dans les cellules cancéreuses et nerveuses, sont répertoriées comme possédant de telles régions déstructurées (Uversky et al. 2008).

I. B. 2. Protéines chaperonnes

Au cours du repliement, les protéines spécifiques que sont les **chaperonnes** vont pouvoir **assister** les autres chaînes protéiques dans leur repliement vers la conformation « correcte » en empêchant leur agrégation. Les chaperonnes constituent un groupe de molécules qui interagissent avec les **régions hydrophobes** et les **régions dépliées** des protéines en cours de repliement pour les stabiliser, empêcher leur interaction avec d'autres molécules et/ou les aider à se replier (Amm et al. 2014 ; Comyn et al. 2014). Parmi les chaperonnes, il est possible de citer la Hsp40 dans le cytoplasme ou encore la calnexine et la calréticuline localisées spécifiquement dans le réticulum endoplasmique, organe intracellulaire où les protéines sécrétées transitent avant d'être exportées.

I. B. 3. Systèmes de dégradation des protéines mal repliées

Si les protéines acquièrent une conformation mal repliée, elles sont éliminées. La présence d'une région dépliée va être suffisante pour initier la dégradation par le système lysosomal et le système ubiquitine-protéasome (Benbrook & Long 2012; Inobe & Matouschek 2014).

Les protéines mal repliées peuvent être dégradées dans le **lysosome**. Le lysosome est une structure vacuolaire intracellulaire dont la membrane délimite le compartiment de stockage d'enzymes hydrolytiques avec une fonction de dégradation des protéines à un pH optimal acide.

Le deuxième système de dégradation des protéines mal repliées est le système **ubiquitine-protéasome**. Les protéines destinées à être dégradées par ce système sont généralement liées de façon covalente aux protéines **ubiquitines** qui constituent un **signal de reconnaissance** pour la protéolyse par le **protéasome 26S** (Ciechanover 2012; Ciechanover & Stanhill 2014; Shabek et al. 2012; Comyn et al. 2014). Le protéasome 26S est un complexe enzymatique cylindrique constitué de deux sous-complexes : le **protéasome 19S** et le **protéasome 20S**. Le protéasome 19S permet d'abord la reconnaissance des protéines ubiquitinylées puis assure leur translocation dans le protéasome 20S

qui correspond à la chambre catalytique pour le clivage de la protéine cible en peptides (Figure 23) (Inobe & Matouschek 2014).

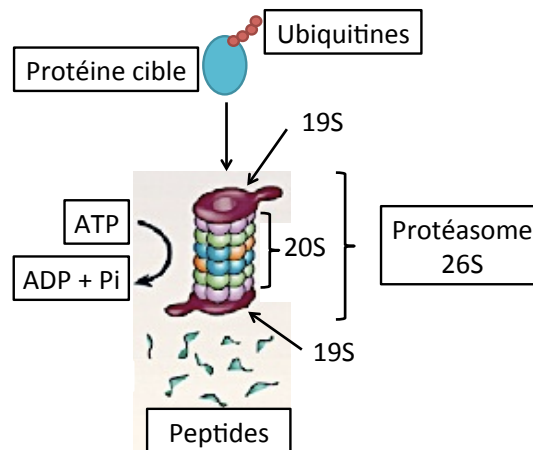


Figure 23 : Système ubiquitine-protéasome

Représentation du système de dégradation ubiquitine-protéasome ATP-dépendant. La liaison covalente des protéines ubiquitines mène la chaîne protéique cible vers le protéasome 26S. Ce dernier dégrade alors la protéine cible en peptides puis acides aminés (d'après Ciechanover 2012).

I. B. 4. Contrôle qualité des protéines extracellulaires

Contrairement aux mécanismes de contrôle du repliement des protéines intracellulaires, ceux contrôlant le repliement des protéines extracellulaires sont moins bien étudiés. Il a été montré que la plupart des protéines plasmatiques sont dégradées par le foie et le système réticulo-endothélial qui correspond à l'ensemble des cellules spécialisées dans la dégradation des molécules (macrophages des tissus conjonctifs, cellules endothéliales et cellules des organes hématopoïétiques (moelle osseuse, ganglions, thymus, rate etc.)). Cela suggère que les protéines défectueuses extracellulaires sont **internalisées puis dégradées**.

Néanmoins, cela n'exclut pas l'existence de mécanismes extracellulaires spécifiques du contrôle du repliement des protéines matricielles. Des études ont montré la présence extracellulaire de certains des constituants des systèmes de contrôle protéique intracellulaires (Poon et al. 2002; Wyatt et al. 2011; Hunter et al. 2014). Par exemple, certaines des chaperonnes aidant au repliement des protéines intracellulaires seraient exportées dans l'espace extracellulaire par les exosomes, vésicules intracellulaires contenant du matériel cellulaire destiné à être libéré dans le milieu extracellulaire (Hunter et al. 2014). La protéine chaperonne Hsp90 fait partie de ces protéines et serait sécrétée sous forme soluble ou associée aux autres protéines. Cette protéine Hsp90 se lie notamment à la fibronectine extracellulaire pour favoriser sa fibrillogenèse mais aussi assurer la stabilité du réseau de fibronectine formé (Hunter et al. 2014).

Deux **protéines chaperonnes** spécifiques du compartiment extracellulaire ont été identifiées dans les matrices : la **clusterine** et l'**haptoglobine**. Ces deux chaperonnes sont retrouvées dans la plupart des liquides biologiques dont le plasma et le liquide cébrospinal. Elles sont décrites comme ayant le même rôle que les chaperonnes intracellulaires. Elles se lient aux zones hydrophobes libres des protéines mal repliées pour les stabiliser et empêcher leur agrégation, mais n'ont pas la capacité de

les replier (Poon et al. 2002). L'absence de ces chaperonnes peut mener à l'accumulation de protéines insolubles dans les reins (Wyatt et al. 2012).

Certains constituants du système de dégradation protéolytique intracellulaire ont également été détectés dans les espaces extracellulaires. Le protéasome est retrouvé associé aux membranes plasmiques des cellules sanguines (érythrocytes) mais également dans la phase liquide du plasma. Des analyses par ELISA ont montré que la concentration en **protéasome 20S** et **ubiquitine** circulant est accentuée dans le cas de pathologies et que ces concentrations sont dépendantes du stade de la pathologie (Wada & al. 1993 ; Dutaud et al. 2002 ; Sixt & Dahlmann 2008). Cela est notamment le cas des patients atteints de leucémie et de tumeurs solides (mélanome, cancer du sein, reins, poumons etc.), et dans le cas de pathologies non-cancéreuses (cirrhose, hépatite). L'élévation de la concentration en protéasome 20S par rapport au seuil physiologique semble être liée à une sécrétion ou alors à une destruction des cellules malades.

En résumé :

Les protéines sont repliées afin d'acquérir leur structure tridimensionnelle fonctionnelle dite « native ». A différentes étapes de la vie des protéines, des systèmes de contrôle sont mis en place avec :

- le contrôle de la synthèse protéique
- les chaperonnes qui aident au repliement des protéines
- les protéines qui peuvent être dégradées par le lysosome
- les protéines qui peuvent être marquées par les ubiquitines puis dégradées par le protéasome

Les protéines extracellulaires semblent également être soumises à un contrôle :

- elles sont internalisées et dégradées par les cellules
- leur repliement et assemblage semblent régulés par les protéines chaperonnes extracellulaires
- les éléments du protéasome sont retrouvés dans les espaces extracellulaires

En fonction de leur état de repliement et des conditions environnementaux, les protéines peuvent également interagir entre elles pour former des assemblages supramoléculaires. Ces derniers peuvent avoir des structures conformationnelles diverses. Leur mécanisme de formation est également différent en fonction de la protéine étudiée.

II. ASSEMBLAGES DES PROTEINES

Les organismes vivants sont des structures complexes riches en cellules et molécules. Il est donc inévitable que les protéines interagissent entre elles constituant ainsi un réseau d'interactions. L'**interactome** correspond à l'ensemble des interactions qui peuvent être mises en place entre protéines différentes et/ou identiques et à la dynamique de formation de ces interactions (Tompa & Rose 2011). Les protéines peuvent ainsi s'assembler en structures supramoléculaires grâce à ces interactions. Ces assemblages peuvent être composés de plus d'une centaine de protéines identiques ou différentes.

II. A. Types d'assemblage

Les assemblages protéiques peuvent être constitués de **protéines différentes** ou de **protéines identiques**. Dans ce dernier cas, on parle alors d'**auto-assemblage**. **Différents types d'assemblages supramoléculaires** ont été décrits dans la littérature. C. M. Dobson les a récapitulé avec les chemins de repliement pour y parvenir (Dobson 2003). Parmi les assemblages décrits dans la littérature, il est possible de trouver les **assemblages désordonnés** et les **assemblages ordonnés**. Les assemblages ordonnés correspondent à l'association de plusieurs protéines avec un arrangement structural et une morphologie définis tels les fibres, les oligomères, les cristaux ou les fibres amyloïdes. Les assemblages désordonnés présentent un arrangement structural défini mais une morphologie moins définie. Ces différents types d'assemblage peuvent être **réversibles** ou **irréversibles** (Figure 24) (Gosal et al. 2005).

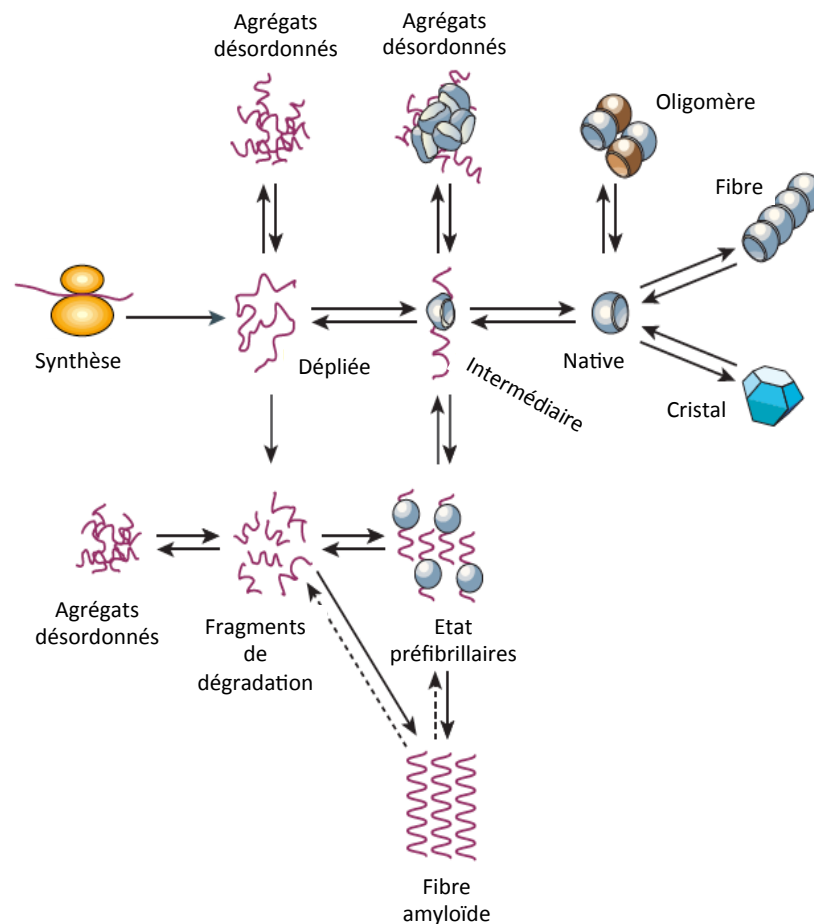


Figure 24 : Exemples de structures supramoléculaires des protéines

Représentation des structures que peut acquérir une chaîne protéique. Suite à sa synthèse, une protéine peut se replier sous sa forme native en passant par des états de repliement intermédiaires. Elle peut également être dégradée ou assemblée. Des assemblages fonctionnels peuvent être formés à partir de la forme native de la protéine : oligomères, fibres et cristaux. D'autres types d'assemblages peuvent être formés à partir des états dépliés et intermédiaires de la protéine. Les fibres amyloïdes représentent un type d'assemblage mais avec la caractéristique d'être très organisé. Chacun des états de la protéine dépend de la stabilité de la protéine selon les conditions environnementales et les mécanismes de régulation du vivant (d'après Dobson 2003).

Des exemples représentatifs de fibres sont les filaments d'actine ou les microtubules (Lodish et al. 2000b). Dans le cas des oligomères, il est possible de citer les pores nucléaires et les oligomères formés par la protéine E7 du papillomavirus (Smal et al. 2012). Même s'ils sont rares, les cristaux peuvent également être trouvés dans les milieux biologiques. C'est le cas de *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis* qui forment des cristaux de protéines lors de la sporulation (Baumann et al. 1991; Pietrantonio & Gill 1992).

L'assemblage supramoléculaire peut mener à une **modification**, un **gain** ou une **perte de fonction** et peut s'ensuivre d'une dégradation ou accumulation dans les systèmes biologiques. Nous pouvons alors citer la protéine p53 mutée dont l'agrégation permet la séquestration des protéines (Xu et al. 2011).

II. B. Mécanismes d'assemblage

La polymérisation peut s'initier à partir de l'état « natif » des protéines ou alors peut nécessiter dans beaucoup de cas le dépliement de ces dernières. Cette dynamique de dépliement des protéines permet l'exposition des séquences d'assemblage qui sont souvent enfouies au cœur de la protéine. Parmi les mécanismes de multimérisation des protéines, la polymérisation nucléation-dépendante et la polymérisation isodesmique sont décrites ici.

II. B. 1. La polymérisation nucléation-dépendante

La **polymérisation nucléation-dépendante** (PND) est constituée de la **phase de nucléation**, la **phase d'élongation** exponentielle et la **phase stationnaire** (Figure 25) (Kumar & Udgaonkar 2010). En solution, certaines protéines forment un **premier noyau** constitué de deux à plusieurs protéines. Ce n'est que suite à la formation de ce noyau que la polymérisation s'initie. La phase de nucléation correspond à la phase de latence qui est le temps nécessaire pour la formation du noyau. La durée de cette phase est dépendante de la concentration en protéine dans le milieu et diminue donc avec la concentration. A partir de ce noyau, le polymère s'allonge jusqu'à atteindre une taille stable en raison de la diminution de la concentration en protéines monomériques dans le milieu réactionnel. La vitesse de polymérisation est donc dépendante de la phase de nucléation puisque cette dernière nécessite plus de temps pour se mettre en place par rapport aux suivantes. Ainsi, pour former des assemblages de façon nucléation-dépendante, il faut que l'association des monomères entre eux devienne plus importante que leur dissociation et le noyau correspond donc au plus petit agrégat de protéines nécessaire pour provoquer l'assemblage.

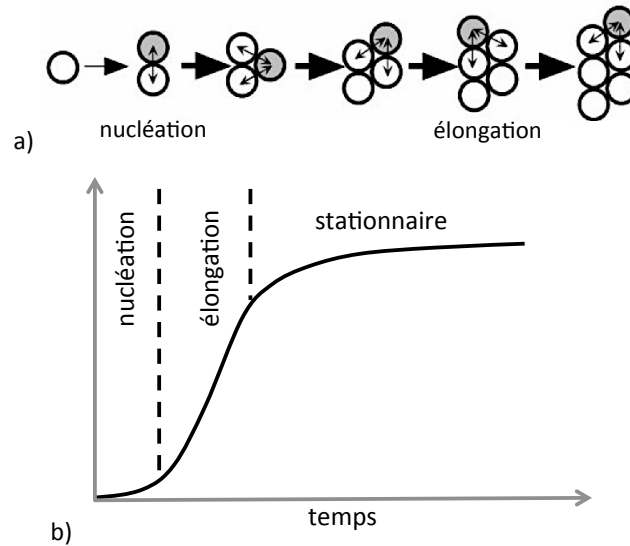


Figure 25 : Polymérisation nucléation-dépendante

a) Représentation schématique de la polymérisation nucléation-dépendante. La nucléation correspond à la formation d'un noyau de deux (ou plus) monomères. La formation de ce noyau permet d'initier la polymérisation. L'élongation correspond à la croissance de l'assemblage (d'après Romberg et al. 2001). b) Courbe de polymérisation nucléation dépendante au cours du temps représentant les trois phases : nucléation, élongation, stationnaire.

Ce type de polymérisation est largement retrouvé dans les systèmes biologiques. *In vitro*, il a été montré que l'actine a une polymérisation nucléation-dépendante (Lodish et al. 2000b). *In vivo*, la nucléation de l'actine est initiée par le complexe Arp2/3. La taille des filaments n'est pas contrôlée uniquement par la concentration intracellulaire en actine. Elle est régulée par la gelsoline et la cofiline qui sont des protéines chargées de dépolymériser les filaments (Condeelis 2001).

II. B. 2. La polymérisation isodesmique

Contrairement à la polymérisation nucléation-dépendante, la **polymérisation isodesmique** est initiée à partir des **monomères** de protéine et n'est pas dépendante de la formation d'un noyau de plusieurs protéines (Figure 26) (Kumar & Udgaonkar 2010). Cette polymérisation est assimilée à la seule **phase d'élongation** exponentielle de la PND. En l'absence de phase de latence, la vitesse de polymérisation est plus importante au début de la réaction, c'est-à-dire au moment où la concentration en monomère est la plus élevée. Avec le temps, la vitesse de polymérisation décroît. Cette polymérisation indépendante de la concentration s'initie dès la rencontre des monomères en solution.

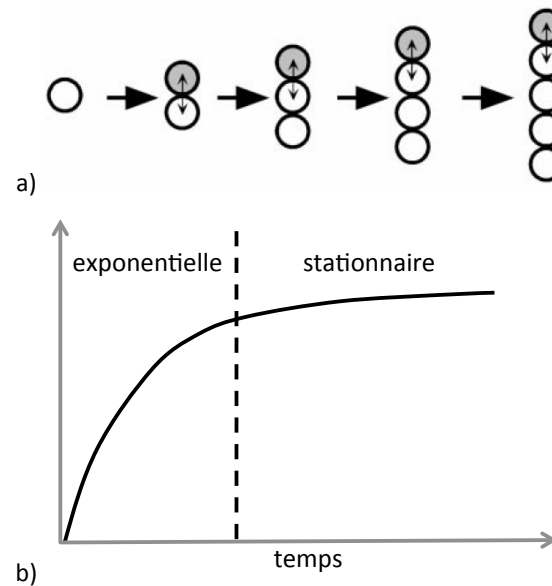


Figure 26 : Polymérisation isodesmique

a) Représentation schématique de la polymérisation isodesmique qui est initiée à partir des monomères de protéine. Elle ne dépend pas de la formation de la concentration en monomères (d'après Romberg et al. 2001). b) Courbe de polymérisation isodesmique au cours du temps représentant les deux phases : exponentielle et stationnaire.

Contrairement à la polymérisation nucléation-dépendante, les cas biologiques de polymérisation isodesmique sont beaucoup moins décrits dans la littérature. Néanmoins, la phosphoglycerate kinase, la transthyretine et la β 2-microglobuline s'assemblent selon une polymérisation isodesmique (Modler et al. 2003; Hurshman et al. 2004; Gosal et al. 2005).

II. C. Stabilité des assemblages

L'assemblage des protéines mais également leur repliement est contrôlé par différents facteurs internes et externes à la protéine. Parmi les facteurs internes, la séquence protéique joue un rôle important puisqu'elle dirige en partie les interactions intra et intermoléculaires qui seront mises en place.

II. C. 1. Les interactions intra et intermoléculaires

Les assemblages, tout comme les différents niveaux d'organisation des protéines, sont maintenus par des **liaisons fortes** et **faibles**. Les liaisons fortes correspondent aux liaisons covalentes alors que les liaisons faibles correspondent aux interactions non-covalentes : les interactions ioniques, les liaisons hydrogène et les liaisons hydrophobes.

Les **liaisons covalentes** intermoléculaires correspondent, entre autres, aux ponts disulfures établis entre deux molécules distinctes et aux pontages réalisés par les enzymes liantes dont les transglutaminases et les lysyl oxydases. Les **interactions ioniques** résultent de l'attraction entre des ions chargés positivement A^+ et des ions chargés négativement B^- . La présence d'autres ions différents de A^+ et B^- peut perturber et diminuer leur interaction. Par contre, leur probabilité d'association avec ces autres ions augmente. Cette propriété des ions favorise la rupture des liaisons ioniques dans les protéines suite à l'ajout de sel et favorise ainsi leur dépliement. Dans les protéines,

les **liaisons hydrogène** correspondent à l'interaction entre l'atome d'hydrogène chargé partiellement positivement du groupement N-H et les électrons de l'atome d'oxygène du groupement C=O. Ces liaisons hydrogènes sont à l'origine des forces maintenant les hélices α et les feuillets β intra et intermoléculaires. Les **interactions hydrophobes** sont mises en place entre groupements hydrophobes qui ne peuvent pas lier les molécules d'eau.

II. C. 2. Rôle des interactions dans l'assemblage

Les **liaisons hydrophobes**, les **liaisons hydrogènes** et les **structures secondaires** sont primordiales dans le repliement et l'assemblage des protéines. Ici, nous discuterons du cas particulier de l'assemblage amyloïde.

Lors du repliement, la protéine minimise les interactions avec l'eau en rassemblant les groupements hydrophobes et en formant des liaisons hydrogènes intramoléculaires dans le cœur de la protéine. Le rôle des liaisons hydrophobes est plus important que celui des liaisons hydrogènes lors du repliement (Fitzpatrick et al. 2011).

Au contraire, dans le cas de l'assemblage amyloïde, la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires compense l'exposition des zones hydrophobes. Les liaisons hydrogènes sont plus importantes que les liaisons hydrophobes lors de l'assemblage amyloïde (Fitzpatrick et al. 2011). Les liaisons hydrogènes des fibres amyloïdes ont la particularité d'être impliquées dans des structures secondaires particulières que sont les **feuillets β intermoléculaires**. Ces derniers correspondent à la mise en commun de brins β entre deux protéines distinctes maintenues par des liaisons hydrogènes. Nous pouvons donc en conclure que la stabilité dans le **repliement** des protéines est déterminée par les **interactions hydrophobes** entre les chaînes latérales des acides aminés, alors que les **fibres amyloïdes** sont majoritairement stabilisées par les **liaisons hydrogènes** entre les chaînes protéiques principales (Rivers et al. 2008; Fitzpatrick et al. 2011).

L'assemblage supramoléculaire des protéines est également médié par l'intermédiaire des **interactions électrostatiques** et des **liaisons covalentes**. Par exemple, l'interaction fibronectine-fibrilline et fibronectine-gélatine implique le même site de liaison I₆₋₉ de la fibronectine. Néanmoins, la nature de l'interaction mise en jeu semble être différente. L'interaction fibronectine-gélatine semble être de type électrostatique (lié aux charges) alors que l'interaction fibronectine-fibrilline semble être hydrophobe et insensible à la concentration en sel (Sabatier et al. 2013). La maturation des fibres de fibrilline nécessite quant à elle des pontages **covalents** par la transglutaminase (Qian & Glanville 1997), et les fibres de collagènes sont réticulées par la lysyl oxydase au cours du vieillissement d'un individu et au sein des foyers tumoraux (Couppé et al. 2009; Levental et al. 2009).

II. C. 3. Facteurs extérieurs influençant la polymérisation

Le processus de polymérisation peut être accéléré ou ralenti en faisant varier différents paramètres. La concentration en protéines, les forces ioniques (Chaudhary et al. 2011), la température (Kusumoto et al. 1998), la présence ou non de dénaturants (Milto et al. 2014), les lipides et/ou les protéoglycanes (Vilasi et al. 2011) font parties de ces facteurs extérieurs favorisant la polymérisation. Dans le cas de la polymérisation nucléation-dépendante l'apport de protéines pré-assemblées dans le milieu de réaction accélère la multimérisation (Yagi et al. 2005).

Un facteur très peu pris en compte dans les études *in vitro* jusqu'à maintenant est l'**encombrement moléculaire** élevé du milieu environnant. Les composés encombrants occupent un volume important dans une solution aqueuse et excluent un petit volume dans lequel les molécules se concentrent (Zhou 2013). C'est notamment le cas dans les cellules. Même si certains articles montrent que l'effet de l'encombrement sur le repliement reste modeste, l'apport de composés encombrants dans le milieu peut avoir un effet stabilisateur ou déstabilisateur sur les protéines. Par exemple, l'encombrement macromoléculaire de l'environnement par des agents visqueux comme le dextran, le PEG (Polyéthylène glycol), le ficoll ou la carraghénane permet d'accélérer l'assemblage fibrillaire des protéines intrinsèquement déstructurées comme l' α -synucléine et la protéine Tau et des protéines structurées comme la protéine prion (Zhou et al. 2009; Zhou 2013). L'environnement encombré intracellulaire et extracellulaire jouerait ainsi un rôle dans l'agrégation des protéines. Cela signifie également que les protéines monomériques étudiées en solution pourraient se trouver sous forme oligomérique *in vivo*.

Suite à l'ajout d'agents d'encombrement dans le milieu de culture cellulaire, il a été montré que la rapidité de formation des matrices par les cellules est différente (Zeiger et al. 2012). L'encombrement du milieu diminue la sécrétion dans le milieu de la fibronectine et du collagène. Ces deux protéines sont ainsi incorporées dans des fibres matricielles alignées alors qu'en milieu classique, ces protéines sont toujours produites mais sont moins incorporées dans la matrice. En retour, l'alignement des protéines extracellulaires dirige l'alignement des filaments d'actine intracellulaires (Zeiger et al. 2012).

Ainsi, ce n'est pas la production élevée de protéines par les cellules qui est importante mais la concentration locale élevée en protéine qui est nécessaire à leur assemblage pour former des réseaux cohésifs. La viscosité du milieu augmente ainsi la signalisation mécanique nécessaire à cet assemblage.

Cet encombrement pourrait également expliquer l'inefficacité de certains principes actifs *in vivo* dont il limiterait la diffusion.

En résumé :

Les protéines peuvent interagir pour former des assemblages supramoléculaires. Ces assemblages peuvent avoir différentes structures.

Parmi les différents modes d'assemblage des protéines, on peut retrouver :

- la polymérisation nucléation-dépendante, la formation d'un premier noyau de deux ou plusieurs monomères est nécessaire pour l'assemblage
- la polymérisation isodesmique, l'assemblage s'initie dès la rencontre des monomères en solution

Ces assemblages sont stabilisés par différents types de liaisons :

- les liaisons covalentes
- les liaisons hydrogènes
- les interactions hydrophobes
- les interactions électrostatiques

L'assemblage des protéines est influencé par des :

- facteurs internes aux protéines (contrôle de la synthèse protéique et présence des régions déstructurées)
- facteurs externes aux protéines (forces ioniques, apport d'agents dénaturants, apport de lipides, apport de protéoglycanes, encombrement moléculaire)

Parmi les différents assemblages décrits dans la littérature, les protéines peuvent former des fibres amyloïdes.

III. LES ASSEMBLAGES AMYLOÏDES

Les assemblages amyloïdes correspondent à des structures particulièrement organisées d'assemblage de protéines identiques. Ils sont étudiés pour leur implication dans de nombreuses pathologies dont les maladies neurodégénératives et, depuis plus récemment, les cancers, mais également pour leur rôle physiologique qui sont décrits dans la suite.

III. A. Caractéristiques

Les **assemblages amyloïdes** correspondent à des dépôts de protéines insolubles dans les compartiments extra et intracellulaires. Ces dépôts s'accumulent à des endroits variés de l'organisme. Une vingtaine de protéines sont recensées comme étant capables de former des assemblages amyloïdes (Uversky & Fink 2004). La plupart de ces assemblages sont associés à des pathologies regroupées sous le terme d'amylose, dont plus de quarante sont délétères et/ou fatales (Chiti & Dobson 2006). Les fibres amyloïdes de la protéine α -synucléine, du peptide amyloid-beta et de la protéine Tau sont impliquées dans les maladies neurodégénératives de Parkinson et d'Alzheimer (Yagi et al. 2005; Sarroukh et al. 2011; Sacino et al. 2013; Morozova et al. 2013). Les maladies à prion ont également comme origine la formation de fibres amyloïdes par la protéine prion (Makarava et al. 2011; Milto et al. 2014).

Ces différents assemblages amyloïdes ont des caractéristiques communes bien définies. Ils ont des structures très ordonnées avec une morphologie souvent en **fibre non-ramifiée**. Leur longueur est indéfinie et ils peuvent avoir un diamètre de 2 à 20 nm. Ces fibres sont généralement formées par la polymérisation d'une seule protéine et sont riches en feuillets β . Ces assemblages amyloïdes sont des structures extrêmement stables maintenues par des liaisons non-covalentes et résistantes à la dénaturation. Par l'intermédiaire des **liaisons hydrogènes**, les brins β s'associent pour former des feuillets β intermoléculaires. L'**empilement des feuillets β** se positionne de manière perpendiculaire à l'axe de la fibre (Figure 27). L'arrangement linéaire des protéines les unes par rapport aux autres favorisent la formation de fibres avec un pas défini. Les clichés de diffraction au rayon X ont montré que la distance séparant les brins β des feuillets β intramoléculaires dans une protéine ainsi structurée est de 10 angström et la distance séparant deux protéines associées de par leur feuillets β intermoléculaires est de 4.7 angström (Figure 27) (Makin & Serpell 2005). Autres que par les liaisons hydrogènes, ces assemblages sont également maintenus par des **interactions hydrophobes** entre les régions hydrophobes exposées par les protéines.

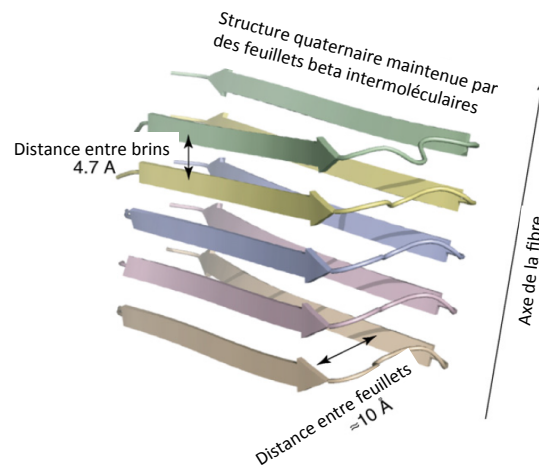


Figure 27 : Structure commune aux assemblages amyloïdes

Les assemblages amyloïdes sont constitués de l'empilement de feuillets β intermoléculaires entre protéines. La distance séparant deux protéines associées par des feuillets β intermoléculaires est de 4.7 angström. La distance séparant les feuillets β intramoléculaires est de 10 angström (d'après Fowler et al. 2007).

Même si les assemblages amyloïdes ne représentent qu'un type de multimère formé par les protéines, leur organisation caractéristique en fibres stables en raison de l'abondance des liaisons hydrogènes en font des assemblages qui persistent dans le temps et s'accumulent au sein des tissus. Ces assemblages de type amyloïde correspondent généralement à des structures mal repliées et mal assemblées de protéines qui sont accumulées dans des corps d'inclusion. Malheureusement, ces stocks de protéines défectueuses sont souvent toxiques pour les cellules (cf. Partie 2. III. C.) (Chiti & Dobson 2006).

La structure amyloïde des protéines peut être analysée par différentes techniques dont la **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier** ou le **dichroïsme circulaire** qui permettent d'analyser les structures secondaires impliquées dans l'assemblage dont notamment la signature des feuillets β intermoléculaires. De plus, ces assemblages amyloïdes ont la particularité de lier des colorants spécifiques dont la **thioflavine T** (ThT) et l'**acide 8-anilino-1-naphtalenesulfonique** (ANS). Ces petites molécules émettent de la fluorescence lorsqu'elles sont respectivement insérées dans les feuillets β intermoléculaires ou sont en contact avec les zones hydrophobes exposées au solvant. Ces fibres présentent une biréfringence jaune-verte suite à la liaison du **rouge congo**, colorant qui fixe les feuillets β intermoléculaires.

A partir de ces critères, de plus en plus de travaux tendent à montrer que les assemblages amyloïdes seraient plus répandus dans les systèmes biologiques que ce qu'il n'était initialement pensé et qu'ils **ne sont pas obligatoirement pathologiques**. Par exemple, les hormones sont stockées sous forme de fibres amyloïdes dans les granules de sécrétion dans l'hypophyse (Maji et al. 2009). La structure amyloïde est également retrouvée dans la soie d'araignée et étudiée pour ses propriétés mécaniques et adhésives (Otzen & Nielsen 2008; Martel et al. 2008). Certaines espèces procaryotes dont les bactéries utiliseraient ces assemblages amyloïdes pour leur fonction biologique : 5 à 40% des procaryotes présents dans les biofilms naturels produisent des adhésines (molécules d'adhérence) de type amyloïde (Larsen et al. 2007; Dueholm et al. 2010; Romero et al. 2010).

III. B. Mécanisme de formation

La nature des protéines à l'origine des assemblages amyloïdes est variée : protéine intrinsèquement désordonnée ou avec une région flexible, protéine à structure tridimensionnelle complexe etc. La nature des éléments permettant de guider la formation des fibres amyloïdes reste donc encore obscure à ce jour.

La polymérisation en fibre amyloïde peut être accélérée ou ralentie par interaction avec les **lipides** composants les membranes cellulaires. Les **phospho** et **sulfolipides chargés négativement** semblent accélérer la fibrillation alors que les **lipides simples neutres** la ralentissent (Munishkina & Fink 2007). Dans le cas des protéines globulaires, ces dernières requièrent un dépliement partiel de leur structure pour former des fibres amyloïdes (Uversky & Fink 2004). Certaines protéines peuvent former des oligomères à partir de leur état natif pour ensuite subir un réarrangement de leur structure et former des fibres amyloïdes (Soldi et al. 2005). Dans certains cas, les protéines ne nécessitent pas de réorganisation et forment des fibres à partir de leur forme native (Laurine et al. 2003). D'autre part, les protéines de haut poids moléculaire ont une tendance à former des agrégats plutôt que des fibres amyloïdes (Ramshini et al. 2011).

Il existe une balance étroite entre le repliement et l'assemblage des protéines dépendant des différents types d'interaction mis en jeu lors de ces deux mécanismes. Comme il a été cité précédemment, dans le cas des protéines intervenant dans l'amylose, les études tendent à montrer que leur repliement dans leur état natif est déterminé par les interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des acides aminés. Par contre, leur assemblage amyloïde dépend majoritairement des liaisons hydrogènes mis en place lors de l'échange de feuillets β intermoléculaires entre les protéines (Fitzpatrick et al. 2011).

Au cours de l'assemblage en fibre amyloïde, les protéines peuvent former des **oligomères transitoires**. Ces oligomères peuvent être **on-pathway** ou **off-pathway**. Les oligomères **on-pathway** correspondent aux précurseurs préfibrillaires qui mènent à la formation des fibres amyloïdes (Volles & Lansbury 2003; Gosal et al. 2005; Calamai et al. 2005). Les oligomères **off-pathway** ont des structures différentes des précurseurs préfibrillaires. Ils ne permettent généralement pas la formation des fibres amyloïdes du fait de leur structure réversible vers le monomère de protéine. La formation des oligomères **off-pathway** est en compétition avec la formation de ceux **on-pathway** et limite donc la formation de ces derniers.

III. C. Origine de la cytotoxicité

Comme il a été cité précédemment, il existe une grande diversité de structure « amyloïde » dont le potentiel cytotoxique peut être différent (Marshall et al. 2014). De plus en plus d'études se focalisent sur la détermination des causes de cette cytotoxicité.

Les causes de cette dernière *in vivo* sont encore hypothétiques. Certaines études montrent que la structure **antiparallèle** des feuillets β (orientés dans des directions opposées) pourrait avoir un effet plus cytotoxique que les feuillets β parallèles (orientés dans le même sens) (Berthelot et al. 2013).

Parmi les structures amyloïdes, les **agrégats préfibrillaires** des protéines (agrégats menant à la formation des assemblages amyloïdes) auraient la toxicité la plus importante, y compris par rapport aux assemblages amyloïdes (Bolognesi et al. 2010). La toxicité de ces agrégats préfibrillaires serait corrélée à l'exposition plus importante des zones hydrophobes. Ces protéines subiraient alors un effondrement de ces zones hydrophobes puis un réarrangement des liaisons hydrogènes pour former les assemblages amyloïdes. L'exposition des patches hydrophobes favoriserait l'interaction de ces agrégats préfibrillaires avec les membranes cellulaires (Bolognesi et al. 2010), voir s'inséreraient dans ces dernières pour les perméabiliser et/ou mener la cellule vers la mort (Figure 28) (Volles & Lansbury 2003; Munishkina & Fink 2007).

Certains assemblages amyloïdes formeraient des *clusters* dans la membrane cellulaire et déstabiliseraient les membranes alors que d'autres formeraient des canaux transmembranaires perturbant l'homéostasie cellulaire dont les phénomènes de flux ioniques et métaboliques (Figure 28). Ces deux voies d'interaction des assemblages amyloïdes avec les membranes cellulaires peuvent aboutir à la mort cellulaire en perturbant les voies de signalisation.

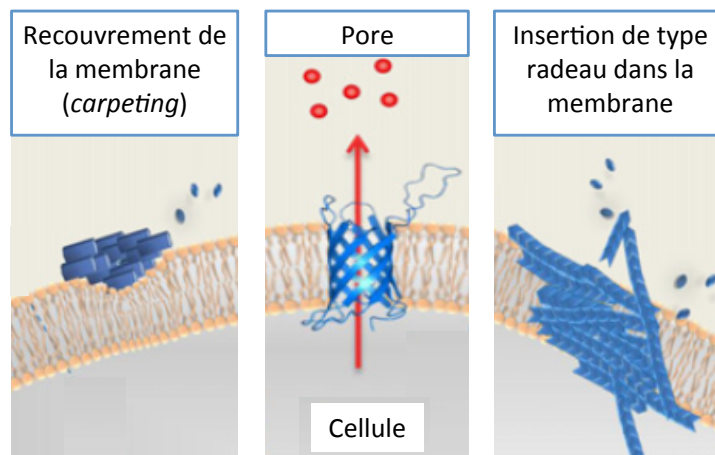


Figure 28 : Modèles d'interaction des fibres amyloïdes avec les membranes cellulaires

Représentation de différents modèles d'interaction des assemblages amyloïdes avec les membranes qui pourraient expliquer leur toxicité. De la gauche vers la droite : recouvrement de la membrane par les assemblages amyloïdes (en bleu), insertion de l'assemblage dans la membrane pour former des pores, insertion de plusieurs assemblages amyloïdes dans la membrane menant à la ségrégation de la bicouche lipidique (d'après Berthelot et al. 2013).

Si les assemblages amyloïdes sont initialement étudiés pour leur cytotoxicité sur les cellules nerveuses, ils exercent également un effet néfaste sur les autres types cellulaires. L'assemblage fibrillaire de l'albumine et de la fibronectine provoque également l'apoptose des cellules de reins, des cellules cancéreuses ovariennes et des cellules saines et cancéreuses mammaires (Huang et al. 2009; Huang et al. 2010).

Un mécanisme d'agrégation de type amyloïde-prion a été montré pour les protéines Bcl-xL et p53. Cette agrégation pourrait mener à la perte de leur fonction anti-apoptotique et pro-apoptotique (Bhat et al. 2013 ; Chenal et al. 2012; Ano Bom et al. 2012; Forget et al. 2013; Silva et al. 2013). Suite à l'assemblage sous forme amyloïde, les protéines exposeraient des domaines qui étaient initialement enfouis et en cacheraient d'autres. Ce changement des sites accessibles modifie également les partenaires d'interaction de la protéine dérégulant ainsi les fonctions cellulaires. C'est notamment le cas des agrégats de la protéine p53 mutée qui se lient et séquestrent les p53

fonctionnelles ainsi que d'autres protéines de signalisation intracellulaires telles que p63 et p73. L'ensemble pourrait ainsi accentuer le caractère oncogène des cellules (Xu et al. 2011). Ces agrégats de p53 semblent ainsi être associés aux cancers de mauvais pronostic.

En résumé :

Les assemblages amyloïdes sont des structures formées de l'empilement de feuillets β intermoléculaires et stabilisées par :

- des liaisons hydrogènes intermoléculaires
- des liaisons hydrophobes

Les assemblages amyloïdes interviennent dans certains processus physiologiques mais sont surtout étudiés en raison de leur cytotoxicité dans les pathologies neurodégénératives.

Les protéines capables de former des assemblages supramoléculaires sont nombreuses. Elles peuvent être intra ou extracellulaires. Parmi les molécules matricielles, la fibronectine fait partie de ces protéines. Cette fibronectine peut former des assemblages de différentes structures. En fonction de son état conformationnel, cette protéine influence le comportement cellulaire différemment. Les différents états conformationnels et les rôles fonctionnels de la fibronectine sont discutés dans la prochaine partie.

PARTIE 3 : LA (LES) FIBRONECTINE(S)

PREAMBULE :

Le nom de la fibronectine vient du latin *fibra* qui signifie « fibre » et *nectere* qui signifie « lier ». Ce nom lui a été donné de par sa structure allongée mais également de par sa capacité à se lier à différents partenaires pour former des réseaux. La fibronectine est une des macromolécules constituant les matrices extracellulaires. Cette protéine, découverte en 1948 sous le nom de « *cold-insoluble protein* » (Morrison et al. 1948), est une des premières protéines ayant été reconnue pour sa double fonction : **structurelle** mais également **fonctionnelle** (Hynes & Yamada 1982; Schwarzbauer 1991).

A l'issu d'un épissage alternatif, différents isoformes de fibronectine sont produits. La fibronectine est synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma sous forme **soluble** et **compacte** à une concentration d'environ 300 µg/ml (Tamkun & Hynes 1983). On parle alors de **fibronectine plasmaticque**. Cette molécule est également produite par les cellules résidentes des différents tissus dont les cellules endothéliales et les fibroblastes (Hynes & Yamada 1982; To & Midwood 2011). On parle de **fibronectine cellulaire**. Dans ce dernier cas, elle est liée à la surface des cellules. Ces deux fibronectines peuvent être assemblées et incorporées sous forme **insoluble** et **fibrillaire** dans les matrices en phase solide (Mao & Schwarzbauer 2005). Des études montrent également la formation *in vivo* d'**agrégats** de fibronectine dans certaines conditions pathologiques telle la glomérulopathie ou les lésions de sclérose en plaque (J. M. J. Stoffels et al. 2013). Cette protéine peut donc se trouver sous différentes conformations moléculaires et supramoléculaires.

L'existence d'au moins deux conformations de la fibronectine (compact ou fibrillaire) mène à s'interroger sur la relation entre son état structural et son rôle dans les matrices. Ainsi, pour déterminer les rôles de la fibronectine, il est nécessaire de s'intéresser à sa structure ainsi qu'à ses mécanismes de repliement et assemblage. C'est dans cette perspective que des études *in silico* et *in vitro* en absence de cellules ont été réalisées et permettent d'avoir un large aperçu de l'organisation de la fibronectine. Les agrégats étant moins étudiés, notre travail de recherche se focalisera sur une meilleure compréhension de la formation de ces derniers et leur influence sur le comportement cellulaire.

I. CARACTERISTIQUES DE LA FIBRONECTINE

La **fibronectine** est une **glycoprotéine** d'un poids moléculaire variant de 420 à 500 kDa en fonction des épissages alternatifs qu'elle subit et des glycosylations qu'elle arbore (4-9% de la masse de la fibronectine). Elle est constituée de deux sous-unités homologues chacune d'environ 250 kDa. Les deux sous-unités sont reliées entre elles par deux ponts disulfures au niveau du domaine carboxy-terminal. Cette protéine d'environ 8.7 nm de rayon hydrodynamique (Nelea et al. 2008) est trouvée sous forme **soluble** dans les **liquides physiologiques** tels que le plasma, la lymphe et la synovie, et dans certains **fluides pathologiques** comme les ascites. Cette molécule est constituée de **domaines de type I, II et III** qui sont repliés en **modules** globulaires. La fibronectine possède également trois **domaines d'épissage alternatif** appelés EDA, EDB et IIICS (Figure 29). Ces domaines d'épissage, qui ne sont généralement pas présents dans la molécule de fibronectine plasmaticque, ont permis de recenser environ 20 isoformes pour cette protéine et qui ont des localisations et rôles différents.

Dans sa conformation dépliée, cette fibronectine possède une longueur d'environ 140 nm (Erickson et al. 1981). En 2000, il a été montré que la fibronectine en solution correspond à une chaîne gaussienne qui adopte une conformation qui change sans cesse du fait de l'agitation thermique, et qu'à un instant donné, la conformation des chaînes est différente d'une molécule à l'autre. En d'autres termes, la fibronectine possède une grande flexibilité à l'échelle de la molécule contre une structuration importante à l'échelle des modules constituant la fibronectine (Pelta et al. 2000).

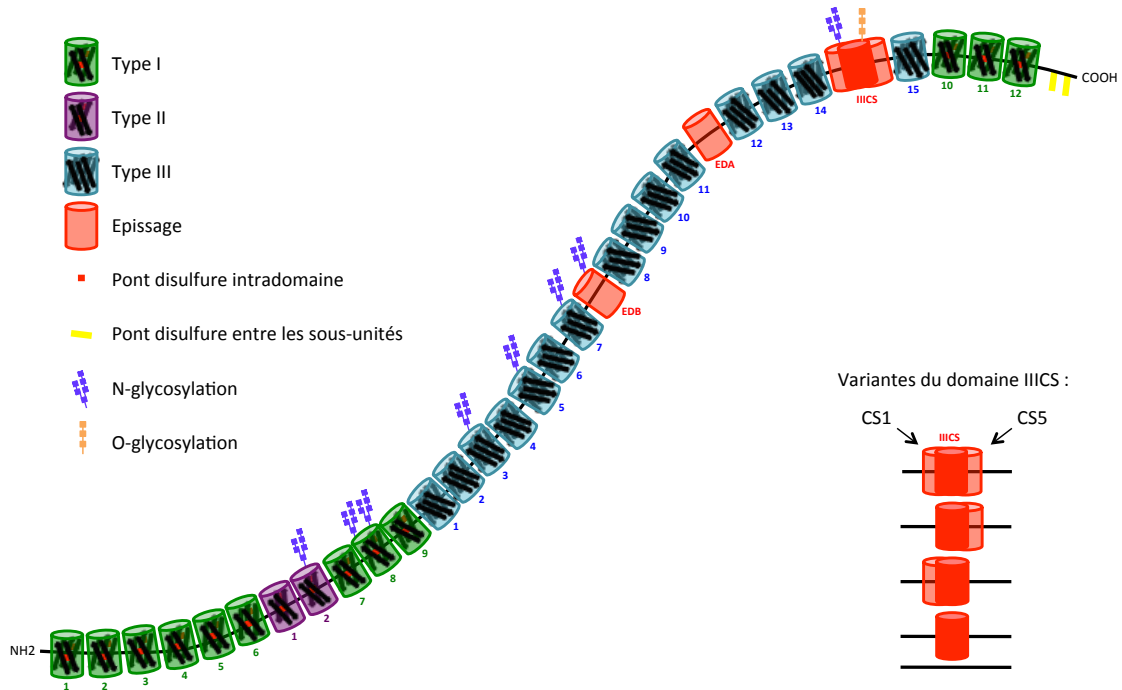


Figure 29 : Structure de la fibronectine

Représentation de la structure d'un monomère de la fibronectine avec les domaines de type I, II et III, la position des glycosylations, les ponts disulfures intradomaines et intermoléculaires.

I. A. La fibronectine, une glycoprotéine modulaire

I. A. 1. Les modules constitutifs de la fibronectine

Chaque brin du dimère de fibronectine est constitué de douze modules de type I, deux modules de type II et quinze modules de type III.

Ces trois types de module sont tous repliés en **feuilletts β antiparallèles intramoléculaires** renfermant un **cœur hydrophobe** (Potts & Campbell 1994). Les plus grands modules de la fibronectine d'une centaine d'acides aminés, les modules de type III, sont repliés en sept feuilletts β et les plus petits modules de la fibronectine d'environ 45 acides aminés, les modules de type I, sont constitués de cinq feuilletts β , alors que les modules de type II d'environ 60 acides aminés quant à eux ne contiennent que quatre feuilletts β (Figure 30) (Potts & Campbell 1994).

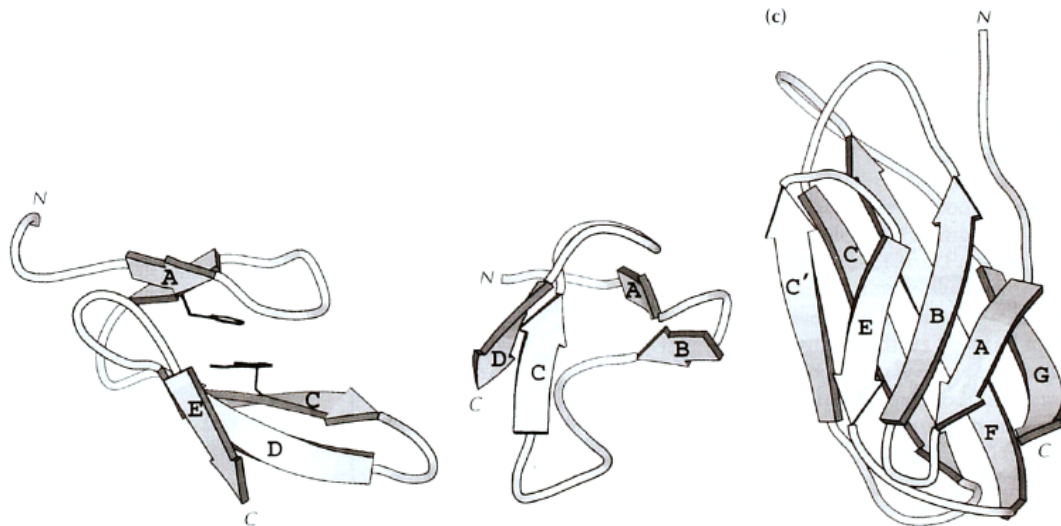


Figure 30 : Structure des modules de type I, II et III de la fibronectine

Représentation des modules de type I (à gauche), de type II (au centre) et de type III (à droite). Ces modules sont respectivement constitués de 5, 4 et 7 feuillets β intradomaines en sandwich. Ces feuillets sont nommés par des lettres : A-C-D-E pour les domaines I, A-B-C-D pour les domaines II et A-B-C-C'-E-F-G pour les domaines III (d'après Potts & Campbell 1994).

En plus des structures secondaires de type feuillet β , les modules de type I et II contiennent tous un à deux **ponts disulfures** qui permettent le maintien de leur structure. Quant aux modules de types III, ils ne contiennent pas de liaisons disulfures intra caténares et ont donc une flexibilité plus importante de leur conformation (Potts & Campbell 1994).

I. A. 2. Les modules variables EDA, EDB, IIICS

Selon l'épissage alternatif de la fibronectine, on retrouve également le **domaine EDA** (extradomaine de type III A), le **domaine EDB** (extradomaine de type III B) et le **domaine variable IIICS** (« *type III connecting segment* »). Leur présence dépend du tissu et du stade de développement embryonnaire dans lequel la molécule de fibronectine est synthétisée.

Les domaines EDA, EDB et IIICS sont positionnés respectivement entre les domaines III₁₁-III₁₂ et III₇-III₈ et III₁₄-III₁₅. La présence des domaines EDA et EDB permet de différencier les molécules de fibronectine cellulaire des molécules de fibronectine plasmatique qui ne les possèdent pas. La région variable IIICS est présente sur les deux brins de la fibronectine cellulaire tandis qu'elle n'est retrouvée que sur l'un des deux brins constituant la molécule de fibronectine plasmatique (Leiss et al. 2008). Le domaine IIICS peut présenter plusieurs variantes. En effet, ce domaine IIICS est constitué de trois parties : une partie centrale (PC), une partie N-terminale nommée CS1 et une partie C-terminale nommée CS5 (Johansson et al. 1997). Quatre combinaisons de ces 3 parties sont possibles : les trois ensemble, PS seul, PS associée à CS1 ou PS associée à CS5 (Figure 29). La partie CS1 est retrouvée dans 90% des fibronectines cellulaires et dans seulement 50% des fibronectines plasmatiques (Midwood et al. 2006).

Les formes de la fibronectine contenant ces modules variables sont très rarement retrouvées dans les tissus adultes et le plasma alors qu'elles sont exprimées dans les tissus fœtaux, les tissus en réparation tissulaire et les tissus tumoraux. Par exemple, des études ont montré que la fibronectine, peu exprimée en condition physiologique dans les tissus osseux, est surexprimée dans les conditions

de réparation osseuse et contient les modules EDA et EDB. La présence de ces deux modules EDA et EDB est différente au cours de cette réparation : la fibronectine contenant le module EDA est exprimée tout au long de la réparation osseuse alors que la fibronectine présentant le module EDB n'est exprimé qu'à certaines étapes (Kilian et al. 2008).

Le module EDA est impliqué dans la prolifération des cellules souches (Losino et al. 2013) et tumorales (Xiang et al. 2012). Le module EDB, quant à lui, est considéré comme un **module oncofœtal** du fait de son expression exclusive dans les tissus embryonnaires et dans les tissus adultes tumoraux, fibrotiques ou angiogéniques (Khan et al. 2005). Le domaine IIICS joue un rôle promoteur dans la migration, l'invasion et les processus de transitions épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules saines (prostate) ou cancéreuses (carcinomes de la bouche) (Kamarajan et al. 2010; Freire-de-Lima et al. 2011).

I. B. Les modules d'interaction de la fibronectine

La capacité de la fibronectine à former des réseaux vient de la présence de différentes régions au sein de la protéine qui ont des affinités pour un grand nombre de ligands. Certains de ces sites de liaison sont cryptiques, donc enfouis dans la molécule, et ne sont exposés qu'après un changement de conformation de la fibronectine.

I. B. 1. Les modules d'interaction fibronectine-molécules matricielles

La fibronectine peut interagir avec différents partenaires moléculaires (protéines matricielles, polysaccharides, enzymes). Parmi eux, la fibronectine se lie à la fibrine, qui est le produit de clivage du fibrinogène. Plusieurs modules de la fibronectine ont été répertoriés pour lier cette molécule : les modules I₁₋₅ et les modules I₁₀₋₁₂ (Figure 31) (Evgeny Makogonenko 2007; Mao & Schwarzbauer 2005). Cette interaction permet de former un réseau fibronectine-fibrine qui sert de support pour la migration des cellules dont les fibroblastes lors du processus de réparation cutanée. Les modules I₆₋₉ permettent la liaison des molécules de collagène/gélatine mais également la liaison de la transglutaminase tissulaire et des fibres de fibrilline (Figure 31) (Pankov & Yamada 2002, Sabatier et al. 2013).

L'héparine, dérivé des héparanes-sulfates physiologiques, peut interagir avec les modules III₁₂₋₁₄ mais possède également un site d'affinité commun avec la fibrine puisqu'elle interagit avec les modules I₁₋₅ (Figure 31) (Pankov & Yamada 2002). Cette interaction est utilisée dans les protocoles de purification de la fibronectine (Poulouin et al. 1999).

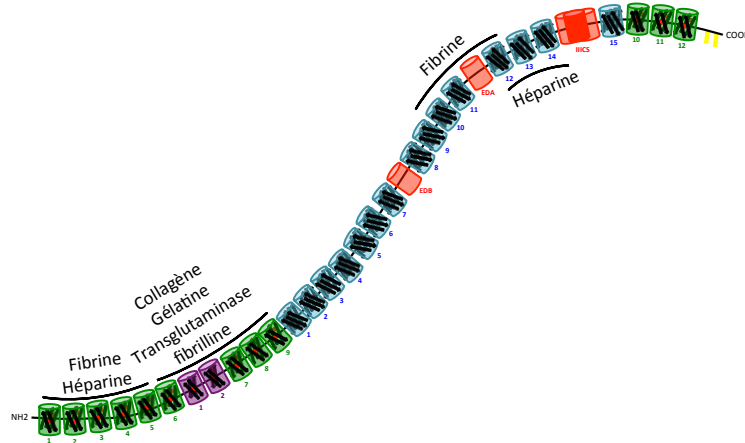


Figure 31 : Séquences d'interaction de la fibronectine à différentes molécules

I. B. 2. Les modules d'interaction fibronectine-fibronectine

La fibronectine est certes capable d'interagir avec les autres molécules environnantes mais possède également des séquences d'interaction avec elle-même.

En 1999, il a été montré que la forme compacte de la fibronectine est maintenue par des liaisons électrostatiques entre différents segments éloignés dans la molécule (Johnson et al. 1999). L'association des modules III₂₋₃ avec les modules III₁₂₋₁₄ semble rapprocher les deux sous-unités de la molécule pour donner sa structure compacte à la fibronectine. Ces modules III₁₂₋₁₄ ont un excès de charges positives tandis que les modules III₂₋₃ présentent de nombreuses charges négatives à l'origine d'un appariement électrostatique (Johnson et al. 1999). D'autre part, l'association des modules III₁₂₋₁₄ avec les modules amino-terminaux semble également permettre un rapprochement avec la partie centrale de la fibronectine favorisant un degré de compaction plus important.

L'association entre ces différents modules peut également se faire entre différentes molécules de fibronectine. Ainsi, des modifications dans cette structuration peuvent mener à un processus d'auto-assemblage des fibronectines entre elles. En effet, les modules I₁₋₉ interagiraient avec les modules III₁₋₂ d'une molécule voisine pour permettre l'assemblage des fibronectines entre elles (Schwarzbauer 1991; Ohashi & Erickson 2011). Les modules I₁₋₉ et III₁₋₂ semblent donc être des sites clés dans l'assemblage intermoléculaire de la fibronectine. La flexibilité procurée par l'absence de ponts disulfures dans le module III₂ semble être un facteur clé pour l'agrégation et l'assemblage de la fibronectine puisque la conformation dépliée de ce module permet une liaison plus forte avec la partie amino-terminal de 30 kDa de la fibronectine (Vakonakis et al. 2007; Ohashi & Erickson 2011). Même si le module III₂ semble être le plus important des deux (Sechler et al. 2001; Ohashi & Erickson 2011), le module cryptique III₁ est fortement impliqué *via* l'exposition de son cœur hydrophobe qui sera ainsi actif dans l'auto-assemblage (Briknarová et al. 2003). Suite à l'ouverture de ce site cryptique III₁, ce dernier semble capable de lier plusieurs autres modules de la fibronectine dont notamment des modules I₁₋₅, III₃, III₁₋₃, III₇, III₁₁, III₁₅ (Morla et al. 1994; Ingham et al. 1997; Ohashi & Erickson 2005; Ohashi et al. 2009).

En 1998, il a été montré que le module III₁₂₋₁₄ peut interagir avec le module I₁₋₅ indiquant que ces deux séquences interviennent dans l'association fibronectine-fibronectine (Bultmann et al. 1998).

Plus récemment, il a été montré que le module III₁₀, contenant la séquence d'interaction cellulaire RGD, est également impliqué dans les processus d'interaction fibronectine-fibronectine. D'autre part, la séquence SLLISWD portée par le brin β B de ce module III₁₀ peut s'associer avec le brin β B d'une autre molécule de fibronectine (Gee, Yüksel, et al. 2013).

I. B. 3. Les séquences d'interaction fibronectine-cellules

Les cellules du microenvironnement immédiat peuvent également interagir avec la fibronectine. Les intégrines α5β1, αvβ3, αIIbβ3, αvβ1, αvβ3, αvβ5, αvβ6, αvβ8, α5β1 et α8β1 interagissent avec le module III₁₀ de la fibronectine (Leiss et al. 2008; Niu & Chen 2011). Les intégrines α5β1, αvβ3 et αIIbβ3 peuvent également s'associer avec le module juxtaposé III₉ (Figure 32) (Sechler et al. 1997) et les intégrines αvβ3 et α5β1 interagissent aussi avec le module I₅. Les intégrines α4β1 et α4β7 reconnaissent le module IIICS. L'intégrine α4β1 interagit également avec le module III₁₄ et le module EDA tout comme l'intégrine α9β1 (Mould et al. 1994; Pankov & Yamada 2002; Midwood et al. 2006). Enfin, les modules III₁₂₋₁₄ interagissent avec les syndécanes présents à la surface des cellules (Yang et al. 2011).

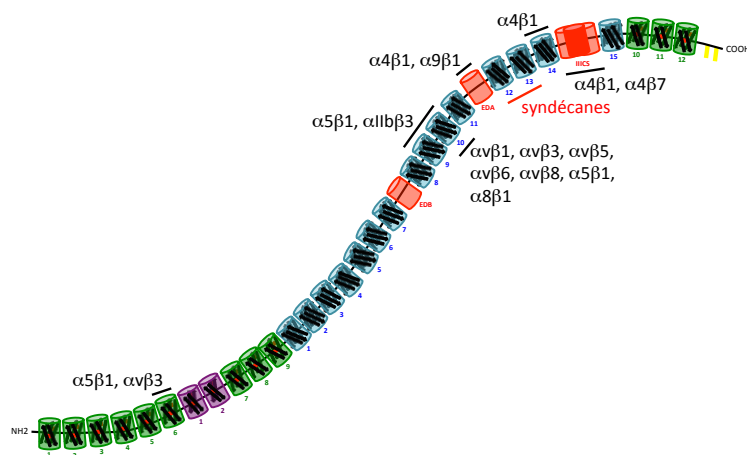


Figure 32 : Modules d'interaction de la fibronectine avec les récepteurs cellulaires

I. C. Modifications post-traductionnelles de la fibronectine

Suite à leur synthèse, les protéines sont soumises à des modifications post-traductionnelles (MPT). Parmi les MPT nous pouvons citer la **glycation**, la **phosphorylation** et la **glycosylation**.

La glycation, ou « réaction de Maillard », permet la liaison covalente entre la fonction amine NH₂ d'une protéine, souvent sur le résidu lysine, et le groupement carbonyle COOH (acide carboxylique) d'un saccharide, qui est souvent le glucose. Cette réaction est spontanée dans les milieux biologiques mais reste néanmoins associée à des situations pathologiques puisque la vitesse de réaction est dépendante de la concentration des deux réactifs. Cette réaction est notamment avérée dans le cas de diabète où l'élévation de la concentration en glucose plasmatique par rapport au seuil physiologique favorise la réaction. Suite à cette glycation, la fibronectine favorise la prolifération des cellules musculaires lisses qui sont impliquées dans le processus d'athérosclérose des patients atteints de diabète (Corrêa-Giannella et al. 2012).

L'une des modifications post-traductionnelles la plus répandue dans les systèmes biologiques est la phosphorylation des protéines. Dans les années 80-90, il a été montré que la fibronectine est phosphorylée lors de la phase proliférative des fibroblastes (Ali 1983). Les phosphorylations se font spécifiquement sur les résidus sérines/thréonines (Ali 1984; Imada et al. 1988). Une des enzymes catalysant la phosphorylation de la fibronectine est la protéine ecto-protein kinase extracellulaire (Imada et al. 1988).

La formation des deux ponts disulfures nécessaires à la dimérisation et les ponts disulfures intradomains pour la structuration des modules de type I et II correspondent également à des modifications post-traductionnelles importantes de la fibronectine (*databank* : Superfamily HMM library and genome assignments server).

Enfin, la glycosylation est la liaison covalente de glucides sur la chaîne protéique. Sur chacune des chaînes d'acides aminés constituant, il est possible de retrouver des motifs sucrés qui permettent de classer la fibronectine dans la famille des glycoprotéines. Les glycosylations composant la fibronectine représentent environ 5% de sa masse et semblent correspondre à 9 motifs polysaccharidiques. Parmi ces motifs, certains correspondent à des N-glycosylations liées sur l'azote des résidus asparagines et d'autres à des O-glycosylations retrouvées sur l'oxygène des résidus sérine ou thréonine. Les modules II₂, III₃, III₅, III₇ contiennent tous un motif N-glycosylé. Le module I₈ possède quant à lui 2 des N-glycosylations. Les 3 autres motifs sucrés sont répartis entre les modules EDB et III_{CS}. L'une des N-glycosylations et la O-glycosylation sont respectivement liées aux modules EDB et III_{CS}. Le rôle de ces glycosylations reste encore à mieux définir mais elles pourraient servir à la stabilisation de la structure de la protéine à haute température (Ingham et al. 1995). Elles semblent réduire l'affinité de la fibronectine à la gélatine et ralentir l'adhérence et l'étalement des cellules à la fibronectine (Jones et al. 1986; Millard et al. 2005). En contrepartie, ces glycosylations semblent rendre la protéine plus résistante à la protéolyse (Bernard et al. 1982; Rees-Milton et al. 2004). Ces glycosylations ont également un impact sur d'autres comportements cellulaires. En effet, il a été montré que la O-glycosylation dans le module III_{CS} a un rôle fonctionnel important dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse et la mise en place des processus de migration cellulaire (Freire-de-Lima et al. 2011; Alisson-Silva et al. 2013; Freire-de-Lima 2014). L'expression de la forme O-glycosylée de la fibronectine est souvent associée à un phénotype pathologique puisque cette forme de fibronectine contenant le module III_{CS} n'est produite que lors de l'embryogenèse et n'est que très rarement retrouvée dans les tissus adultes sauf tumoraux (Alisson-Silva et al. 2013; Freire-de-Lima 2014).

En résumé :

La fibronectine est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités. Elle est repliée sous forme compacte en solution ou assemblée en fibres et agrégats dans les matrices extracellulaires. Chaque sous-unité est constituée de module de type I, II et III. Ces modules sont tous repliés en feuillets β .

La fibronectine possède des séquences d'interaction avec :

- les autres molécules de la matrice extracellulaire
- elle-même
- les récepteurs cellulaires

Cette protéine subit des modifications post-traductionnelles modifiant son influence sur le comportement cellulaire :

- la glycation
- la phosphorylation
- la glycosylation

La fibronectine est une protéine intervenant dans la régulation de nombreux processus biologiques. Elle intervient notamment dans l'organisation et la stabilisation de la matrice extracellulaire et dans la régulation des différents comportements cellulaires.

II. FIBRONECTINE MATRICIELLE ET REPONSE CELLULAIRE

La fibronectine est une glycoprotéine matricielle qui interagit avec des partenaires divers dont les autres molécules de la matrice et les récepteurs cellulaires. Ces interactions font de la fibronectine une protéine intervenant dans l'organisation de la matrice et la régulation des comportements cellulaires.

II. A. La fibronectine au sein des matrices extracellulaires

II. A. 1. Organisation et stabilisation de la matrice

La fibronectine est une protéine retrouvée dans la majorité des tissus constituant l'organisme humain. Dans la MEC, la fibronectine est retrouvée sous forme d'un réseau fibrillaire. Sa capacité à lier différents partenaires biologiques en fait une protéine **organisatrice** et **stabilisatrice** de la MEC (Sabatier et al. 2013). De nombreuses études ont montré qu'une déstabilisation du réseau fibrillaire de fibronectine mène à une déstructuration de l'organisation d'autres composants de la matrice. Par exemple, l'inhibition de la polymérisation de la fibronectine altère la formation des réseaux de fibrine, collagène I et thrombospondine-1 (Pereira et al. 2002; Sottile & Hocking 2002; Shi et al. 2010). Cette déstabilisation des réseaux est aussi accompagnée d'une dégradation rapide des molécules par un mécanisme d'internalisation dépendant de la cavéoline-1 et des intégrines $\beta 1$. La fibronectine favorise le dépôt de té nascine et la formation du réseau de fibrine de façon concentration-dépendante (Chung & Erickson 1997; To & Midwood 2011a). En 2013, il a été montré que même si la fibronectine n'est pas nécessaire pour l'assemblage des réseaux de fibrilline, sa polymérisation est essentielle pour le maintien du réseau de fibrilline-1 (Sabatier et al. 2013). La fibronectine influence également la structure des réseaux formés dont notamment ceux de la fibrine (Ramanathan & Karuri 2014). En plus de permettre le maintien des réseaux de la MEC, la polymérisation de la fibronectine en fibres semble nécessaire pour l'organisation des tissus. Sur des matrices tridimensionnelles de collagène, les cellules sont incapables de s'étaler et de proliférer. Néanmoins, l'ajout de fibronectine favorise la prolifération et le regroupement des cellules en grappe associés à une contraction de la matrice sous-jacente comme ce qui est observé lors de fibroses pulmonaires (Sevilla et al. 2010; da Rocha-Azevedo et al. 2013; da Rocha-Azevedo & Grinnell 2013). Ce phénomène est accompagné d'une polymérisation de la fibronectine par les cellules. La présence de PDGF, un facteur de croissance pro-migratoire, empêche le regroupement des cellules en amas et inhibe la polymérisation fibrillaire de la fibronectine, favorisant ainsi un comportement migratoire (da Rocha-Azevedo et al. 2013; da Rocha-Azevedo & Grinnell 2013). La polymérisation en fibres de la fibronectine par les cellules est donc essentielle pour la cohésion des cellules.

II. A. 2. Dynamique de la fibronectine dans la matrice extracellulaire

La MEC n'est pas un compartiment statique et la fibronectine fait partie des molécules matricielles soumises à un **remodelage** constant. Ce processus intervient à trois niveaux : **dépôt**, **organisation** et **dégradation** de la fibronectine.

Le remodelage du réseau de fibronectine est essentiel au bon déroulement des processus physiologiques. Lors de la réparation cutanée, la fibronectine permet de consolider le clou

hémostatique et sert de support « guide » pour la migration des cellules dont les fibroblastes, les myofibroblastes et les cellules immunitaires (monocytes et macrophages). Dans le stade final de cicatrisation, ce réseau de fibronectine est dégradé. Dans le cas contraire, il y a échec de la réparation (Josephine M. J. Stoffels et al. 2013). Le dépôt mais surtout la polymérisation accrue de la fibronectine est nécessaire pour permettre la mise en place des vaisseaux lors de l'embryogenèse, la réparation tissulaire et également dans les cas pathologiques de fibroses et cancers (Kostourou & Papalazarou 2014). D'autre part, il a été montré que les cellules cancéreuses de fibrosarcomes à confluence produisent un réseau de fibronectine qui inhibe leur prolifération, migration et invasion. Takino & al ont montré que la dégradation de ce réseau de fibronectine par les MT1-MMP restaure la prolifération de ces cellules et favorise leur migration (Takino et al. 2011; Takino et al. 2013). La dégradation de la fibronectine par la granzyme B, une sérine protéase produite par les cellules immunitaires, limite quant à elle sa fibrillogenèse et ralentit la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales (Hendel & Granville 2013).

La structure fibrillaire de la fibronectine dans des supports tridimensionnels accélère et favorise la migration directionnelle des cellules par rapport à sa forme dimérique globulaire, y compris en absence de la séquence RGD, des intégrines $\alpha 5\beta 1/\alpha v\beta 3$ et des protéases MT1-MMP, indiquant que la structuration fibrillaire de la matrice est indispensable pour contrôler la vitesse et la direction de migration des cellules indépendamment de la liaison RGD-intégrines (Corall et al. 2014).

Nous pouvons également noter que lors du développement osseux, la stabilisation des réseaux fibrillaires de fibronectine par la transglutaminase favorise la minéralisation des tissus osseux en amplifiant la production de LOX et le pontage des collagènes (Cui et al. 2014).

Enfin, il est possible d'observer une production accrue de fibronectine dans les premières phases de la réparation nerveuse. Cette expression rediminue dans la phase tardive de rémyélinisation (formation des membranes myéliniques). Néanmoins, dans le cas de lésions de sclérose en plaque, la fibronectine est déposée sous forme d'agrégats mais n'est pas éliminée causant ainsi un échec de cette rémyélinisation (J. M. J. Stoffels et al. 2013). Certaines glomérulopathies ont également été décrites comme associées à des dépôts de type agrégat de fibronectine (Castelletti et al. 2008; Otsuka et al. 2012).

II. A. 3. Les fragments cryptiques de la fibronectine

La fibronectine possède des fragments et des séquences cryptiques qui sont enfouis dans la protéine et qui ne sont exposés que lorsque la protéine est dépliée et/ou partiellement digérée.

Ces séquences ont des **activités distinctes** de celle de la molécule initiale entière. Des études ont suggéré que, suite à leur libération par digestion enzymatique, le **fragment N-terminal de 30 kDa** et le **module de liaison à la gélatine (GBD)** de 50 kDa auraient des activités biologiques propres de type collagénases et gélatinases (Lambert Vidmar et al. 1991; Graille et al. 2010). Ces fragments semblent avoir des activités de type MMP, et favoriseraient la synthèse des MMP-3 et 13 en activant la voie des MAPK (Pagano & Reboud-Ravaux 2011). D'autre part, l'**anastelline** fait également partie des fragments cryptiques. Les modules de type III sont constitués de 7 feuillets β antiparallèles nommée A-B-C-C'-E-F-G. L'anastelline correspond au **fragment** du module III₁ de la fibronectine auquel les brins β A et B sont tronqués (cf. Partie3. I.). Son association avec le module III₃ de la fibronectine rend ce dernier plus sensible à la digestion par la thermolysine (Ohashi et al. 2009). En 2001, il a été

montré que l'anastelline possède des activités inhibitrices de la croissance tumorale et métastatique et de l'angiogenèse tumorale (Yi & Ruoslahti 2001). Ultérieurement, il a été démontré que cet effet angiostatique provient de la capacité de l'anastelline à inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales en inactivant les intégrines $\alpha 5\beta 1$ (Ambesi et al. 2005; Neskey et al. 2008; Ambesi & McKeown-Longo 2009). Le **fragment N-terminal de 30 kDa** et le **module III₁₄** de la fibronectine semblent avoir des effets similaires puisque ces fragments inhibent respectivement la croissance des cellules endothéliales et le processus métastatique des cellules de lymphome (Homandberg et al. 1985; Homandberg et al. 1986; Kato et al. 2002).

La fibronectine est soumise aux mécanismes de remodelage nécessaire à l'organisation et la structuration matricielle pouvant induire une modulation du comportement cellulaire.

II. B. Interaction fibronectine-cellule

II. B. 1. Structures d'interaction cellule-fibronectine

Les principaux récepteurs liants la fibronectine sont les **intégrines $\alpha 5\beta 1$** et **$\alpha v\beta 3$** et les **syndécanes-4**. Il en existe de nombreux autres qui interviennent dans des processus cellulaires variés (cf. Revue bibliographique, Partie3, I.B.3). Ces différents récepteurs ne reconnaissent pas les mêmes séquences, n'interviennent pas au même moment et leur interaction peut être différente en fonction de l'**organisation moléculaire et supramoléculaire** de la fibronectine.

Par exemple, les intégrines $\alpha 5\beta 1$ reconnaissent la séquence RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) située dans le module III₁₀ et la séquence flanquante PHSRN (Proline-Histidine-Serine-Arginine-Asparagine) située dans le module juxtaposé III₉ (Sechler et al. 1997). Les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ interagissent également avec le module I₅ *via* la séquence NGR (Asparagine-Glycine-Arginine) (Leiss et al. 2008; Niu & Chen 2011). La liaison à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ *via* la partie CS1 du module IIICS n'est pas l'interaction la plus forte. Néanmoins, cette interaction est renforcée lorsque la fibronectine est clivée. Contrairement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, l'intégrine $\alpha v\beta 3$ quant à elle ne va lier la fibronectine que sous sa forme assemblée en fibres (Midwood et al. 2006; Huveneers et al. 2008). Une étude plus récente a montré que l'absence des modules EDA et EDB de la fibronectine induit un changement de l'adhérence des cellules endothéliales dépendante des intégrines $\alpha 5\beta 1$ vers une adhérence dépendante des intégrines $\alpha v\beta 3$ (Cseh et al. 2010).

Parmi les quatre membres de la famille des syndécanes, le syndécane-2 permet l'adhérence des cellules à la fibronectine et intervient également dans la fibrillogenèse de la fibronectine (Klass et al. 2000; Kostourou & Papalazarou 2014). L'interaction de la fibronectine avec les intégrines et les syndécanes-4 permet d'initier la formation des structures d'adhérence (Morgan et al. 2007).

D'autres protéines servent également à l'interaction cellule-fibronectine dont notamment la **transglutaminase** tissulaire (TGase). La TGase est une protéine à activité catalytique qui permet de lier les protéines entre elles par pontage covalent entre deux groupements amines portés par des résidus lysines ou des glutamines. Dans le cas de la fibronectine, cette TGase sert également de récepteur pour favoriser son assemblage fibrillaire (Akimov & Belkin 2001).

Par ces interactions, la fibronectine module le comportement cellulaire.

II. B. 2. Rôle de la fibronectine dans la migration cellulaire

La fibronectine est une molécule dont l'organisation et la conformation modifient son influence sur le comportement cellulaire. Cette protéine intervient notamment dans l'adhérence et la prolifération mais également dans la **migration cellulaire**. Les réseaux fibrillaires de fibronectine formés par les cellules sont nécessaires à la migration des cellules lors de la gastrulation (Boucaut et al. 1990). Un défaut dans le dépôt de la fibronectine empêche la gastrulation et perturbe la mise en place du mésoderme. Cette altération est létale (Darribère & Schwarzbauer 2000). Des études ont montré que sur la fibronectine, les cellules peuvent avoir des comportements migratoires différents en fonction du type de récepteurs cellulaires qu'elles expriment. Dans le cas des myoblastes C2C12, la fibronectine favorise la migration collective (Vaz et al. 2012). Par contre, elle contribue à la cohésion des cellules et diminue la dispersion et/ou l'invasion des fibroblastes et des cellules cancéreuses de la prostate et de glioblastome. Plus particulièrement, la capacité de ces cellules cancéreuses de la prostate à assembler la fibronectine permet de restreindre leur capacité invasive (Sabari et al. 2011; Jia et al. 2012; da Rocha-Azevedo et al. 2013; Serres et al. 2014). La transition épithélio-mésenchymateuse des cellules mammaires est également favorisée par l'interaction de la fibronectine avec les intégrines $\alpha 5$ qui permet l'activation de Rac1 (Chen et al. 2013).

Danen & al ont montré plus particulièrement que sur des recouvrements de fibronectine, les intégrines **$\alpha v \beta 3$ favorisent la migration directionnelle** des cellules épithéliales alors que les intégrines **$\alpha 5 \beta 1$ favorisent une migration aléatoire** (Danen et al. 2005). Une étude plus récente a également montré que les intégrines **$\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$** sont toutes les deux impliquées dans la **migration collective** des cellules de gliome alors que seules les intégrines **$\alpha 5 \beta 1$** sont impliquées dans la **migration individuelle** (Ray et al. 2014). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces intégrines sont impliquées dans des voies de signalisation différentes (cf. Partie.1.III.C.3). Sur un support de fibronectine, les intégrines $\alpha v \beta 3$ permettent l'activation et l'accumulation de la petite Rho GTPase (impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine) **Rac1 dans le front avant de migration** par rapport au front arrière. Cette répartition est nécessaire au contrôle des changements de direction des cellules (Danen et al. 2005; Bass et al. 2007). Dans le cas de l'activation des intégrines $\alpha 5 \beta 1$, les protéines RhoA favorisent la formation de plus petites protubérances latérales menant à une migration plus aléatoire. L'inhibition de RhoA permet le changement d'une adhérence $\beta 1$ -dépendante à $\beta 3$ -dépendante, alors qu'au contraire, l'augmentation de son activité permet le basculement vers une adhérence $\beta 1$ -dépendante (Danen et al. 2005). Les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ sont nécessaires à la mise en place des structures d'adhérence et permettent de générer des forces de tension alors que les intégrines αv stabilisent les contacts focaux et sont responsables de l'adaptation morphologique aux forces générées (Schiller et al. 2013). L'interaction fibronectine-intégrine αv est donc plus stable et a une durée de vie plus longue que l'interaction fibronectine- $\alpha 5 \beta 1$.

En outre, il existe une coopération étroite entre les syndécans-4 et les intégrines pour moduler les comportements cellulaires (cf. Partie 1. III. C. 3. d). L'interaction des syndécans-4 avec la fibronectine permet l'activation de PKC α et induit une accumulation de Rac1 dans le front avant de migration (Bass et al. 2007). De plus, la **phosphorylation des syndécans-4** permet de stabiliser les contacts focaux $\alpha v \beta 3$ -dépendants en ralentissant la translocation des intégrines $\alpha v \beta 3$, et favorise ainsi la migration directionnelle des cellules. La forme non-phosphorylée des syndécans-4 favorise

quant à elle le recyclage des intégrines $\alpha 5\beta 1$ vers la membrane plasmique et réprime le trafic des intégrines $\alpha v\beta 3$. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ déstabilisent ainsi les contacts focaux $\alpha v\beta 3$ -dépendants et empêchent la migration cellulaire en générale (Morgan et al. 2013).

La régulation de l'expression à la surface membranaire des récepteurs est en partie contrôlée par un **mécanisme d'internalisation**. En présence de fibronectine, il a été montré que les **cavéolines** sont regroupées au centre de la cellule pendant l'étalement. Lors de la migration, les formes phosphorylées de la cavéoline sont relocalisées vers le front avant tandis que les formes non-phosphorylées sont relocalisées vers le front arrière de la cellule, amplifiant ainsi la polarisation de la cellule. Une perte d'expression de ces molécules de cavéoline engendre une perte de l'orientation des cellules en migration (Beardsley et al. 2005).

La migration induite par la fibronectine dépend également de sa **conformation supramoléculaire**. En effet, sur un support 2D de fibronectine, il a été montré que la migration des cellules de fibrosarcomes est classiquement dépendante des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et des métalloprotéases membranaires MT1-MMP (Corall et al. 2014). Sur une matrice 3D dans laquelle la fibronectine a une structure fibrillaire, la migration de ces cellules est directionnelle et plus rapide mais ne nécessite ni les intégrines $\alpha 5\beta 1/\alpha v\beta 3$ ni les MT1-MMP. Sur une matrice 3D de fibronectine, la **migration directionnelle** des cellules est donc définie par la **topographie fibrillaire** de la fibronectine et les cellules ont une **migration amiboïde** (indépendante de la dégradation enzymatique) plutôt que mésenchymateuse (dépendante de la dégradation enzymatique) (Corall et al. 2014).

Des modèles *in vitro* ont été mis en place afin de déterminer le rôle de la fibronectine dans le processus d'**invasion**. Il a été montré que la fibronectine est nécessaire aux fibroblastes pour transiter d'une matrice de collagène vers une matrice de fibrine indépendamment du rôle des protéases sécrétées dans la dégradation des matrices (Greiling & Clark 1997). La présence de fibronectine dans les matrices de collagène est également primordiale pour favoriser l'invasion des cellules cancéreuses de mélanome et de fibrosarcome mais pas celle des fibroblastes (Menon & Benigno 2011). Cette invasion par les cellules cancéreuses est dépendante de la présence de fibronectine mais également de la présence de la protéine de signalisation cofiline.

II. C. Substitut vert de la fibronectine : analogue végétal des protéines animales

La fibronectine est une protéine très largement étudiée pour son rôle dans l'adhérence, la prolifération et la migration cellulaire. Sa capacité d'interaction avec différents partenaires et sa fonctionnalité en ont fait une protéine de choix pour faciliter l'adhérence des cellules aux supports *in vitro*. Malgré cela, la fibronectine n'est pas utilisée pour les applications en clinique en raison des problèmes liés à l'utilisation des protéines animales tels que la **transmission des virus ou des maladies à prion** et du **coût de sa purification**. Des solutions alternatives ont donc été recherchées et se sont tournées vers les **biotechnologies végétales**.

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi végétale qui constitue une véritable **matrice extracellulaire** (Figure 33). Comme pour les organismes animaux, les différents éléments de cette matrice extracellulaire lui confèrent des organisations structurales et fonctionnelles. Des similarités architecturales peuvent être notées entre les structures animales et les structures végétales. La cellulose et l'hémicellulose ont un rôle similaire au collagène I et III des tissus animaux. Les molécules de cellulose s'associent pour constituer la trame fibrillaire des parois tandis que les molécules d'hémicellulose permettent de relier les fibres de cellulose entre elles. Les pectines, assimilées à l'acide hyaluronique de la matrice animale, combinent les espaces entre les réseaux de fibres de cellulose/hémicellulose. Tout comme l'acide hyaluronique et les protéoglycanes, les pectines sont des polymères saccharidiques (polyglucuronates) qui se charge en eau pour former un gel réservoir d'ions qui résiste aux forces de compression. Enfin, les extensines sont des protéines qui rigidifient la paroi en pontant les résidus tyrosines de deux molécules différentes. Elles sont associées à une résistance mécanique pour éviter l'éclatement de la paroi suite à une dégradation des parois par un pathogène invasif. Cette propriété fait donc des extensines des molécules similaires à l'élastine des tissus animaux. Parmi tout ces analogues structuraux de la matrice extracellulaire, des molécules similaires aux protéines d'adhérence animales ont également été retrouvées dans les parois de différentes espèces végétales dont notamment des analogues de la fibronectine et de la vitronectine (Sanders et al. 1991; Zhu et al. 1993) qui ont été immunomarqués avec des anticorps spécifiques dirigés contre ces deux protéines humaines.

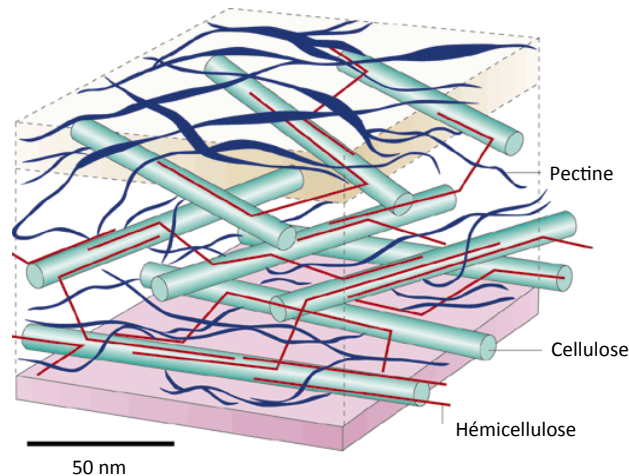


Figure 33 : Représentation de la matrice extracellulaire végétale

Les trois principaux composants de la matrice végétale sont représentés : cellulose, hémicellulose et pectine (d'après Smith 2001).

Au sein du laboratoire ERRMECe, un analogue de la fibronectine a été purifiée à partir de paroi végétale de petit pois en utilisant un protocole similaire à celui de la purification de la fibronectine plasmatique humaine (Poulouin et al. 1999). Cette protéine de type fibronectine, nommée *greenfibronectine*, présente un poids moléculaire similaire au monomère de fibronectine, soit environ 220 kDa (Pellenc et al. 2004). Cette protéine possède des propriétés semblables à la fibronectine plasmatique humaine. Elle a notamment la capacité d'interagir avec des ligands analogues - gélatine et héparine - et peut être reconnue spécifiquement par l'anticorps polyclonal anti-fibronectine plasmatique humaine (f3648, Sigma). Néanmoins, les propriétés d'interaction avec les autres molécules matricielles et les effets sur le comportement cellulaire restent à déterminer. Ces différentes caractéristiques pourront faire de la *greenfibronectine* un substitut idéal de la fibronectine plasmatique pour des applications en clinique.

En résumé :

Au sein des matrices, le réseau de fibronectine joue un rôle organisateur et stabilisateur de la MEC en favorisant le maintien du réseau des autres molécules matricielles.

Cette protéine est également soumise à un remodelage dans la matrice : elle est produite, restructurée et dégradée par les cellules de l'environnement.

Sa dégradation et/ou sa réorganisation permet de libérer/exposer des fragments/sites cryptiques induisant différentes activités cellulaires.

L'interaction de la fibronectine avec les cellules se fait par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires :

- les intégrines
- les syndécans
- la transglutaminase

La fibronectine influence, entre autre, la migration cellulaire. L'interaction de la fibronectine avec les intégrines $\alpha5\beta1$ et $\alpha v\beta3$ est importante dans le contrôle respectif de la migration aléatoire et directionnelle. L'interaction de ces deux intégrines avec la fibronectine intervient dans la migration collective alors que seule l'interaction avec $\alpha5\beta1$ intervient dans la migration isolée.

L'influence de la fibronectine sur le comportement cellulaire dépend également de sa conformation. Elle peut former des assemblages de différentes structures dont les mécanismes de formation sont discutés dans la suite.

III. ASSEMBLAGES DE FIBRONECTINE

La molécule de fibronectine est trouvée sous forme dimérique soluble dans les liquides biologiques. Les différentes séquences d'interaction, notamment celles d'auto-assemblage décrites précédemment, confèrent la particularité à la fibronectine de former des **assemblages supramoléculaires**. Le principal assemblage décrit dans la littérature correspond aux **fibres** formées *in vivo* par les cellules lors du processus de fibrillogenèse (Mao & Schwarzbauer 2005). Plus récemment, des assemblages de type **agrégat** ont également été retrouvés *in vivo*. Ces assemblages semblent être formés dans les cas pathologiques de la glomérulopathie et des lésions de sclérose en plaque (J. M. J. Stoffels et al. 2013; Castelletti et al. 2008). Les études *in vitro* ont montré que la fibronectine peut former des assemblages de structure bien plus **diversifiée** (Patel et al. 2006; Nelea et al. 2008).

III. A. La fibrillogenèse : assemblage induit par les cellules

En culture cellulaire, les études laissent apparaître des fibres de fibronectine interconnectées entre-elles, de quelques nanomètres à quelques micromètres de diamètre (10 à 1000 nm) et de dizaines de micromètres en longueur (Figure 34) (Bradshaw & Smith 2014).

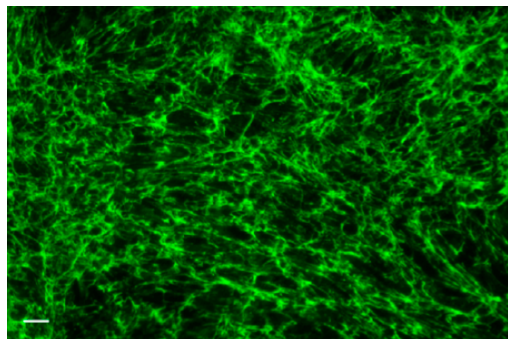


Figure 34 : Réseau fibrillaire de fibronectine

Image de microscopie à fluorescence du réseau de fibronectine formé par les cellules CHO (barre d'échelle : 20 μ m) (d'après Mao & Schwarzbauer 2005).

La fibronectine dimérique en solution possède un diamètre de 8.7 nm (Nelea 2008). Sa forme dépliée possédant un diamètre de 3 nm, les fibres observées *in vitro* correspondraient à l'assemblage de plusieurs dizaines/centaines de molécules de fibronectine. Sous l'appellation **fibrillogenèse**, le passage de la forme soluble à la forme fibrillaire insoluble se déroule en plusieurs étapes (Figure 35) :

- Liaison de la fibronectine soluble à la cellule *via* les intégrines (notamment les intégrines $\alpha 5\beta 1$)
- Recrutement des protéines de signalisation et formation de sites d'adhésion focale
- Regroupement des intégrines et réorganisation du cytosquelette d'actine qui correspond à la signalisation *inside-out*
- Changements conformationnels des molécules de fibronectine sous la tension engendrée par les intégrines favorisant l'interaction des molécules de fibronectine entre elles (Figure 35.d et i)
- Conversion des fibrilles en fibres de fibronectine par une translocation des intégrines de la périphérie vers le centre de la cellule (Figure 35.d et ii)

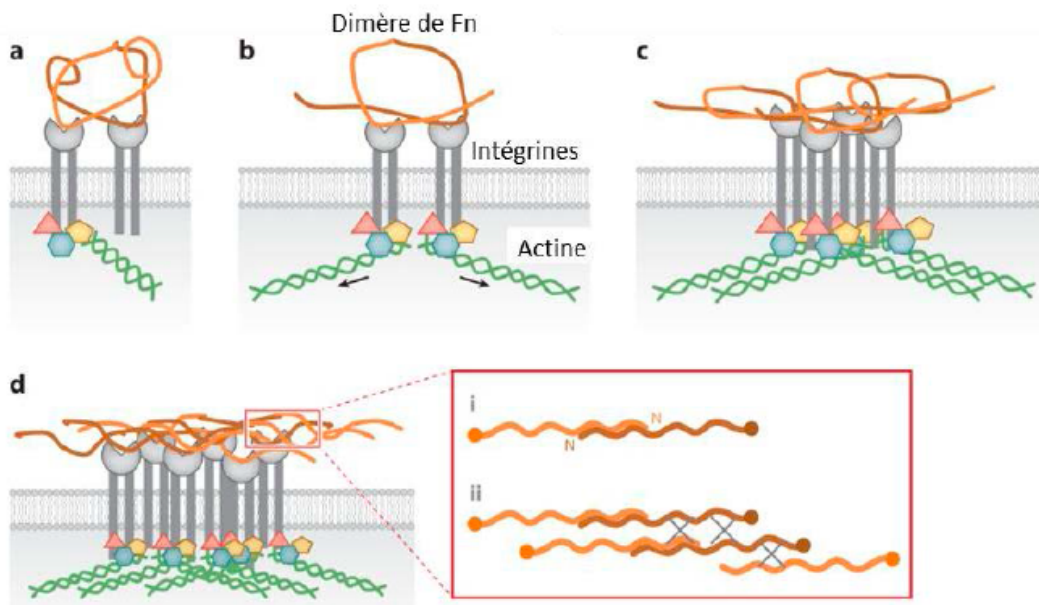


Figure 35 : Etapes principales de la fibrillogenèse

a) Liaison de la fibronectine aux intégrines. b) Recrutement des protéines de signalisation et formation des sites d'adhésion focale. c) Regroupement des intégrines et réorganisation du cytosquelette d'actine. d) Changements de conformation de la fibronectine exposant les sites d'auto-assemblage nécessaires à sa fibrillogenèse. i) Dimère de fibronectine dépliée sous les forces de tension cellulaires. ii) Association des molécules de fibronectine pour former des fibres (d'après Singh et al. 2010).

Une partie de ses modules d'auto-assemblage étant cryptiques, la fibronectine doit subir des modifications de structure pour permettre les interactions fibronectine-fibronectine et ainsi initier la fibrillogenèse. En 1999, il a été suggéré que la liaison des **cœurs hydrophobes** des modules de type III de la fibronectine avec la **bicouche lipidique** pourrait favoriser le dépliement et la polymérisation de la fibronectine (Baneyx & Vogel 1999; Baneyx et al. 2001). Mais la fibrillogenèse est essentiellement médiée par les **forces de traction** appliquées par les cellules sur la protéine.

Dans un premier temps, il y a donc **liaison de la fibronectine dimérique avec la cellule** par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires : les **intégrines $\alpha 5 \beta 1$** qui sont réparties sur toute la surface cellulaire. Les intégrines $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha 4 \beta 1$ et $\alpha 11 \beta 3$ et les syndécanes-1 et -2 interviennent également dans la fibrillogenèse (Leiss et al. 2008; Klass et al. 2000; Stepp et al. 2010). Les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ se lient à la séquence RGD du module III₁₀ de la fibronectine ainsi qu'au site PHSRN dans le module III₉. Ce module III₉ n'est pas indispensable puisqu'en son absence la fibrillogenèse est ralentie mais pas inhibée.

Suite à leur interaction avec la fibronectine, les **intégrines se regroupent** pour former des **contacts focaux** et générer une **concentration locale élevée** en fibronectine qui facilite les interactions fibronectine-fibronectine. La partie cytoplasmique des intégrines interagit avec les filaments d'actine qui exercent des forces de tension permettant leur translocation depuis l'extrémité des lamellipodes vers le centre de la cellule le long des fibres de stress. Cette translocation permet le dépliement des molécules de fibronectine interagissant ainsi pour former des fibrilles (Ohashi et al. 2002). La liaison des syndécanes-1 avec le module d'affinité à l'héparine de la fibronectine pourrait aider au dépliement de la fibronectine pendant la fibrillogenèse (Yang et al. 2011).

D'autre part, il a également été montré que la partie carboxy-terminale, constituée des modules III₁₅ à I₁₂ de la fibronectine et contenant les ponts disulfures entre les deux sous-unités, est essentielle à

la fibrillogenèse initiée par les cellules (Schwarzbauer 1991; Ichihara-Tanaka et al. 1995; Kozaki et al. 2003).

La formation des fibrilles de fibronectine permet au processus de polymérisation de se poursuivre en permettant la formation de **fibres plus épaisses, insolubles** au deoxycholate (acide biliaire qui permet la dissolution des membranes lipidiques) et maintenues par un ensemble d'interactions fortes entre protéines.

Ces fibres insolubles procurent sa rigidité et sa **stabilité** à la matrice de fibronectine mais également son caractère **extensible**.

III. B. Le maintien de la structure fibrillaire des fibres de fibronectine et leur extensibilité

Depuis maintenant plusieurs années, les structures permettant le maintien des structures fibrillaires de fibronectine dans les matrices sont très activement étudiées. En 1977, il a été montré que suite à l'extraction de la MEC, une partie des molécules de fibronectine subit un retard de migration lors d'une séparation sur gel d'électrophorèse (Hynes & Destree 1977). Ce retard n'est plus observé lors d'une séparation en conditions réductrices. Suite à ce résultat, il a longtemps été suggéré que les assemblages de fibronectine dans la MEC seraient maintenus par des liaisons de type **ponts disulfures**. En 1994, de nouveaux résultats ont suggéré que d'autres types de liaison covalente pourraient être impliqués dans la formation et la stabilisation des fibres dont notamment les **liaisons iso-peptidiques** formées par la transglutaminase tissulaire et la transglutaminase plasmaticque activée (facteur XIIIa) (Martinez et al. 1994; Verderio et al. 1999; Cui et al. 2014). En effet, la transglutaminase, connue pour avoir une localisation principalement cytoplasmique ou extracellulaire, se retrouve également à la surface cellulaire. Elle y favoriserait la polymérisation des fibres de fibronectine par sa fonction catalytique. Elle permettrait la formation de liaisons peptidiques entre les groupements amines de la chaîne latérale de la lysine et le groupement carboxyle de la chaîne latérale du glutamate (Mehta 2005). Le facteur XIIIa intervient quant à lui dans le cas du comblement des blessures et favorise la polymérisation de la fibronectine plasmaticque (Barry & Mosher 1988). Cependant, une étude réalisée en 2001 a montré qu'indépendamment de sa fonction liante, la transglutaminase peut jouer un rôle de **récepteur cellulaire**. A la surface cellulaire, elle interagit avec la séquence de liaison à la gélatine I₆₋₉ de la fibronectine et va ainsi promouvoir la fibrillogenèse indépendamment de sa fonction enzymatique (Akimov & Belkin 2001).

D'autre part, la **fibrilline** est une protéine connue pour être un partenaire de la fibronectine. Elle est capable de s'auto-associer par l'intermédiaire de ponts disulfures. Ces réseaux de fibrilline sont capables de piéger les molécules de fibronectine dimérique compacte (non-assemblée) (Ohashi & Erickson 2009). Ces données expliqueraient les différences observées lors de la séparation de la fibronectine sur gel d'électrophorèse en 1977. Ainsi, les fibres de fibronectine au sein des MEC semblent donc être constituées de molécules de fibronectine liées par des **liaisons covalentes** mais également **non-covalentes** (Chen & Mosher 1996).

Ces structures de fibronectine, qu'elles soient liées covalement ou non, gardent tout de même une **grande extensibilité**. En théorie, cette protéine de 140 nm de long pourrait s'étendre jusqu'à 950 nm (Bradshaw & Smith 2014). Ohashi & al ont montré que l'extensibilité des fibres de fibronectine

résulterait d'un mécanisme d'**extension-rétractation** alors que Baneyx & al ont quant à eux montré que l'extensibilité résulterait d'un mécanisme de **dépliection-repliection** de la protéine (Ohashi et al. 1999; Baneyx et al. 2001; Baneyx et al. 2002). En effet, les expériences de Ohashi & al de visualisation de la dynamique de la fibronectine-GFP recombinante dans les cellules ont montré que la rupture de l'interaction entre les cellules et les fibres de fibronectine induit une diminution de la taille de ces fibres de 3/4 par rapport à leur taille initiale (Ohashi et al. 1999). Baneyx & al ont montré par des expériences de FRET que l'assemblage de la fibronectine en présence de cellules mène à une diminution du signal de fluorescence indiquant que la fibronectine passe d'un état compact à étendu. L'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine D induit quant à elle une perte de tension produite par les cellules, se traduisant par un retour de la fluorescence des fibres de fibronectine similaire à la fluorescence de la fibronectine dimérique compacte (Baneyx et al. 2001; Baneyx et al. 2002; Ohashi et al. 2002).

Le passage de la forme compacte à une structure fibrillaire est accompagné d'un changement des structures secondaires et tertiaires de la fibronectine qui serait à l'origine de l'**extensibilité** des fibres de fibronectine (Abu-Lail et al. 2006). La relaxation des fibres de fibronectine observée *in vitro* suite à la rupture de la liaison fibronectine-cellule et les expériences de FRET suggèrent un **changement de structuration entre les molécules de fibronectine** constituant ces fibres mais également des **changements de structures intramoléculaires** à la fibronectine. Plusieurs modèles ont été émis proposant différents schémas de dépliection de la molécule de fibronectine (Bradshaw & Smith 2014). Bowditch et al. ont montré que des **phénomènes de rotation** des modules de la fibronectine les uns par rapport aux autres minima permettent de libérer des sites d'interaction. Ce type de rotation permettrait notamment d'aligner les sites RGD du module III₁₀ et le site PHSRN dans le module III₉ pour faciliter la reconnaissance de ces sites synergiques par les intégrines et initier la fibrillogenèse (Bowditch et al. 1994).

III. C. Autres types d'assemblage de la fibronectine

Des études *in vitro* récentes tendent à montrer que différents états structuraux de la fibronectine pourraient coexister dans les matrices. La production de TGF β par les cellules tumorales favoriserait le dépliection, l'épaississement et la rigidification des fibres de fibronectine par rapport à celles produites en absence de ces facteurs solubles (Chandler et al. 2011). Ambesi & al ont montré que l'anastelline est également un régulateur de l'organisation de la fibronectine : l'anastelline modifie l'organisation de cette protéine menant ainsi à l'exposition d'épitope différent au sein de la molécule et induisant ainsi des voies de signalisation et des comportements cellulaires différents avec notamment l'inhibition de la formation des microvaisseaux (Ambesi et al. 2005; Ambesi & McKeown-Longo 2014).

D'autre part, en 1995, un assemblage *in vivo* de la fibronectine différent des fibres a été décrit chez des patients atteints de glomérulopathie (Strom & al. 1995). Ces assemblages correspondraient à des dépôts résultant probablement d'un mauvais remodelage d'un mutant de la fibronectine plasmatique (Castelletti et al. 2008). En effet, les mutations sur cette protéine sembleraient altérer le repliection de son domaine de liaison à l'héparine et serait à la base de son dépôt aberrant dans les reins. A notre connaissance, depuis seuls quelques autres articles concernant ce type d'assemblage ont été publiés dont l'un conforte la formation de ces dépôts de fibronectine sur les parois des

capillaires rénaux dans certains cas de glomérulopathie (Otsuka et al. 2012). Un autre article récent de 2013 met en évidence l'échec de la rémyélinisation suite à la formation d'agrégats de fibronectine dans des cas de lésions de sclérose en plaque (J. M. J. Stoffels et al. 2013). Dans cette pathologie, les agrégats de fibronectine seraient formés par les astrocytes en réponse aux facteurs inflammatoires sécrétés suite à une lésion et une démyélinisation. Puis, ces agrégats empêcheraient alors la différenciation des oligodendrocytes nécessaires à la rémyélinisation. A ce jour, très peu d'informations sont donc recensées concernant la place de ces nouveaux types d'agrégats sur le comportement cellulaire et ces pathologies. L'étude de ces agrégats de fibronectine semble donc constituer donc un axe émergent dans l'étude des différentes formes de la fibronectine.

III. D. Etudes *in vitro* d'assemblages de la fibronectine

In vivo, l'assemblage fibrillaire de la fibronectine est médié par les cellules qui, par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires, exercent une tension sur la fibronectine pour la déplier. Ce dépliement peut être obtenu *in vitro* en modifiant des paramètres physico-chimiques. Ces derniers miment les forces de traction cellulaires. Ainsi, les différentes notions concernant la fibrillogenèse ont en grande partie été déterminées à l'aide de modèles *in vitro*, en absence de cellules. Ces modèles ont permis d'une part de déterminer les étapes de cette fibrillogenèse et d'autre part d'étudier l'effet de différents paramètres physico-chimiques sur ce processus dont l'effet des forces ioniques et de la température.

Grâce aux expériences de microscopie à force atomique, il a été montré l'existence d'une **hiérarchie** dans le dépliement des différents modules de type III de la fibronectine. Ainsi, le module III₁₀ contenant la séquence RGD et le module III₁₃ sont les moins stables et sont donc les premiers à être dépliés avec une force requise de 80 pN ; tandis que les modules III₁ et III₂ impliqués dans la polymérisation de la fibronectine semblent être les plus stables et sont les derniers à se déplier sous l'application d'une force de 200 pN (Oberhauser et al. 2002). Il semble donc que la rupture des **interactions inter et intradomaines** jouent un rôle dans l'assemblage de la fibronectine.

Des études *in vitro* ont également montré que la fibronectine forme des assemblages fibrillaires de type amyloïde en présence de l'anastelline, suggérant ainsi l'implication de ce fragment dans la polymérisation de la fibronectine (Morla et al. 1994). Entre 2003 et 2005, les études *in silico* et *in vitro* ont suggéré que les deux premiers brins β A et B constituant les modules III₁, III₂, III₉ et III₁₀ se déplieraient en premier pour permettre l'extension de ces derniers et favoriseraient ainsi le réarrangement des brins β dont le brin E (Figure 36) (Litvinovich et al. 1998; Gao et al. 2002; Gao et al. 2003; Briknarová et al. 2003; Li et al. 2005; Vakonakis et al. 2007; Ohashi & Erickson 2011; Gee, Yüksel, et al. 2013). Ces réarrangements permettraient la libération du **cœur hydrophobe** des modules de type III (Briknarová et al. 2003; Ohashi et al. 2009) et leur confèreraient une **structure similaire aux protéines précurseurs des assemblages amyloïdes** (Briknarová et al. 2003). Cette particularité suggère que le dépliement des modules de type III pourrait exposer leur cœur hydrophobe et provoquerait un réarrangements des feuilletts β pour permettre l'association des molécules de fibronectine *via* des **interactions hydrophobes** et des **feuilletts β intermoléculaires** (Gee, Yüksel, et al. 2013). En 2008, des simulations *in silico* sur le module III₁₀ de la fibronectine ont également montré que des forces de tension appliquées sur le motif RGD, par analogie aux forces transmises par les intégrines, pourraient faciliter le dépliement et l'exposition du cœur hydrophobe

du module III₁₀ (Gee et al. 2008). Ces données doivent être confirmées pour la molécule de fibronectine entière mais apportent toutefois des éléments importants concernant le processus de fibrillogenèse médié par les cellules où trois phénomènes structuraux semblent importants : l'interaction fibronectine-intégrine, les changements de conformation qui exposent le cœur hydrophobe des modules de type III et les changements de conformation responsables de la formation de feuillets β intermoléculaires.

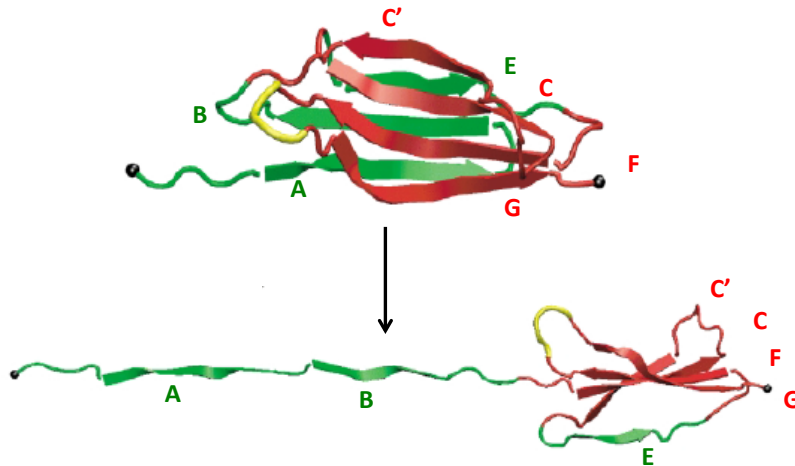


Figure 36 : Représentation du dépliement des modules de types III de la fibronectine

Les modules de types III de la fibronectine sont constitués de 7 feuillets β (A, B, C, C', E, F, G). Le dépliement des brins β verts A et B permet le réarrangement du feuillet E. Le cœur hydrophobe du module de type III est ainsi exposé (Gao et al. 2002).

Des assemblages supramoléculaires à partir de la **fibronectine entière** ont également été élaborés *in vitro*. Certains des assemblages de fibronectine sont irréversibles comme il l'a été montré pour les fibres insolubles retrouvées *in vivo* (Niedzwiadek et al. 1988; Pauthe et al. 2002). Selon les conditions utilisées, les assemblages formés peuvent avoir **différentes tailles** et peuvent être formés à partir de **fibronectine native** ou **dépliée** suggérant **différentes voies de polymérisation** de la fibronectine (Patel et al. 2006; Nelea et al. 2008).

La fibronectine est une protéine globalement flexible (Pelta et al. 2000) dont la conformation peut être influencée par l'ajout d'agents dénaturants et par les forces ioniques. Dans des conditions de dénaturation à l'urée, la fibronectine est capable de se déplier. Cependant, suite à une renaturation progressive, la fibronectine adopte une conformation différente en formant des **agrégats supramoléculaires** maintenus par des liaisons covalentes de type **pont disulfure** (Patel et al. 2006). Les agents réducteurs tels que le glutathion, les agents dénaturants comme la guanidine, les lipides ou encore les surfactants comme le SDS sont d'autres auxiliaires capables d'induire l'assemblage de la fibronectine entière sous forme de **fibres** ou **agrégats** maintenus ou non par des liaisons disulfures (Mosher & Johnson 1983; Sakai et al. 1994; Sakai et al. 1996; Baneyx & Vogel 1999; Huang et al. 2010). Le pontage covalent par la transglutaminase-2 forme également des assemblages de fibronectine de très grand rayon hydrodynamique (250 nm) (Nelea et al. 2008).

La température et le pH sont deux autres paramètres physico-chimiques modifiant la structure de la fibronectine (Alexander et al. 1979; Welsh et al. 1983). Comme dans le cas du dépliement mécanique cité précédemment, les différents modules de la fibronectine présentent une hiérarchie dans leur

déplie ment thermique. Chaque module de type III a une température de déplie ment spécifique. Les modules les plus labiles sont les modules III₁₁ (48°C), III₂, III₄, III₅, III₈, III₉ (57°C), et III₁ (78°C) alors que les modules les plus thermostables sont les modules III₃ (121°C), III₆ (111°C), III₁₀ (102°C), III₇ (95°C) (Litvinovich & Ingham 1995). Ces modifications de structure se traduisent par un phénomène d'agrégation avec l'élévation de la température et de la concentration en fibronectine où les assemblages semblent maintenus par des liaisons hydrogènes entre les feuillets β intermoléculaires (Pauthe et al. 2002).

Ces études *in vitro*, menées avec des approches biochimiques-biophysiques et/ou *in silico* différentes, ont permis de montrer que la fibronectine peut former différents types d'assemblage. Elles ont également permis de déterminer les modifications de structure impliquées dans la fibrillogénèse. Néanmoins, des études montrent également la formation *in vivo* d'assemblages de fibronectine avec des disparités structurales variées dont des dépôts de type **agrégat** associés à des pathologies (J. M. J. Stoffels et al. 2013; Castelletti et al. 2008). Si la fibronectine peut former des assemblages de structure diversifiée en fonction de différents paramètres physico-chimiques et physiopathologiques, les mécanismes d'auto-assemblage en agrégats de la fibronectine entière et leur effet sur le comportement cellulaire ne sont pas encore bien établis.

En résumé :

La fibrillogénèse correspond au processus d'assemblage fibrillaire de la fibronectine par les cellules. Ces assemblages de fibronectine sont à la fois stables et extensibles. Ils semblent maintenus par des liaisons covalentes (ponts disulfures et liaisons isopeptidiques formées par les enzymes) et des liaisons non-covalentes (interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes). Cet assemblage de la fibronectine semble faire intervenir trois mécanismes importants : la liaison intégrine-fibronectine, l'exposition de zones hydrophobes et la formation de feuillets β intermoléculaires suite à une modification de la structure de la protéine.

Les études *in vitro* menées pour élucider les mécanismes de cette fibrillogénèse ont montré que les assemblages formés par la fibronectine sont divers de par leur morphologie (fibres, agrégats), de par les liaisons impliquées (implication ou non de liaisons covalentes, hydrogène, hydrophobes, ioniques) et de par les processus d'assemblages impliqués (intervention d'enzymes, de fragments, des forces ioniques, d'agents dénaturants etc.).

Il existe une relation entre la structure des protéines et leur fonction biologique. Si ces fonctions biologiques semblent être assez bien définies dans le cas des fibres de fibronectine, l'influence des agrégats sur le comportement cellulaire l'est moins.

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA THESE

La fibronectine est une glycoprotéine structurelle et fonctionnelle majeure impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques. Comme souligné dans la synthèse bibliographique, elle peut acquérir différentes conformations moléculaires et supramoléculaires : forme dimérique et soluble dans les liquides biologiques, forme insoluble liée aux cellules, forme assemblée et incorporée dans les matrices. Plus particulièrement, la fibronectine semble former différents types d'assemblages supramoléculaires dont les fibres. Les mécanismes de cette fibrillogenèse en fibres par les cellules de la fibronectine sont bien décrits dans la littérature.

Néanmoins, cette fibronectine pourrait également former des assemblages différents *in vivo* dont notamment des agrégats qui, contrairement à la formation des fibres, sont beaucoup moins étudiés. Ainsi, il est possible de se demander si la fibronectine plasmatique entière peut s'agréger et sous quelle forme ? Quels sont les changements structuraux associés à cette agrégation ? Enfin, quels sont les mécanismes d'agrégation de cette fibronectine ?

In vivo, ces agrégats semblent être associés à des pathologies comme l'échec de la rémyélinisation et la glomérulopathie mais leur effet sur les processus physiopathologiques commence tout juste à être étudié. Ce pourquoi l'objectif est également de déterminer quelles sont les conséquences de cette agrégation sur les fonctions de la fibronectine ? Quels sont les effets de ces agrégats de fibronectine sur le comportement cellulaire ?

L'objectif de la thèse est de contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'agrégation de la fibronectine. Pour cela, il est nécessaire de valider la possibilité d'agrégation de cette protéine. Ensuite, les mécanismes et les structures impliqués dans cette agrégation doivent être élucidés. Enfin, l'influence des agrégats sur les comportements cellulaires, par rapport à la fibronectine native, très peu décrit à ce jour, sont à mieux déterminer.

Pour répondre aux différentes questions, le travail a consisté à élaborer des assemblages *in vitro* à partir de fibronectine plasmatique entière par dénaturation thermique. Les assemblages ont été caractérisés par différentes techniques biochimiques et biophysiques. Leur morphologie, les structures impliquées et enfin les mécanismes de polymérisation ont été déterminés.

Ensuite, la fonctionnalité de la fibronectine assemblée a été identifiée en testant l'accessibilité de ses séquences d'affinité à différents partenaires.

Enfin, son influence sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes SKOV3 a été étudiée en termes de viabilité, d'incorporation matricielle, d'adhérence, de morphologie et de migration cellulaire.

SECTION EXPERIMENTALE

I. PURIFICATION, ASSEMBLAGE & CARACTERISATION DE LA FIBRONECTINE

I. A. Purification de la fibronectine

La fibronectine humaine est purifiée selon le protocole de Poulouin & al (Poulouin et al. 1999) à partir de cryoprécipité ou de plasma (fournis par l'Établissement français du sang, Pontoise, France). La purification repose sur les propriétés d'affinité de la fibronectine avec deux de ses substrats majeurs que sont la gélatine et l'héparine. La fibronectine est séparée des autres composants du plasma/cryoprécipité par des passages successifs sur des colonnes de chromatographie d'affinité à la gélatine et à l'héparine.

La purification se déroulant sur trois jours, chacune des étapes de la purification est réalisée à +8°C, dans des tampons préparés dans de l'eau 18 MΩ, afin de minimiser les dégradations protéolytiques et d'éviter la précipitation des protéines.

Le cryoprécipité est solubilisé à raison de 1 g dans 10 ml de tampon TE 500, pH 7.4 (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 500mM). A ce mélange est ajouté 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) qui est au préalable solubilisé dans l'isopropanol. Ce dernier permet d'inhiber les protéases (sérines protéases) qui pourraient dégrader la fibronectine. Après 3-4 heures d'agitation orbitale « douce » pour permettre une bonne solubilisation du cryoprécipité, la solution est centrifugée 10 minutes à 5000 g et +10°C afin d'éliminer les gros débris qui pourraient colmater les colonnes de chromatographie.

Dans le cas de la purification à partir de plasma, les poches de plasma sont décongelées par des passages successifs dans des bains d'eau tiède. Comme pour le cryoprécipité, le plasma est centrifugé 10 minutes à 5000 g et +10°C.

Le cryoprécipité (ou le plasma) est déposé sur une colonne d'affinité de gélatine de 200 ml préalablement équilibrée avec du tampon TE 500, pH 7.4. La colonne est ensuite rincée avec le tampon TE 500, pH 7.4. Les protéines retenues sur la colonne par affinité à la gélatine sont ensuite éluées avec le tampon TE 250, pH 7.4 (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, urée 3 M).

La solution de protéines récupérée suite à l'élution est diluée 3,5 fois dans du tampon TE (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 1 mM) afin d'abaisser la conductivité de 40 mS/cm² à environ 12 mS/cm². La solution de protéines diluée est ainsi déposée sur colonne d'affinité à l'héparine de 200 ml qui est préalablement équilibrée avec du tampon TE 75, pH 7.4 (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 75 mM). La colonne est ensuite rincée à l'aide du tampon TE 75, pH 7.4 et les protéines sont éluées avec du tampon TE 500, pH 7.4.

La fraction de protéines récoltée suite à l'élution de la colonne héparine est ensuite déposée sur une deuxième colonne d'affinité à la gélatine de 100 ml. Cette dernière étape est réalisée dans les mêmes conditions que pour la première colonne d'affinité à la gélatine et permet de concentrer la protéine.

La fraction de fibronectine pure récupérée à la fin de la dernière étape de purification sur colonne de gélatine est immédiatement dialysée à +8°C contre trois bains de 4 litres en tampon HEPES 10 mM (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid, BDH laboratories), pH 7.4.

La solution de fibronectine purifiée est filtrée à travers une membrane de 0.22µm sous PSM et conservée stérilement à +10°C dans des tubes en verre jusqu'à utilisation.

Section expérimentale

Une partie de la fibronectine est utilisée pour déterminer la concentration par absorbance à 280 nm. Coefficient d'extinction molaire de la fibronectine ϵ : $1,28 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Mosesson & Umfleet 1970). La pureté de la fibronectine est vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et la qualité par balayage spectral en UV-visible et fluorescence.

Cinq purifications ont été réalisées au cours de la thèse (Tableau 3). Chacune permet de récupérer en moyenne 20 mg de fibronectine par gramme de cryoprécipité ou 130 mg par litre de plasma, avec un degré de pureté supérieur à 98 %.

	Masse initiale de cryoprécipité (g)	Quantité de fibronectine purifié (mg)	Fibronectine/cryoprécipité (mg/g)
Sept-2011	22.04	404.8	18.4
Mars-2012	12.1	355.35	29.4
Sept-2012	17.38	322.27	18.5
		Moyenne	22.1 +/-6.3

	Volume de plasma initial (L)	Quantité de fibronectine purifié (mg)	Fibronectine/plasma (mg/L)
Nov-2012	1.3	166.9	128.4
Mai-2013	1.9	266.8	140.4
		Moyenne	134.4 +/-8.5

Tableau 3 : Taux de purification de la fibronectine

Le tableau du haut représente le rendement de purification de fibronectine à partir de cryoprécipité en milligramme de fibronectine par gramme de cryoprécipité. Le tableau du bas représente le rendement à partir de plasma en milligramme de fibronectine par litre de plasma.

I. B. Conditions d'assemblage de la fibronectine

La fibronectine, en tampon HEPES 10 mM et pH 7.4, est séparée en aliquote de 500 μl dans des tubes eppendorf (1.5 ml), puis, elle est chauffée à différentes températures à l'aide d'un thermomixeur, sous agitation orbitale de 600 rpm pour faciliter la rencontre et l'assemblage des molécules de fibronectine entre elles.

La réaction de polymérisation de la fibronectine est arrêtée par un refroidissement de la fibronectine à une température de +4/10°C.

Différents paramètres ont été testés pour étudier les mécanismes d'assemblage : la température, la concentration et le temps. Les expériences ont été suivies sur un intervalle de temps de 0 à 168 heures. L'effet de la température a été testé à 49, 55, 60, 65 et 70°C pour une concentration en fibronectine de 1 mg/ml. L'effet de la concentration a quant à elle été étudié à 0.25, 0.5, 0.6, 0.75, 1 et 1.25 mg/ml pour une température de 70°C.

Dans la suite du travail exposé, la fibronectine obtenue suite à la purification sera nommée fibronectine native (FNn). Après traitement à 49, 55, 60, 65 et 70°C, la fibronectine sera nommée respectivement FN49, FN55, FN60, FN65 et FN70.

NB : un volume supérieur à 500 μ l par tube mène à la formation de fibres visibles à l'œil nu. En raison d'un problème d'homogénéité, ces assemblages ne sont donc pas utilisables pour des tests de culture cellulaire. Les assemblages de fibronectine sont donc toujours réalisés dans un volume réactionnel de 500 μ l.

MISE AU POINT DES CONDITIONS D'ASSEMBLAGE

- **Assemblage de la fibronectine**

Afin de mieux élucider le processus d'assemblage des protéines, les modèles *in vitro* en absence de cellules sont des outils utiles et apportent énormément d'information sur la structure et les mécanismes de polymérisation. La plupart des études sur l'assemblage sont réalisées à partir de fragments de fibronectine. Ainsi, ce travail est focalisé sur l'assemblage de la fibronectine entière.

Les études bibliographiques ont montré que la multimérisation de la fibronectine pourrait nécessiter un dépliement de la protéine en solution. Ce dépliement de la fibronectine peut être obtenu par différentes techniques telles que l'étirement mécanique ou par ajout de dénaturant (cf. III. C.). Notre choix s'est porté sur la dénaturation thermique de la fibronectine plasmotique entière pour différentes raisons :

Afin d'éviter l'intervention de paramètres extérieurs dans le processus d'auto-assemblage, l'apport de sel, d'agent dénaturant et/ou fragments de protéine ont été exclus. L'absence de molécules annexes dans le milieu de réaction est un avantage dans l'analyse des résultats. Par exemple, les sels deviennent un problème pour les techniques biophysiques où la formation de cristaux apporte un biais, ou rend parfois inexploitable les résultats expérimentaux.

Un paramètre intéressant pour l'étude du dépliement et de l'assemblage de la fibronectine est la température. Des travaux antérieurs ont montré que la fibronectine subit des modifications de conformation avec la température (Pauthe et al. 2002). Cette propriété est donc utilisée dans cette étude pour l'auto-assemblage de la fibronectine.

- **Détermination du tampon optimal d'assemblage**

L'influence de trois solutions (eau, TRIS 10mM pH 7.4 et HEPES 10 mM pH 7.4) sur la multimérisation de la fibronectine a pu être suivie par incorporation de la thioflavine T (ThT). Cette molécule est un colorant utilisé pour la détection des fibres amyloïdes et émet de la fluorescence lorsqu'elle interagit avec la surface des feuillettes β intermoléculaires (cf. Section expérimentale, I.D.2). La ThT est ajoutée dans la solution de fibronectine et son spectre de fluorescence est mesuré entre 460 et 560 nm après excitation à 442 nm. La Figure 37 montre que la fibronectine native émet très peu de fluorescence. Par contre suite au traitement thermique, le pic de fluorescence de la ThT augmente quel que soit le tampon. Ces mises au point indiquent que la fibronectine subit des changements de conformation : formation de feuillettes β intermoléculaires permettant l'incorporation de la ThT. Ces trois solutions sont donc utilisables pour l'étude de l'agrégation de la fibronectine.

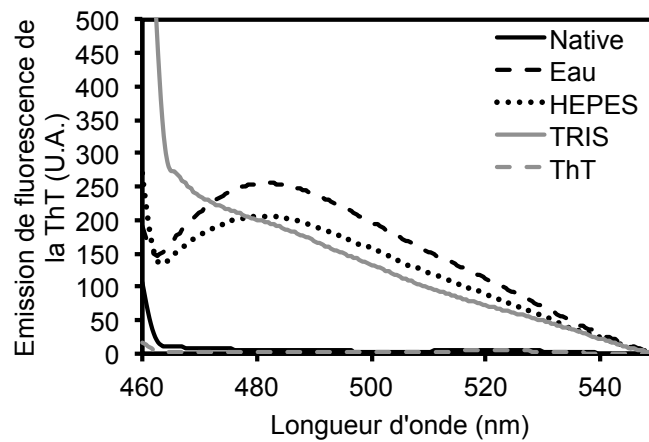


Figure 37 : Incorporation de la thioflavine T dans la fibronectine en présence de différents tampons

La fibronectine a été incubée 24h à 70°C dans l'eau 18MΩ (Eau), en tampon HEPES 10 mM pH 7.4 (HEPES) ou tampon TRIS 10 mM pH 7.4 (TRIS). Suite à l'ajout de la thioflavine T (ThT), les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés après excitation à 442 nm. Les résultats sont comparés à la fluorescence de la ThT seule (ThT) et en présence de fibronectine native (Native).

- **Contraintes liées aux perspectives d'études du comportement cellulaire**

L'étude menée incluant des analyses biochimiques, biophysiques et cellulaires, des conditions communes et compatibles aux différentes approches ont du être recherchées.

Dans un premier temps, l'effet des différentes solutions (eau, TRIS 10 mM pH 7.4, HEPES 10 mM pH 7.4) sur la viabilité des cellules SKOV3 a été étudié (Figure 38).

Suite à l'adhérence des cellules, leur viabilité est suivie sur 72h par un test colorimétrique XTT en présence de 10% de tampon, pourcentage maximal de tampon qui sera apporté avec la fibronectine dans le milieu de culture pendant les tests cellulaires. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences dans le pourcentage de cellules quelque soit le tampon utilisé. Ainsi, au pourcentage testé, ni le TRIS, ni l'HEPES, ni l'eau ne semble affecter la viabilité des cellules SKOV3. Ces trois solutions sont donc utilisables pour les tests en biologie cellulaire sans affecter la viabilité cellulaire.

Néanmoins, le pH du tampon TRIS varie en fonction de la température et peut compliquer l'interprétation des résultats et l'eau n'est pas un tampon. Ainsi, le tampon HEPES a donc été retenu pour l'étude de l'assemblage.

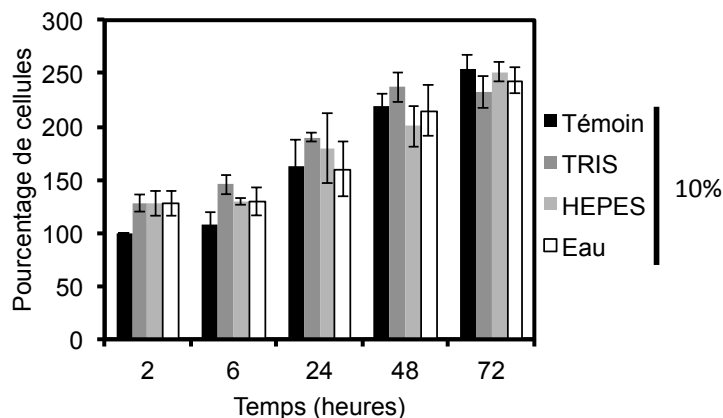


Figure 38 : Effet de différents tampons sur la viabilité des cellules SKOV3

La viabilité cellulaire a été suivie en absence (Témoin) ou en présence de 10% de tampon TRIS 10 mM (TRIS), tampon HEPES 10 mM (HEPES) ou d'eau 18MΩ (Eau). Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes en triplet +/- SEM.

- **Détermination de la vitesse d'agitation pour l'assemblage**

Suite à leur dépliement, un moyen de **favoriser la rencontre** des protéines pour faciliter l'assemblage de la fibronectine est l'**agitation**. L'influence de l'agitation orbitale pendant le dépliement a donc été testée par incorporation de la thioflavine T (ThT). La Figure 39.a montre que l'agitation de la protéine à 600 rpm provoque une augmentation du pic de fluorescence. De plus, la Figure 39.b montre que l'agitation à 300 et 600 rpm induit une augmentation du pic de fluorescence. Par contre, une agitation trop importante de 1200 rpm induit une perte de cette fluorescence. Cette perte de fluorescence est probablement due à la formation de fibres de protéines visibles à l'œil et qui sédimentent suite à l'arrêt de l'agitation.

Ainsi, la vitesse d'agitation de 600 rpm est retenue pour l'étude de l'assemblage de la fibronectine.

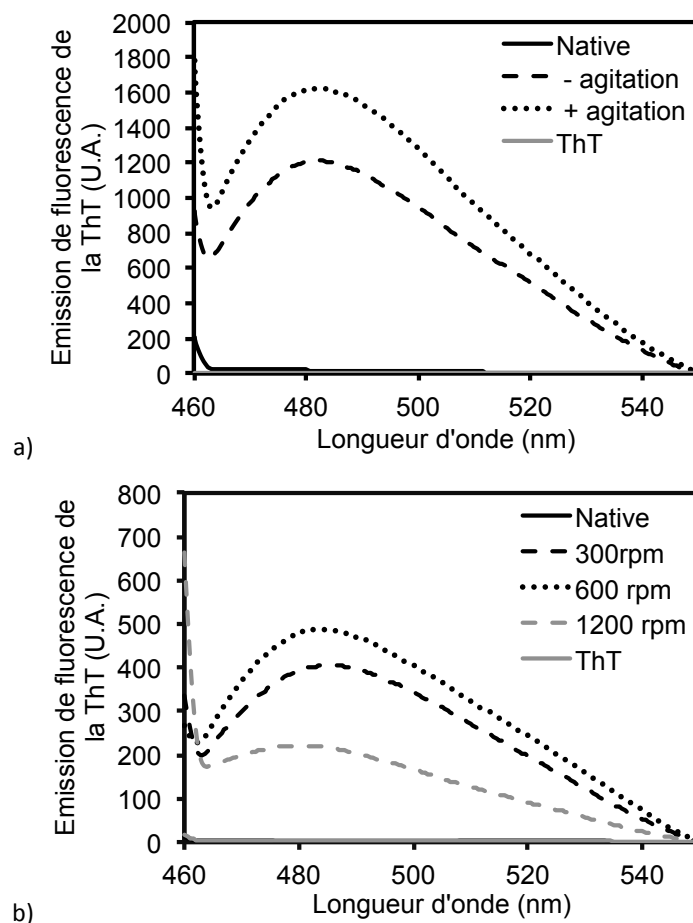


Figure 39 : Etude de l'effet de la vitesse d'agitation sur l'assemblage de la fibronectine

Suite à l'ajout de la ThT, les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés après excitation à 442 nm. Les résultats sont comparés à la fluorescence de la ThT seule (ThT) et en présence de fibronectine native (native). a) La fibronectine a été incubée 24h à 70°C avec ou sans agitation de 600 rpm. b) La fibronectine a été traitée 24h à 70°C sous agitation de 300 rpm, 600 rpm et 1200 rpm.

- **Influence de la nature du contenant sur l'assemblage**

L'étude de l'assemblage étant réalisée en tube eppendorf, il a été nécessaire de vérifier l'absence de perte de protéine sur les parois du contenant. La concentration de la fibronectine est déterminée par absorbance à 280 nm avant et après incubation à 70°C. La Figure 40 montre que la concentration de

la fibronectine après le traitement de 24h induisant l'assemblage est similaire à la concentration avant le traitement. L'étude de l'assemblage de la fibronectine est donc effectuée dans les tubes eppendorf.

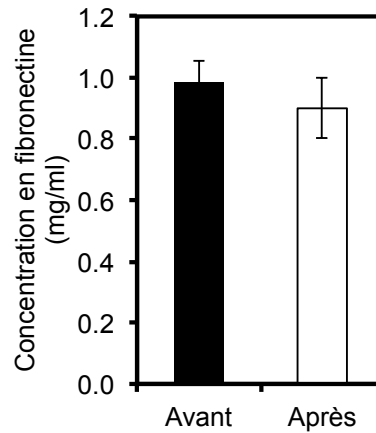


Figure 40 : Concentration de la fibronectine avant et après assemblage

La concentration de la fibronectine est déterminée par absorbance à 280 nm avant et après traitement thermique de 24h à 70°C et agitation de 600 rpm.

- **Homogénéité de pipetage des agrégats**

Suite à la formation des assemblages par la fibronectine, il a été nécessaire de vérifier le pipetage homogène des agrégats. Pour cela la fibronectine à 1 mg/ml a été incubée à 70°C, puis diluée à 100µg/ml. Suite à l'ajout de la thioflavine T (ThT), le spectre d'émission de fluorescence a été mesuré. La Figure 41 montre que les spectres d'émission de fluorescence de la ThT sont superposables pour les trois essais de dilution à 100 µg/ml, indiquant que les trois pipetages sont homogènes et suggère que la fibronectine conserve ses propriétés structurales après sa dilution.

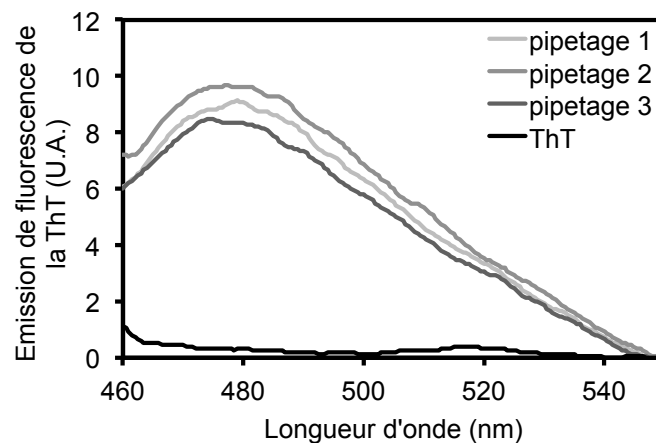


Figure 41 : Emission de fluorescence de la thioflavine T suite à la dilution de la fibronectine

La fibronectine a été incubée 24h à 70°C. A partir de la même solution de fibronectine, trois dilutions à 100 µg/ml ont été effectuées. Suite à l'ajout de la thioflavine T (ThT), les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés après excitation à 442 nm. Les résultats sont comparés à la fluorescence de la ThT seule (ThT).

I. C. Caractérisation des mécanismes et structures d'assemblage de la fibronectine

La fibronectine, immédiatement après purification ou après les différents traitements, est caractérisée.

I. C. 1. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes

Les acides aminés aromatiques constituant les protéines sont très largement utilisés dans l'étude de la structure des protéines en raison de leur capacité à émettre de la fluorescence intrinsèque. L'émission de fluorescence de ces acides aminés change en fonction de leur environnement local dans la protéine.

La fibronectine contient 78 tryptophanes (Trp), soit en moyenne 1 à 2 par modules. Lorsqu'ils sont enfouis au cœur de la fibronectine, les Trp émettent un maximum de fluorescence vers 330 nm suite à une excitation à 295 nm. Lorsqu'ils ne sont plus enfouis au cœur de la protéine, ils présentent un spectre avec un maximum d'émission au alentour de 350 nm. Ainsi, les modifications dans l'environnement de ces tryptophanes sont suivies par spectroscopie de fluorescence.

La fibronectine, traitée ou non selon les conditions citées précédemment, est diluée à 27 $\mu\text{g/ml}$ dans un volume finale de 500 μl afin d'éviter la saturation de la fluorescence. Suite à son excitation à la longueur d'onde de 295 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer LS50B), le spectre d'émission des tryptophanes est mesuré entre 310 et 410 nm avec une ouverture de fenêtre de 10 nm. Chacun des spectres correspond à la moyenne de 3 accumulations à une vitesse de scan de 200 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

I. C. 2. Test d'incorporation de la thioflavine T

La thioflavine T (ThT) est une molécule de 15 Ångstrom de longueur, constituée de deux benzènes en rotation libre autour de la liaison C-C les reliant (Figure 42). Cette molécule émet de la fluorescence lorsqu'elle se lie à la surface des feuilletts β intermoléculaires.

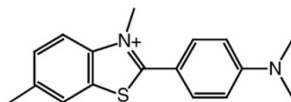


Figure 42 : Représentation de la molécule de thioflavine T

La thioflavine T possède un centre de rotation qui correspond à la liaison carbone-carbone reliant les deux cycles constituant la molécule (d'après Biancalana & Koide 2010).

Dans son état libre, la molécule de ThT présente une faible fluorescence en raison d'une extinction rapide de l'état excité. L'immobilisation de la ThT lui permet de maintenir son état excité et se manifeste sous forme d'augmentation de la fluorescence. L'augmentation de la fluorescence de la ThT semble donc due à son immobilisation dans une de ses conformations. Les feuilletts β constituant les fibres amyloïdes semblent être des structures appropriées pour verrouiller de façon stérique la ThT dans une conformation donnée (Biancalana & Koide 2010). En effet, les protéines assemblées en fibres amyloïdes forment des canaux dans lesquels des colorants linéaires peuvent se lier. La ThT semble pouvoir s'aligner de façon parallèle à l'axe long de la fibre. La ThT émet ainsi spécifiquement de la fluorescence lorsqu'elle est incorporée dans les feuilletts β intermoléculaires.

La ThT est préparée à une concentration de 100 μM dans un tampon TRIS-HCl 10 mM, pH 7.4 puis est ajoutée à la fibronectine à un ratio molaire ThT:fibronectine de 1:1. La ThT est ensuite excitée à 442nm et son spectre d'émission est suivi entre 460 et 560 nm. La ThT possède un maximum d'émission à 482 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer LS50B). L'ouverture des fenêtres est de 10nm. Chaque spectre correspond à la moyenne de 3 accumulations à une vitesse de scan de 200 nm.min⁻¹. Au-delà de 35°C, la ThT subit une réaction d'hydroxylation (Foderà et al. 2008). Pour éviter ce problème, la ThT est ajoutée à la fibronectine extemporanément à la mesure de la fluorescence et non pas pendant l'assemblage.

Avec le logiciel Origin 7.0, une équation de meilleur ajustement est appliquée aux cinétiques suivies par fluorescence de la ThT. Une simple exponentielle ne modélisant pas correctement les cinétiques, une double exponentielle a été appliquée :

$$y = A + A_1(1 - e^{-k_1x}) + A_2(1 - e^{-k_2x})$$

avec y l'intensité de fluorescence de la ThT au temps t , A la fluorescence de la ThT au temps $t=0$, A_1 et A_2 l'intensité de fluorescence de la ThT au plateau pour les deux exponentielles, k_1 et k_2 la constante de vitesse d'augmentation de la fluorescence de la ThT pour les deux exponentielles en h⁻¹.

- **Mise au point du ratio thioflavine T : fibronectine**

Pour obtenir le meilleur signal de fluorescence de la thioflavine T (ThT), différents ratios molaires fibronectine:ThT (FN:ThT) ont été testés pour différentes concentrations de fibronectine native ou assemblée à 70°C (Figure 43.a).

Pour le ratio FN:ThT de 5:1 et à la concentration en fibronectine de 1 mg/ml, l'intensité de fluorescence de la ThT est élevée. Néanmoins, la fluorescence est très faible pour les concentrations inférieures en fibronectine de 100 et 25 $\mu\text{g/ml}$.

L'intensité de fluorescence augmente avec la concentration en ThT pour les faibles concentrations de fibronectine. Le signal de fluorescence pour les concentrations faibles en fibronectine est détectable à partir du ratio FN:ThT de 2:1. Cependant, on observe une saturation de la fluorescence à 1000 U.A. pour la concentration en fibronectine de 1 mg/ml.

En raison de la saturation du signal à 1 mg/ml de fibronectine, le ratio molaire de 1:1 est retenu afin d'avoir une molécule de thioflavine T par molécule de fibronectine. Aux concentrations de fibronectine élevées, il faudra réaliser des dilutions intermédiaires pour obtenir un signal correct.

La Figure 43.b représente l'intensité de fluorescence de la ThT en fonction de différentes concentrations en fibronectine pour un ratio FN:ThT de 1:1. Les résultats montrent que, malgré les dilutions intermédiaires pour les concentrations en fibronectine supérieures à 500 $\mu\text{g/ml}$, l'intensité de fluorescence de la ThT est proportionnelle à la concentration en fibronectine.

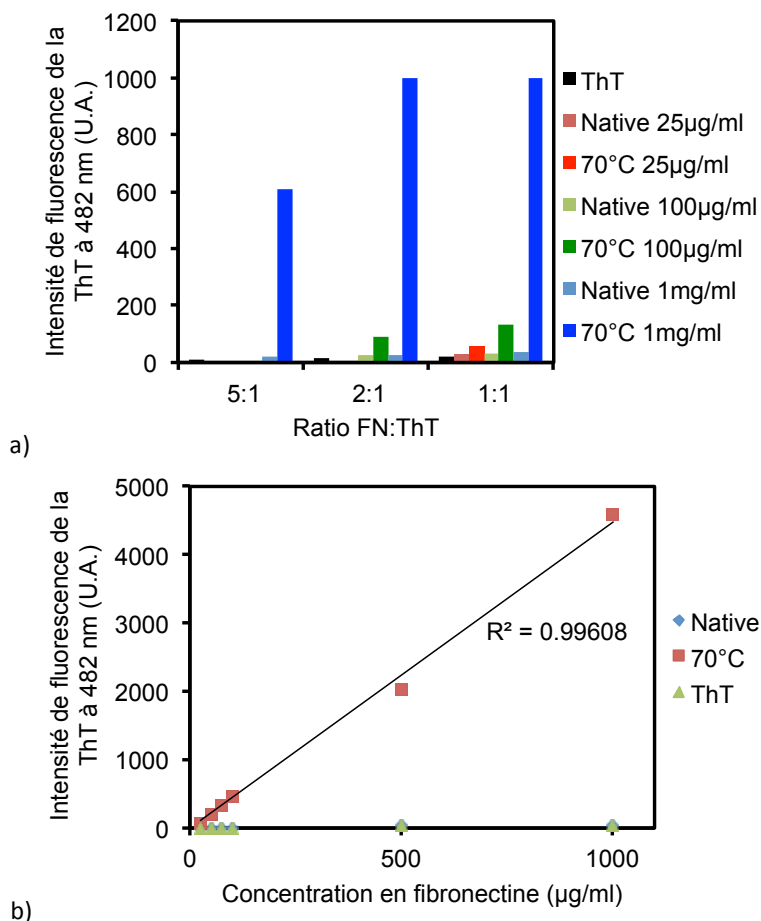


Figure 43 : Intensité de fluorescence de la thioflavine T

L'intensité de fluorescence de la thioflavine T seule (ThT), en présence de fibronectine native (Native) ou assemblée à 70°C pendant 24h (70°C) a été mesurée à 482 nm suite à son excitation à 442 nm. a) Relation entre l'intensité de fluorescence de la thioflavine T et le ratio FN:ThT mesurée en présence de 25, 100 ou 1000 µg/ml de fibronectine native ou assemblée à 70°C. b) Relation entre l'intensité de fluorescence de la thioflavine T et la concentration en fibronectine native ou assemblée à 70°C en présence d'un ratio FN:ThT de 1:1.

I. C. 3. Test à l'acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique

L'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique) (Figure 44) est une molécule qui émet de la fluorescence lorsqu'elle interagit spécifiquement avec les zones ou cavités hydrophobes exposées au solvant. Cette molécule à très faible rendement quantique à l'état libre, présente une augmentation de fluorescence lorsqu'elle est liée aux patchs hydrophobes dans la protéine assemblée, mais présente également un déplacement de son pic d'émission de 520 nm à 480 nm.

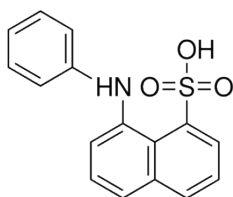


Figure 44 : Représentation de l'acide 8-anilino-1-naphtalènesulfonique

L'ANS est préparé à une concentration de 100 μM dans l'eau puis est ajouté à la fibronectine à un ratio molaire ANS:fibronectine de 1:1. L'ANS est ensuite excité à 350 nm et son spectre d'émission mesuré entre 400 et 600 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer LS50B). Les ouvertures de fente sont de 10 nm. Chacun des spectres correspond à la moyenne de 3 accumulations à une vitesse de scan de 200 nm.min⁻¹.

I. C. 4. Microscopie à force atomique en milieu liquide

Les acquisitions par microscopie à force atomique en milieu liquide ont été réalisées par les Docteur Thomas Boudou et Charlotte Vendrely au Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP) à Grenoble.

Le microscope à force atomique (*atomic force microscope*, AFM) est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon allant de quelques nanomètres à quelques microns de largeur. Cette technique est basée sur l'analyse d'un objet point par point. Le microscope balaye la surface de l'échantillon à l'aide d'une pointe très fine de quelques micromètres de long reliée à un cantilever. L'AFM peut être utilisé selon différents modes dont les deux les plus courants sont : le mode contact et le mode contact intermittent (*tapping*). Dans le mode contact, la pointe appuie sur la surface de l'échantillon puis est repoussée en raison des forces répulsives entre les électrons de la pointe et l'échantillon. Cette répulsion permet de garder une distance constante entre la pointe et l'échantillon et donne ainsi une information sur la hauteur et les charges de l'échantillon. Dans le mode contact intermittent, le cantilever vibre à une certaine fréquence et amplitude (Figure 45). Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude de la vibration diminue et donne des informations sur la hauteur et la rigidité de l'échantillon. La topographie de surface est déterminée par le mouvement de la pointe à la surface de l'échantillon qui est directement corrélé à la déviation d'un faisceau laser qui est réfléchi sur le cantilever. Dans notre étude, le mode contact intermittent est utilisé.

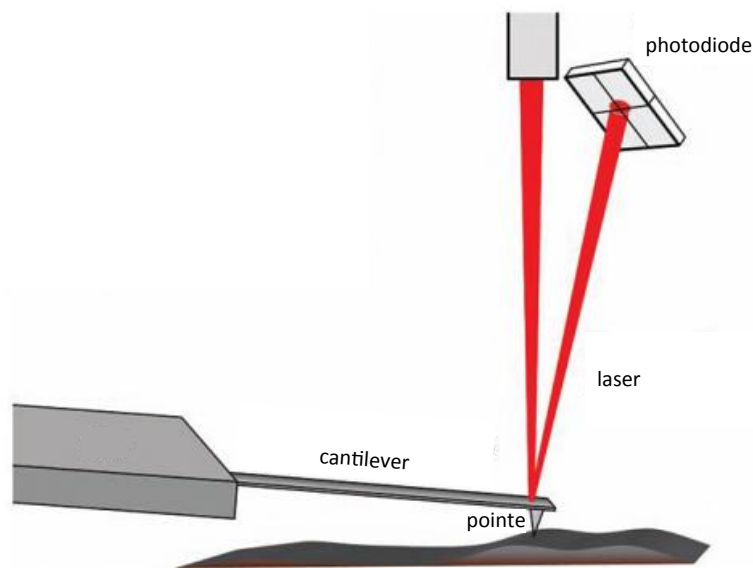


Figure 45 : Représentation du microscope à force atomique
(d'après Haugstad 2012)

Des lamelles de 32 mm de diamètre sont nettoyées par incubation quelques minutes dans du NaOH 1 M puis sont rincées à l'eau 18 mΩ. En plaque six puits, les lamelles sont ensuite incubées une nuit à +4°C avec 1 ml de fibronectine native ou assemblée à 70°C à 1 mg/ml en tampon HEPES 10 mM, pH 7.4. Les lamelles sont imagées au microscope à force atomique en présence de tampon HEPES 10mM (pour éviter le séchage de l'échantillon) à l'aide d'une sonde MSNL-10, à 10-15 kHz et $k = 0.070$ N/m. Les images d'AFM ont été acquises en milieu liquide afin d'éviter les modifications de structure et de densité engendrées suite au séchage dans le cas de l'AFM classique en milieu sec.

I. C. 5. Infrarouge à Transformée de Fourier

Les mesures par infrarouge à Transformée de Fourier ont été réalisées au sein de l'Institut Pasteur de Paris et au Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP) de Grenoble.

L'infrarouge à Transformée de Fourier permet d'analyser la composition en structures secondaires et l'environnement des acides aminés aromatiques des protéines. Cette technique est basée sur la mesure de la fréquence de vibration (élongation ou flexion) des liaisons entre les différents atomes d'une molécule suite à une excitation par rayonnement infrarouge. Les facteurs influençant les fréquences de vibration d'une liaison sont la masse des atomes, leur arrangement géométrique et les forces interatomiques provenant des distorsions de la liaison.

Dans le cas des protéines, les fréquences de vibration de la liaison C=O de la chaîne principale sont mesurées entre 1600 et 1700 cm^{-1} et correspondent à la bande amide I. Ces liaisons C=O sont impliquées dans la stabilisation des structures secondaires. Dans le cas des molécules biologiques telles que les protéines, cette technique permet donc de détecter les structures secondaires (hélice α , feuillet β) présentes dans les molécules en solution.

Entre un et trois millilitres de fibronectine à environ 10-20 mg/ml après purification sont dessalés sur amikon par trois centrifugations successives en présence de 15 ml de tampon HEPES-D₂O (HEPES préparé dans l'oxyde de deutérium). L'oxyde de deutérium permet de diminuer le bruit de fond sur les spectres. En effet, celui-ci absorbe moins le rayonnement infrarouge aux alentours de la bande amide I que l'eau H₂O (Venjaminov SYu & Prendergast 1997). Une partie de cette fibronectine est ensuite traitée selon les conditions décrites dans le paragraphe I.C : assemblée 24h à 70°C sous agitation orbitale de 600rpm. Les spectres ont été mesurés entre 4000 et 400 cm^{-1} grâce à un spectrophotomètre Vertex 70 ou Jasco 6100. Les spectres correspondent à une moyenne de 1024 accumulations d'une résolution de 2 cm^{-1} .

I. C. 6. Dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (CEA de Grenoble).

Le dichroïsme circulaire est une technique qui repose sur la capacité des molécules à absorber la lumière. Une onde lumineuse est transformée en onde polarisée linéaire grâce à un polarisateur puis en deux ondes elliptiques polarisées à 90° l'une de l'autre, dite droite et gauche, par une lame biréfringente. Lorsque les ondes elliptiques rencontrent une solution qui absorbe (optiquement active), l'ellipticité varie. Il est possible de mesurer la variation de cette ellipticité en millidegrés. L'ellipticité est différente en fonction de la molécule étudiée et de la longueur d'onde. Dans le cas

des molécules biologiques, cette technique permet d'étudier l'environnement des tryptophanes en UV proche et de détecter en UV lointain les structures secondaires présentes dans les molécules. Chaque structure secondaire identifiée dans les molécules biologiques (hélice α , feuillet β et random coil) présente un spectre d'ellipticité spécifique. L'hélice α présente deux pics négatifs caractéristiques à 207 et 223 nm, le feuillet β a un pic négatif à 217 nm et le random coil a un pic positif à 212 nm (Figure 46).

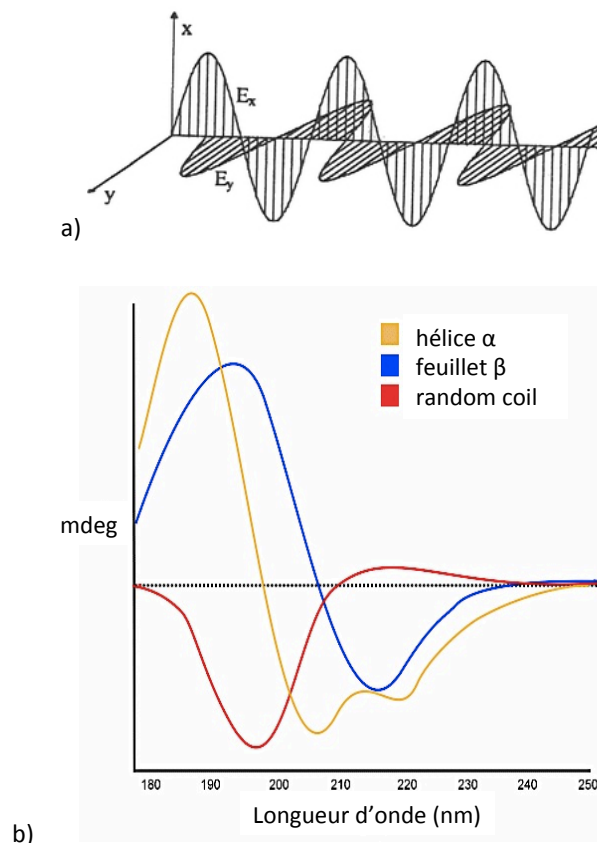


Figure 46 : Principe du dichroïsme circulaire

a) Représentation schématique de la transformation d'une onde polarisée en ondes elliptiques. b) Spectres de dichroïsme circulaire en UV lointain des hélices α , feuillets β et random coil (d'après <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/index.php> et <http://www.proteinchemist.com/cd/cdspec.html>).

Les mesures de spectre sont réalisées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco J-810 équipé d'un contrôleur de température. Chaque spectre correspond à une moyenne de 10 accumulations, une vitesse de scan de $200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, une ouverture de fenêtre de 4 nm et un temps de réponse de 1 seconde. Les spectres présentés sont les résultats obtenus après calcul de l'ellipticité $[\theta]$:

$$[\theta] = \frac{0.1 \times \theta}{C \times N \times l}$$

avec $[\theta]$ l'angle de polarisation en millidegrés, C la concentration en mol/l, N correspondant au nombre de résidus dans la fibronectine (soit 4 710 résidus), et l correspondant au trajet optique en cm (0.1 ou 1 cm).

I. C. 6. a. Spectre de la fibronectine en UV proche

La fibronectine est préparée selon les conditions décrites précédemment à différentes températures et à une concentration de 3 mg/ml en tampon HEPES 10 mM, pH 7.4. Les mesures de spectre sont réalisées dans des cuves en quartz de 1 mm entre 260 et 320 nm et une vitesse de scan de 200 nm.min⁻¹.

I. C. 6. b. Spectre de la fibronectine en UV lointain

La fibronectine est préparée selon les conditions décrites précédemment à différentes températures et à une concentration de 1 mg/ml puis dilué à 50 µg/ml en tampon HEPES 10 mM, pH 7.4. Les mesures de spectre sont réalisées dans des cuves en quartz de 1 mm entre 190 et 250 nm et une vitesse de scan de 200 nm.min⁻¹.

I. C. 6. c. Dénaturation thermique suivie en UV lointain

La dénaturation thermique de la fibronectine a été suivie en UV lointain à une longueur d'onde de 227 nm dans une cuve en quartz de 1 cm et sous agitation de 90 rpm avec barreau aimanté. Le dépliement de la fibronectine à une concentration de 50 µg/ml en tampon HEPES 10mM, pH 7.4 est mesuré entre 20 et 80°C avec une augmentation de 1°C par minute à l'aide d'un contrôleur de température. Le repliement de la fibronectine est suivi immédiatement après le dépliement entre 80 et 20°C avec une diminution de la température de 1°C par minute.

I. C. 7. Spectrométrie de masse à ionisation par électrobuliseur et par détection de charge (ESI-CDMS)

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées par le Docteur Tristan Doussineau à l'Institut Lumière Matière de Lyon.

La spectrométrie de masse permet de déterminer la masse et la charge des protéines à partir de la vitesse et la force avec lesquelles les protéines sont projetées dans le vide. Les atomes des protéines sont ionisés pour les charger positivement puis sont accélérés de sorte qu'ils aient tous la même énergie cinétique. Suite à l'ionisation et l'accélération, les ions des protéines sont soumis à un champ magnétique contrôlé afin de dévier leur trajectoire. Plus les ions sont déviés de leur trajectoire, plus la masse de l'ion est faible. La variation de la trajectoire dépend également de la quantité de charge positive sur les ions. Plus la charge est importante, plus la déviation de la trajectoire est importante. Ces deux paramètres permettent donc d'avoir un ratio masse/charge (m/z).

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse à ionisation par électrospray et détection de masse dédié aux protéines de très haute masse moléculaire (Doussineau, Bao, et al. 2011). A travers un capillaire en acier inoxydable de 0.1 mm de diamètre interne, la solution de fibronectine à 1 mg/ml est injectée à 150 µl/h dans la chambre à électrospray. L'azote en gaz est injecté pour traverser un système de chauffage à 200°C et les ions sont passés dans un système sous vide. L'appareil de détection des charges est utilisé en mode *single pass* et a été construit selon le modèle de Keaton et Stradling (Keaton et al. 1990). Le signal récupéré par un transistor JFET est

amplifié par un pré-amplificateur sensible de charge et à faible bruit. Le signal est ensuite mis en forme et différencié par un amplificateur construit sur mesure. Le signal est enregistré pour chaque ion traversant le détecteur avec un taux d'échantillonnage de 10 MHz. Les résultats sont transférés vers un ordinateur qui permet d'analyser la charge et la masse de chaque ion. La calibration interne en charge est réalisée à l'aide d'un capaciteur de test qui permet à une quantité de charge connue d'être propulsée sur le tube collecteur. La calibration externe est effectuée en utilisant un des marqueurs de taille standard NIST (nanosphères de polystyrène de 70, 100, 150, 200, 250, 300 nm fournies par Polysciences Europe, GmbH). L'histogramme de masse est construit à partir de l'ensemble d'un nombre N statistiquement pertinent pour chaque mesure de masse et pour chaque échantillon (N > 5000).

I. C. 8. Électrophorèse - Coloration au bleu de Coomassie

Suite aux différents traitements thermiques, l'état de la fibronectine est contrôlé par séparation sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE contenant 7% de bis-acrylamide suivie d'une révélation au bleu de Coomassie.

Les quantités de protéines séparées sont de 10 µg. En conditions réductrices, les échantillons sont mélangés avec 15% de β-mercaptoéthanol. La séparation se fait en présence de tampon de migration pendant environ 1 heure à 20 mA par gel. Le gel est ensuite incubé 30 minutes dans une solution de fixation permettant la fixation des protéines, suivie de trois rinçages de 10 minutes dans l'eau. Le gel est coloré 30 minutes dans une solution de bleu de Coomassie G. Les bandes de protéines sont révélées par des lavages successifs avec une solution de décoloration.

<i>Tampon de migration :</i> <ul style="list-style-type: none">• TRIS-HCl 25 mM, pH 8.3• Glycine 200 mM• SDS 0.1 %	<i>Bleu de Coomassie G :</i> <ul style="list-style-type: none">• Bleu Coomassie 2.5 % (m/v)• Éthanol 40 %• Acide acétique 7 %
<i>Solution de fixation :</i> <ul style="list-style-type: none">• Éthanol 45 %• Acide acétique 10 %	<i>Solution de décoloration :</i> <ul style="list-style-type: none">• Éthanol 20 %• Acide acétique 10 %

II. ÉTUDE DES FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA FIBRONECTINE

II. A. Cultures cellulaires

Les cellules SKOV3 (cellules humaines d'adénocarcinome ovarien) sont maintenues en culture dans du milieu RPMI 1640 contenant 1% de bicarbonate de sodium et 10% de sérum de veau fœtal, à 37°C et 5 % de CO₂.

Les cellules CHO K1 (cellules d'épithélium ovarien de hamster chinois) sont cultivées en milieu HAM12 contenant 10% de sérum de veau fœtal, à 37°C et 5 % de CO₂. Ces cellules ne produisent pas, ou très peu de fibronectine, mais sont capables de la remanier.

Les fibroblastes BJ (fibroblastes de prépuce humain) sont maintenus en culture dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtale, à 37°C et 5 % de CO₂.

II. B. Cytotoxicité des tampons sur les cellules

Les solutions testées sont le TRIS 10 mM pH 7.4, HEPES 10 mM pH 7.4, l'eau 18 MΩ. Les cellules SKOV3 sontensemencées à la densité de 30 000 cellules/cm² en plaque 96 puits pendant une nuit en milieu complet. Ces cellules sont ensuite incubées en milieu RPMI 1640 contenant 0.5% de SVF et 10% de tampon. Leur prolifération est suivie sur 72 h à 37°C et 5% de CO₂. A 2, 6, 24, 48 et 72h, la viabilité des cellules est déterminée par un test au XTT. Le kit est utilisé au dixième dans du milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol.

II. C. Cytotoxicité de la fibronectine

Les cellules SKOV3 sontensemencées à la densité de 30 000 cellules/cm² en plaque 96 puits pendant une nuit en milieu complet. Ces cellules sont ensuite incubées en milieu RPMI 1640 contenant 0.5% de SVF et 25, 50, 75 ou 100 µg/ml de fibronectine native ou assemblée comme décrit par Huang & al (Huang et al. 2010). La viabilité cellulaire est déterminée à 18 et 48 heures de culture par un test au XTT. Le kit est utilisé au dixième dans du milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol.

II. D. Accessibilité des sites de liaison de la fibronectine à ses partenaires

II. D. 1. Accessibilité des sites d'affinité à la gélatine

500 µl de billes de gélatine-sepharose (GE healthcare) sont équilibrés avec du tampon HEPES 10 mM, pH 7.4. 400 µg de fibronectine native ou assemblée sont ajoutés aux billes et incubés 30-45 minutes avec une agitation toutes les 15 minutes. Après sédimentation des billes de gélatine-sépharose, le surnageant est récupéré. Afin d'éliminer la fraction restante de fibronectine **non-liée** à la gélatine, les billes sont rincées par trois lavages successifs avec du tampon HEPES 10 mM, pH 7.4. Les solutions de rinçage sont récupérées et la fraction de fibronectine **non-liée** à la gélatine est déterminée par absorbance à 280 nm. La fraction de fibronectine **liée** à la gélatine est calculée par soustraction de la quantité de fibronectine **non-liée** à la quantité de fibronectine initialement utilisée (400 µg).

II. D. 2. Dosage immunoenzymatique de l'accessibilité de la séquence RGD (ELISA)

L'accessibilité du site RGD a été estimée par test ELISA. L'anticorps polyclonal de lapin anti-fibronectine humaine est utilisé comme anticorps de capture (f3648, Sigma). 50 µl de solution d'anticorps diluée à 5 µg/ml en tampon de revêtement sont déposés pendant une nuit à +4°C. Suite à trois rinçages de 200 µl avec du tampon de lavage, les puits sont incubés 1 heure à température ambiante avec 200 µl de tampon de saturation. Les puits sont rincés avec 200 µl de tampon de lavage avant d'être incubés 2 heures à température ambiante en présence de 0.675 à 5 ng de fibronectine (50 µl) diluée dans du tampon de lavage. Les puits sont de nouveau rincés trois fois avec

Section expérimentale

200 µl de tampon de lavage et placés 10 minutes à température ambiante avec 200 µl de tampon de saturation. Les puits sont ensuite incubés 1 heure 30 minutes à température ambiante en présence de 50 µl de l'anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre la séquence RGD de la fibronectine humaine (MAB1926, Millipore, dilué au 1/1000 dans du tampon de saturation). Les puits sont de nouveau rincés trois fois avec 200 µl de tampon de lavage et saturés 10 minutes à température ambiante avec 200 µl de tampon de saturation. Les puits sont ensuite incubés 1 heure en présence de 50 µl de l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/2500 dans du tampon de saturation (a5324, Sigma). Après les trois derniers rinçages avec 200 µl de tampon de lavage, les puits sont enfin incubés 30 minutes à 37°C en présence de 100 µl de pNPP à 1mg/ml en tampon diéthanolamine, pH 9.8. La lecture d'absorbance se fait à 405 nm pour ensuite calculer le pourcentage théorique d'accessibilité des sites RGD des différents états de la fibronectine par rapport à la fibronectine dans son état natif.

L'accessibilité des séquences RGD de la fibronectine traitée dans les différentes conditions a été calculée par rapport à la fibronectine native selon la formule :

$$\%RGDA = \frac{AbsFNtraitée \times 100}{AbsFNnative}$$

avec %RGDA le pourcentage de RGD dans la fibronectine assemblée capturée, *AbsFNtraitée* l'absorbance à 405 nm de la fibronectine assemblée, *AbsFNnative* l'absorbance à 405 nm de la fibronectine native.

<i>Tampon de revêtement, pH 9.6 :</i> <ul style="list-style-type: none">• Bicarbonate de sodium 0.1 M• Carbonate de sodium 0.1 M	<i>Tampon diéthanolamine, pH 9.8 :</i> <ul style="list-style-type: none">• Diéthanolamine 1 M• Chlorure de magnésium 0.5 mM
<i>Tampon de lavage (TTBS) :</i> <ul style="list-style-type: none">• TRIS-HCl 10 mM pH 7.4• NaCl 150 mM• Tween-20 0.1 %	<i>Tampon de saturation :</i> <ul style="list-style-type: none">• TRIS-HCl 10 mM pH 7.4• NaCl 150 mM• Tween-20 0.1 %• BSA 1 %

II. E. Test d'adhérence sur coating ou avec apport exogène de fibronectine

Les tests d'adhérence des cellules SKOV3 sont effectués sur **coating de fibronectine** native ou assemblée. La fibronectine native ou assemblée est coatée à 0, 1, 5 ou 10 µg/ml en plaque 96 puits pendant 2 heures à 37°C. Les puits sont saturés avec 100 µl de tampon PBS-BSA 1% pendant 30 minutes à 37°C. Après rinçage avec du tampon d'adhérence (RPMI 1640-BSA 0.2%), les cellules SKOV3, décollées au PBS-EDTA 0.5 mM, sont ensemencées à la densité de 150 000 cellules/cm² pendant 15 minutes en tampon d'adhérence.

Les tests d'adhérence ont également été réalisés avec **apport exogène de fibronectine**. Les cellules sont décrochées au PBS-EDTA 0.5 mM puis diluées à 1 million de cellules/ml de milieu RPMI

1640 contenant 0, 1, 5 ou 10 µg/ml de fibronectine. Les cellules sontensemencées à la densité de 150 000 cellules/cm² en plaque 96 puits et sont cultivées pendant 1 heure à 37°C et 5% de CO₂.

Pour les deux tests d'adhérence, les puits sont ensuite rincés trois fois au RPMI 1640 contenant 0.2% de BSA. Puis les cellules sont fixées 10 minutes à la glutaraldéhyde (1% dans l'eau) et marquées 30 minutes au crystal violet (0.1% dans l'eau, C0775, Sigma Aldrich). Après rinçage à l'eau, les cellules sont lysées 10 minutes avec 50 µl de SDS (1% dans l'eau). Les témoins positifs et négatifs correspondent respectivement à l'adhérence des cellules sur le plastique de culture et sur revêtement de BSA 1%.

II. F. Etalement cellulaire sur coating ou avec apport exogène de fibronectine

Les tests d'étalement des cellules SKOV3 sont effectués sur **coating de fibronectine** native ou assemblée. La fibronectine à 50 µg/ml est coatée sur lamelles de verre pendant 2 heures à 37°C. Les puits sont saturés avec du tampon PBS-BSA 1% pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sontensemencées à la densité de 10 000 cellules/cm² en milieu RPMI 1640-BSA 0.2% pendant 24 heures à 37°C et 5% de CO₂. Suite au rinçage en milieu RPMI 1640, les cellules sont fixées 30 minutes au paraformaldéhyde 3%.

Les tests d'étalement ont également été réalisés avec **apport exogène de fibronectine**. Les cellules sontensemencées à raison de 10 000 cellules/cm² en milieu complet. Après adhérence pendant 6 heures, les cellules sont rincées deux fois au RPMI 1640 et privées de sérum une nuit en milieu RPMI 1640. Suite à deux rinçages en RPMI 1640, les cellules sont incubées 6h en milieu RPMI 1640 supplémenté de 2.5% de SVF et 25 µg/ml de fibronectine. Les cellules sont ensuite fixées 30 minutes au paraformaldéhyde 3%.

Pour les deux tests d'étalement, les structures cellulaires - cytosquelette d'actine et noyau - sont respectivement visualisées suite à un marquage à la phalloïdine et au DAPI par microscopie confocale (LSM 710, Zeiss).

Dans le cas de l'étalement avec apport exogène de fibronectine, l'aire et le périmètre des cellules ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ. Ces deux paramètres permettent de déterminer l'indice de forme de la cellule (cell shape index, CSI) (Thakar et al. 2009; Xu et al. 2012) selon la formule :

$$CSI = \frac{4\pi A}{P^2}$$

avec *CSI* l'indice de forme de la cellule, *A* l'aire de la cellule et *P* le périmètre de la cellule. Un indice de 1 indique que la cellule a une forme circulaire et étalée, un indice de 0 correspond à une forme allongée.

II. G. Analyse de la migration cellulaire

Les tests de migration sont réalisés à l'aide d'inserts formés de deux compartiments séparés par un espaceur en silicone (IBIDI). Les cellules sontensemencées à confluence à la densité de 12 000 cellules dans chacun des compartiments de l'insert. Les cellules adhèrent 24 heures en milieu

complet, à 37°C et 5% de CO₂. Après avoir retiré l'insert, les cellules sont rincées deux fois au RPMI 1640 puis sont cultivées avec du milieu RPMI 1640 supplémenté de 2.5% de SVF et 25 µg/ml de fibronectine native ou assemblée. Le déplacement des cellules est ensuite suivi par vidéomicroscopie à 37°C et 5% de CO₂. Le système de vidéomicroscopie permet d'acquérir des images toutes les 30 minutes pendant 24 heures. L'analyse des vidéos de migration est réalisée avec le logiciel ImageJ.

Six paramètres sont déterminés à partir des vidéos de migration cellulaire : le pourcentage de comblement de la blessure par les cellules, le profil de migration des cellules, la distance parcourue moyenne, la vélocité des cellules, la persistance et l'angle de déplacement des cellules (Arboleda-Estudillo et al. 2010; Wood et al. 2012; Greciano et al. 2012).

Les photos acquises toutes les 30 minutes permettent de mesurer l'aire de l'espace sans cellules au cours du temps. Le calcul de l'aire permet ainsi de déterminer le pourcentage de comblement de la blessure par les cellules au cours du temps.

Les photos acquises permettent également de suivre le déplacement des cellules et d'obtenir les coordonnées (x ; y) pour chaque cellule à chaque temps d'acquisition. Ces coordonnées (x ; y) permettent de retracer le chemin de déplacement des cellules dans le plan. Ces coordonnées (x ; y) permettent ainsi de calculer la distance parcourue par les cellules en 24 heures selon la formule :

$$d = \sqrt{(x_b - x_a)^2 + (y_b - y_a)^2}$$

avec d la distance parcourue entre deux temps, x_a et y_a les coordonnées (x ; y) au temps t , et x_b et y_b les coordonnées (x ; y) au temps $t + 30$ minutes.

Le calcul des distances parcourues permet de calculer la vélocité de déplacement des cellules selon la formule :

$$v = \frac{d}{t}$$

avec v la vélocité de déplacement des cellules, d la distance parcourue entre deux temps et t le temps mis pour parcourir la distance d .

La persistance dans le déplacement des cellules est calculée selon la formule :

$$p = \frac{d_c}{d}$$

avec p la persistance du déplacement des cellules, d la distance totale parcourue entre deux temps, et d_c la distance la plus courte pour parcourir la distance d . Un indice de persistance de 1 indique que pour atteindre son point de destination finale, la cellule a emprunté un chemin en ligne droite, alors qu'un indice proche de 0 indique que la cellule a emprunté un chemin avec des détours plus importants plutôt que de prendre le chemin le plus court en ligne droite.

Le profil de déplacement des cellules permet également de déterminer le nombre de cellules ayant migré entre 0-20, 20-40, 40-60 et 60-90°. Il est considéré ici que si la cellule se déplace tout droit vers l'avant, l'angle de déplacement est de 0° ; mais si elle se déplace à 90° sur sa droite ou sa gauche, l'angle de déplacement est de 90°.

Au moins 35 cellules sont suivies par condition. Les cellules ne restant pas dans le champ de vision du microscope, qui se divisent ou entrent en apoptose au cours de l'acquisition sont exclues de l'analyse.

II. H. Pulse-chasse des intégrines lors de la migration

Les cellules SKOV3 sont ensemencées à la densité de 40 000 cellules/cm². Après 24 heures d'adhérence, une blessure est réalisée dans le tapis cellulaire à l'aide d'un cône de 5 ml. Le tapis cellulaire est ensuite rincé deux fois au RPMI 1640. Puis, les cellules sont incubées 3 heures avec 400 µl de milieu RPMI 1640 supplémenté de 2.5% de SVF et 25 µg/ml de FN native ou assemblée. Le milieu est ensuite récupéré et conservé à 37°C. Les cellules sont rincées deux fois au RPMI 1640 puis incubées 30 minutes en présence de 200 µl de l'anticorps anti-intégrine β1 (MAB1965, Millipore) ou anti-intégrine αv (sc-9969, Santa Cruz) dilué au 1/50 dans du milieu RPMI 1640. Les anticorps sont retirés, les cellules sont rincées deux fois au RPMI 1640 puis sont remises à incuber 6 heures avec les 400 µl de milieu RPMI 1640 préalablement conservés à 37°C et contenant 2.5% de SVF et 25 µg/ml de fibronectine. Les cellules sont ensuite fixées et marquées avec l'anticorps secondaire couplé à un alexa fluor (A21424, Invitrogen) et au DAPI.

II. I. Incorporation matricielle de la fibronectine

Les cellules SKOV3, BJ et CHO K1 sont ensemencées respectivement à la densité de 40 000, 50 000 et 80 000 cellules/cm² pendant une nuit. Puis les tapis cellulaires sont rincés avec les milieux seuls respectifs.

Dans le cas des cellules SKOV3, les cellules sont incubées 6 heures en présence de 400 µl de milieu complet supplémenté de 50, 100 et 500 µg/ml de fibronectine native ou assemblée. Les fibroblastes BJ sont quant à elles cultivées 24 heures dans du milieu contenant 2.5% de SVF et 25 µg/ml de fibronectine et les cellules CHO K1 sont cultivées 48 heures dans du milieu seul contenant 50 µg/ml de fibronectine.

L'incorporation de la fibronectine dans le réseau de matrice extracellulaire formé par les cellules est vérifiée par marquage fluorescent avec l'anticorps dirigé contre la fibronectine, au DAPI et à la phalloïdine.

II. J. Protocole de marquage des cellules

Dans les expériences nécessitant un marquage, les cellules sont fixées aux PFA 3 % pendant 15-30 minutes. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et perméabilisées 2 minutes avec du PBS-triton 0,1 %. Le tapis cellulaire est saturé 30 minutes au PBS-BSA 1% puis incubé 45 minutes en chambre humide en présence de 25 µl d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt (dilué au 1/50 dans du PBS-BSA 1%). Suite à 3 rinçages au PBS-BSA 1%, les lamelles sont incubées 45 minutes en chambre humide en présence de 25 µl de l'anticorps secondaire (dilué au 1/50 dans du PBS-BSA 1%). Les cellules sont ensuite de nouveau rincées 3 fois au PBS puis incubées pendant 30 minutes avec 25 µl de phalloïdine couplée à la fluorescéine afin de marquer l'actine-F (diluée à 10 µg/ml dans du PBS-BSA 1%, p5282, Sigma). La phalloïdine est rincée 3 fois au PBS puis les cellules sont incubées 30

minutes avec 25 µl de DAPI pour marquer l'ADN (dilué à 0,33 µg/ml dans du PBS-BSA 1%). Après 5 rinçages au PBS et un rinçage rapide à l'eau 18 mΩ pour éliminer les sels, les lamelles sont montées sur lame avec 5 µl de Prolong Gold (P36930, Invitrogen). Les marquages sont ensuite observés par microscopie confocale (LSM 710, Zeiss).

II. K. Statistiques

Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes. Les résultats représentent la moyenne des expériences +/- SEM. Le test de student (t.student) permet de déterminer la significativité entre les résultats : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.005$.

REFERENCES DES PRODUITS

Références des kits :

Produits	Références
AP-color	Biorad, Munich, Allemagne
XTT	Cell proliferation Kit II, Roche, France

Références des anticorps pour western blot :

Cible	Hôte	Type	Dilution	Références
Fibronectine plasmatique humaine	lapin	Ac I	1/10 000	F3648, IgG polyclonal, Sigma, St Quentin Fallavier, France
IgG de lapin	chèvre	Ac II	1/15 000	A3687, polyclonal, Sigma, St Quentin Fallavier, France

Références des anticorps pour ELISA:

Cible	Hôte	Type	Dilution	Références
Fibronectine plasmatique humaine	lapin	Ac I	1/100	F3648, IgG polyclonal, Sigma, St Quentin Fallavier, France
RGD de la fibronectine plasmatique humaine	souris	Ac I	1/1 000	MAB1926, monoclonal, Millipore, Molsheim, France
IgG de souris	chèvre	Ac II	1/2 500	A5324, polyclonal couplé à la phosphatase alcaline, Sigma, St Quentin Fallavier, France

Références des anticorps pour immunomarquage fluorescent des cellules :

Cible	Hôte	Type	Dilution	Référence
Fibronectine plasmatique humaine	lapin	Ac I	1/50	F3648, IgG polyclonal, Sigma, St Quentin Fallavier, France
Intégrine α v humaine	Souris	Ac I	1/50	sc-9969, IgG monoclonal, Santa-Cruz, Heidelberg, Germany
Intégrine β 1 humaine	Souris	Ac I	1/50	MAB1965, IgG monoclonal, Millipore, Molsheim, France
IgG de lapin	chèvre	Ac II	1/50	T6778, polyclonal couplé à la rhodamine, Sigma, St Quentin Fallavier, France
IgG de souris	chèvre	Ac II	1/50	A21424, polyclonal couplé Alexa 555, Invitrogen, Cergy, France

Références des autres produits pour marquage fluorescent des cellules :

Cible	Référence
Phalloïdine	p5282, Sigma, St Quentin Fallavier, France
DAPI	4,6-diamino-2-phénylindol dihydrochloride, D9542, Sigma, St Quentin Fallavier, France
Prolong Gold	Prolong Gold Antifade Reagent, P36930, Invitrogen, Cergy, France

Section expérimentale

Références du matériel de culture cellulaire :

Produits	Références
Acide ascorbique	A4403, L-ascorbic acid, Sigma, St Quentin Fallavier, France
Bicarbonate de sodium	Invitrogen, Cergy, France
DMEM	Invitrogen, Cergy, France
EGF	E9644, Sigma, St Quentin Fallavier, France
HAM 12	Invitrogen, Cergy, France
Hydrocortisone	H6909, Sigma, St Quentin Fallavier, France
IBIDI	80209, Biovalley, Marne-la-Vallée, France
Insuline	Insulin Human Recombinant Zinc Solution, Gibco, Cergy, France
M199	Invitrogen, Cergy, France
Pénicilline/streptomycine	Invitrogen, Cergy, France
RPMI 1640	Invitrogen, Cergy, France
Sérum de veau fœtal	Invitrogen, Cergy, France
Transferrine	T8158, Sigma, St Quentin Fallavier, France

Références des produits et réactifs de biochimie

Produits	Références
ANS	acide 8-anilino-1-naphtalenesulfonique, A1028, Sigma, St Quentin Fallavier
Acrylamide solution	BP1410-1, Fisher Bioreagent, Illkirch, France
Bleu de Coomassie G	Coomassie brilliant G-250, Biorad, Munich, Germany
Crystal violet	C0775, Sigma Aldrich
D ₂ O	Deuterium oxide, Euriso-top, Saint-Aubin, France
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid, Acros Organics, Illkirch, France
Gélatine (bille)	Gelatin sepharose™ 4B, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France
Héparine (bille)	Heparin-spharose™ 6 fast flow, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France
Isopropanol	Acros Organics, Illkirch, France
NaCl	Sodium Chloride, Fisher, Illkirch, France
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride, P7626, Sigma, St Quentin Fallavier, France
pNPP	4-Nitrophenyl phosphate Disodium Salt Hexahydrate, 71768, Fluka, St Quentin Fallavier, France
Thioflavine T	t3516, Sigma, St Quentin Fallavier
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethane, Acros Organics, Illkirch, France
Urée	28876.367, VWR, Fontenay-sous-Bois, France

Références des appareils :

Appareils	Références
Dichroïsme circulaire	Spectropolarimètre J-810, Jasco, Tokyo, Japon
Infrarouge	Spectrophotomètre Vertex 70, Bruker Optic GmbH, Ettlingen, Germany Spectromètre Jasco 6100, Jasco, Japon
Microscope à force atomique	Bruker Bioscope Catalyst, Ettlingen, Germany
Microscope confocal	Zeiss LSM710, Carl Zeiss, Göttingen, Allemagne Equipé d'une diode 405 nm, de lasers 458, 488, 514, 561 et 633 nm et d'objectifs x20 Plan Apo, ouverture numérique 0.8 et x63 à immersion à huile Plan Apo,

	ouverture numérique 1.4
Vidéomicroscope	Leica DMI6000B, Leica, Le Pecq, France Equipé d'une platine motorisée CTR6500, d'une caméra CoolSnapES2 (Photometrics), d'un objectif x10 et du logiciel de contrôle Metamorph (Roper Scientific)
Spectrophotomètre à fluorescence	Perkin Elmer LS 50B, Waltham, Massachusetts, USA Equipé d'un porte cuve thermostaté
Thermomixeur	Thermomixer comfort, eppendorf, Le Pecq, France

Références des logiciels :

Appareils	Références
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Origin 7.0	Originlab, Northampton, Massachusetts, USA

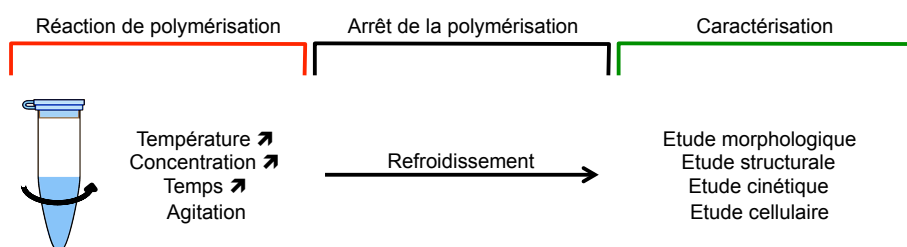
RESULTATS-DISCUSSION

PARTIE 1 : ETUDE DES MECANISMES D'ASSEMBLAGE DE LA FIBRONECTINE

L'assemblage des protéines peut être initié par le dépliement de ces dernières. Ainsi, la dénaturation thermique de la fibronectine a été étudiée par dichroïsme circulaire puis l'assemblage induit par la température a été caractérisé.

A noter dans cette étude :

Les agrégats de fibronectine sont formés à pH 7.4 en tampon HEPES 10 mM, sous agitation de 600rpm, à différentes **concentrations** et à différentes **températures** (cf. Section expérimentale, I. C). La réaction d'assemblage est arrêtée par refroidissement à +4°C. Sauf cas indiqués, toutes les caractérisations sont ensuite réalisées à 20°C.



La fibronectine est traitée à différentes températures pour initier les changements conformationnels et/ou l'assemblage.

- Ainsi, la fibronectine plasmatique dimérique sera nommée fibronectine native ou FNn
- La fibronectine traitée à 49°C sera nommée FN49
- La fibronectine traitée à 55°C sera nommée FN55
- La fibronectine traitée à 60°C sera nommée FN60
- La fibronectine traitée à 65°C sera nommée FN65
- La fibronectine traitée à 70°C sera nommée FN70

I. DENATURATION THERMIQUE DE LA FIBRONECTINE

La **dénaturation thermique** de la fibronectine a été suivie par dichroïsme circulaire en UV lointain. Cette technique permet d'analyser les **structures secondaires** impliquées dans la conformation de la protéine. La fibronectine native (FNn) révèle un spectre typique similaires à ceux obtenus dans des études antérieures (Sakai et al. 1996; Patel et al. 2004) avec un **pic négatif à 213nm** et un **pic positif à 227 nm** (Figure 47.a). La bande à 213 nm correspond aux **feuilletts β** constituant les différents modules de la fibronectine. La bande à 227 nm représente l'environnement des **acides aminés aromatiques** (Vuilleumier et al. 1993). La dénaturation thermique de la fibronectine est suivie à 227 nm entre 20 et 80°C.

La Figure 47.b montre que l'ellipticité de la fibronectine à 227 nm pendant la dénaturation reste stable entre 20 et 55°C. Elle diminue progressivement de 1000 à -1500 deg.cm².dmol⁻¹ entre 55 et 70°C. L'ellipticité semble de nouveau se stabiliser entre 70 et 80°C. Ces résultats indiquent donc que les structures secondaires de la fibronectine sont **stables entre 20 et 55°C**. Des **changements de conformations progressifs** sont observés **entre 55 et 70°C** pour atteindre un maximum de dépliement des structures secondaires à 80°C.

Afin de déterminer la réversibilité du processus de dépliement, l'ellipticité de la fibronectine à 227 nm a été suivie de 80 à 20°C. La Figure 47.b montre que l'allure de la courbe de renaturation est différente de la courbe de dénaturation. L'**ellipticité varie peu** entre -2000 et -1000 deg.cm².dmol⁻¹ avec la diminution de la température de 80 à 20°C. Ces résultats montrent que le **dépliement est irréversible**.

L'irréversibilité de la dénaturation ne permet pas la détermination d'une **température médiane (T_m)** réelle. Seul la T_m apparente est déterminée et correspond à la température pour laquelle la fibronectine présente 50% de ses changements de conformation par rapport à la protéine native. Ici, la T_m est estimée à **65°C**.

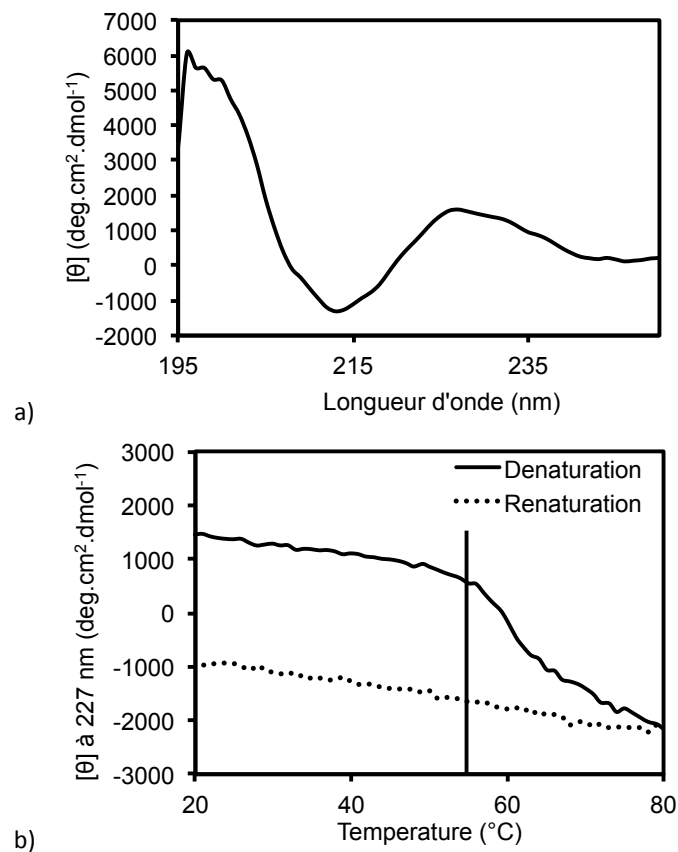


Figure 47 : Dénaturation thermique de la fibronectine suivie par dichroïsme circulaire en UV lointain

a) Spectre de dichroïsme circulaire en UV lointain de la fibronectine native à 50 µg/ml en tampon HEPES 10 mM pH 7.4. b) Variation de l'ellipticité à 227 nm de la fibronectine pendant la dénaturation entre 20 à 80°C puis pendant la renaturation entre 80 et 20°C. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

L'allure de la courbe (Figure 47.b) en trois parties révèle un **processus de dépliement complexe**. En effet, la fibronectine est une protéine repliée en une structure globulaire et constituée de modules de type I, II et III. Ces trois types de modules sont formés de feuilletts β intramoléculaires et les modules de types I et II sont également stabilisés par des ponts disulfures intradomains. Le dépliement de la fibronectine semble donc être le résultat du dépliement global de la protéine ainsi que du dépliement local des modules de la fibronectine. Litvinovich & al ont montré que les 15 modules de type III constituant la fibronectine ont chacun une température de dénaturation spécifique dont certains sont plus thermostables que d'autres (Litvinovich & Ingham 1995). Le

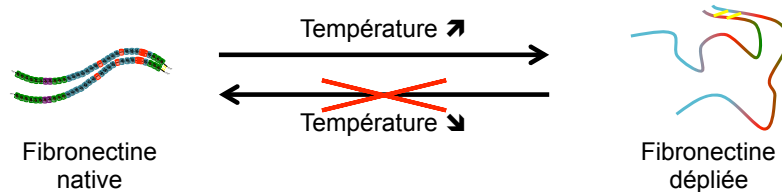
module III₁₁ a une température de dénaturation de 48°C. Cette valeur bibliographique indique que lors de la dénaturation thermique, ce module est probablement l'un des premiers à être dénaturé, suivie des modules III₂, III₄, III₅, III₈, III₉ aux alentours de 57°C puis III₁ à 78°C. Par contre, il a été montré que les modules III₃, III₆, III₁₀, III₇ sont thermostables avec des températures de dénaturation respectives de 121°C, 111°C, 102°C, 95°. Ces modules pourraient ne pas être dépliés dans la gamme de température (20-80°C) étudiée ici. L'étude de Litvinovich a été réalisée sur les protéines recombinantes générées pour chaque module de type III isolé. Dans la fibronectine plasmatique entière étudiée ici, les modules étant tous reliés, le mécanisme de dépliement de la fibronectine pourrait être bien plus complexe puisque des interactions électrostatiques interdomaines interviennent dans la stabilité de la structure de la fibronectine. Nos résultats et la littérature indiquent que les températures supérieures à 55°C favorisent le dépliement de la fibronectine et pourraient donc provoquer son assemblage (Pauthe et al. 2002).

L'allure de la courbe et la stabilité de l'ellipticité lors de la renaturation indiquent l'**irréversibilité des changements de conformation** subis par la fibronectine lors de la dénaturation thermique. Les expériences sont réalisées à des concentrations faibles de 50 µg/ml. L'irréversibilité de la dénaturation thermique ne semble donc pas due à un encombrement moléculaire.

Les changements de conformations suite à la dénaturation thermique pourraient permettre l'assemblage de la fibronectine à des températures supérieures ou égales à 55°C.

En résumé :

La dénaturation thermique de la fibronectine est un processus complexe irréversible au cours de laquelle 55°C semble être une température critique pour le dépliement.



Le profil de dénaturation thermique de la fibronectine dans notre étude a montré que les changements de conformations sont progressifs à partir de 55°C. Ainsi, les assemblages de cette protéine sont fait à 49°C qui correspond à la température avant les changements de conformations observés par dénaturation thermique, 55°C la température à laquelle s'initie les changements de conformations et 70°C la température à laquelle les changements de conformations semblent commencer à se stabiliser.

La fibronectine est dépliée aux températures supérieures à 55°C. Ce dépliement pourrait faciliter son assemblage par incubation à haute température. Ainsi, l'assemblage de la fibronectine a été analysé par différentes méthodes.

II. CARACTERISATION DES ASSEMBLAGES DE LA FIBRONECTINE

II. A. Caractérisation morphologique

II. A. 1. Analyse de masse et charge

A l'Institut Lumière Matière a été mis au point une technique de **spectrométrie de masse** qui permet de mesurer la masse et la charge des molécules de **très haut poids moléculaire** (Doussineau, Kerleroux, et al. 2011). Dans le cadre d'une collaboration avec leur équipe, la masse et la charge de la fibronectine agrégée ont été déterminées. Le seuil limite inférieur détectable par cette technique étant de 15 MDa pour la masse et 300 e (électron) pour la charge, la fibronectine native, de seulement 450 kDa, n'est pas détectée. Les résultats sont représentés sous forme de diagramme en fonction de la masse et de la charge des protéines où le signal rouge représente les zones les plus denses en masse et charge (Figure 48). On observe un **large spectre de répartition** avec la formation d'agrégats de fibronectine dont la masse se répartit entre 15 et 1250 MDa et la charge de 300 à 4000e. Le poids moléculaire de la fibronectine étant de 450 kDa, ces résultats indiquent qu'elle a formé des **assemblages de taille hétérogène**. Les graphiques latéraux représentent la répartition en charge (à gauche) et en nombre de molécules de fibronectine (en haut). Leur modélisation révèle des **assemblages en moyenne de 46 MDa pour 543 e** (ligne rouge). Ces résultats montrent également que la fibronectine forme **deux populations principales d'assemblage** (lignes vertes). La première est composée de structures de plus petites tailles d'environ **46 MDa qui se chargent de 543 e**. Elles sont donc constituées d'environ **102 unités de fibronectine avec 5 charges par molécule de fibronectine**. La deuxième population possède un maximum de **236 MDa** et se chargent de **1391 e**. Ces assemblages de masse plus importante semblent donc constitués d'environ **524 unités avec 2 charges par molécule de fibronectine**. La fibronectine semble donc capable de former des assemblages supramoléculaires de différente structure : de **petits agrégats se chargeant de façon plus importante** et de **grands agrégats se chargeant moins**.

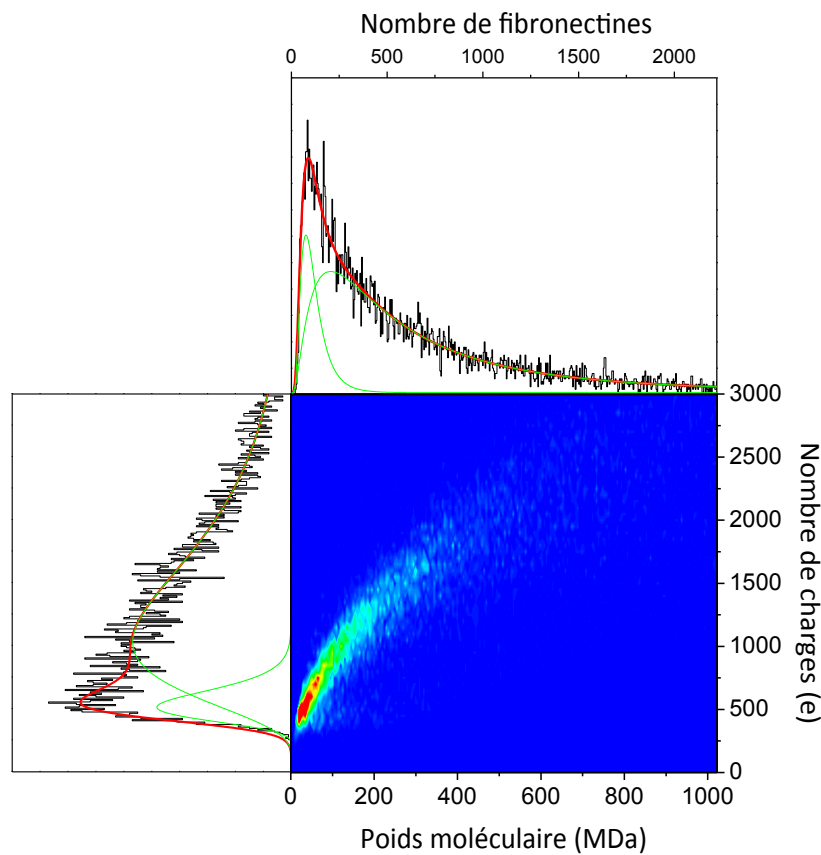


Figure 48 : Analyse des agrégats de fibronectine par spectrométrie de masse

La fibronectine à 1 mg/ml en tampon HEPES (10 mM, pH 7.4) est incubée 24h à 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm puis analysée par spectrométrie de masse. Le diagramme central représente le nombre de charge en fonction de la masse de la fibronectine. Le rouge représente les zones les plus denses en charge et masse alors que le bleu représente les zones les moins denses. A gauche, graphique représentant le nombre de charge (e, électron). En haut, graphique représentant le nombre de molécules de fibronectine. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Fernandez de la Mora & al ont montré une corrélation entre le poids moléculaire des protéines non-dénaturées et la charge moyenne par spectrométrie de masse (Fernandez de la Mora 2000). Ainsi, si on effectue le même calcul pour la fibronectine de 450 kDa, son nombre de charges serait de 50 e. Pour un ensemble de 102 protéines de 450 kDa, le nombre de charges devrait donc être de 5 100 e. Or dans notre étude, un assemblage de 102 fibronectines présente une charge de seulement 543 e. Ce résultat indique que les **molécules de fibronectine seraient très largement compactées entre elles limitant** ainsi la formation de charge lors du passage dans le nébuliseur.

II. A. 2. Analyse de morphologie

Afin de caractériser la structure macroscopique des assemblages de fibronectine, des acquisitions d'images de **microscopie à force atomique (AFM, atomic force microscopy) en milieu liquide** ont été effectuées (Figure 49). Des **structures compactes et sphériques de 14 ± 3.5 nm de diamètre et 7.5 ± 1.8 nm de hauteur** sont observées pour la fibronectine assemblée. Dans le cas de la fibronectine native, ces structures ne sont pas observées. D'autre part, la comparaison des échelles en gradient de hauteur indique que les quelques structures ponctiformes de la fibronectine native sont plus petites par rapport à la fibronectine assemblée à 70°C. Ainsi, ces images montrent donc que la fibronectine forme des **agrégats compacts et globulaires** suite à la dénaturation thermique.

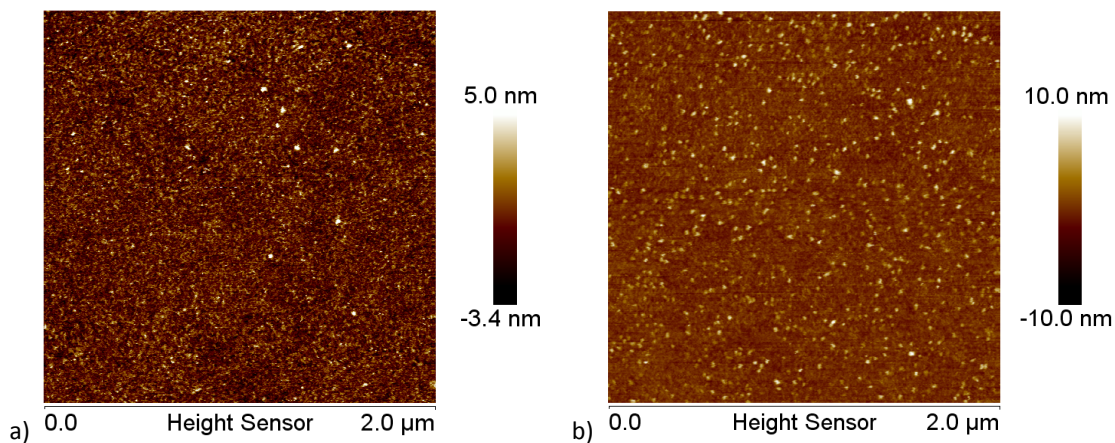


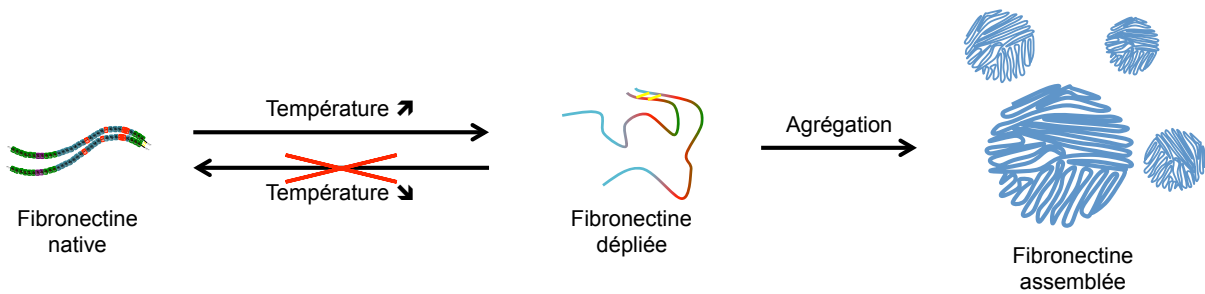
Figure 49 : Analyse morphologique de la fibronectine native ou assemblée par AFM en milieu liquide

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée 24h à 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. La fibronectine est ensuite imagée par AFM en milieu liquide. a) Fibronectine native. b) Fibronectine assemblée. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont montré que la fibronectine purifiée aurait un rayon hydrodynamique de 9 nm en solution (Nelea et al. 2008). En condition dénaturante en présence d'urée, cette protéine acquiert un rayon hydrodynamique de 21 nm (Pelta et al. 2000; Nelea et al. 2008). Dans le cadre de notre étude, les acquisitions par AFM révèlent des structures de 14 nm de diamètre soit le diamètre de la fibronectine partiellement dépliée. L'analyse par spectrométrie de masse montre des agrégats formés de quelques dizaines à quelques centaines de molécules de fibronectine. La combinaison de nos deux résultats avec la littérature tend à montrer que les assemblages formés pourraient correspondre à **des agrégats composés de dizaines/centaines de molécules de fibronectine partiellement dépliées et empilées ensemble dans une structure très compacte sphérique**. Les deux populations d'agrégats observées par spectrométrie de masse n'ont pas pu être distinguées par AFM. Cela est probablement dû aux limites de la technique. En effet, les agrégats « mous » de protéines pourraient être déformés par la pointe de l'AFM.

En résumé :

La fibronectine forme des agrégats hétérogènes de très haut poids moléculaire et de structure hétérogène. Ces agrégats correspondent à des assemblages ellipsoïdes compacts constitués de quelques dizaines à quelques centaines de molécules de fibronectine dépliées.



II. B. Caractérisation conformationnelle

Les analyses de spectrométrie de masse et de microscopie à force atomique ont montré que la fibronectine forme des assemblages de haut poids moléculaire. Dans cette partie, les changements de structure et les liaisons impliquées dans le maintien des assemblages sont étudiés afin d'obtenir des indications sur les conformations au sein des agrégats de fibronectine.

II. B. 1. Environnement des acides aminés aromatiques

Un indicateur du dépliement correspond au changement de **fluorescence intrinsèque** des protéines. La fluorescence provient de l'excitation des acides aminés aromatiques constituant la chaîne protéique. La fibronectine contient 78 tryptophanes (Trp). Suite à son excitation à 295 nm, l'émission de fluorescence des Trp varie en **fonction de leur environnement au sein de la molécule de la fibronectine** et donc **en fonction de la conformation de la protéine**. La fibronectine native (FNn) présente un spectre avec un maximum d'émission à 333 nm (Figure 50.a). Le spectre de la fibronectine incubée 24h à 49°C est superposable à celui de la FNn. Par contre, suite à l'incubation à 55 et 70°C, le spectre de la fibronectine présente un pic à 333 nm avec un épaulement à 355 nm et est associé à une augmentation de la fluorescence. La conservation du pic à 333 nm montre que la fibronectine maintient une partie de ses structures de type native. Une modification de toutes les structures de la fibronectine aurait conduit à une perte du pic à 333nm. L'épaulement observé à 355nm révèle une modification de l'environnement local des Trp de la fibronectine. Cela indique donc un **dépliement de la protéine** favorisant l'**exposition des Trp** au solvant.

Ces résultats ont été confirmés par dichroïsme circulaire (DC) en UV proche (Figure 50.b). Le DC en UV proche permet de mesurer l'ellipticité et donc les changements d'environnement des Trp, tyrosine (Tyr) et phénylalanine (Phe) entre 260 et 320 nm. Les spectres de la fibronectine native et après incubation à 49 et 55°C présentent deux pics négatifs à 291 et 298 nm correspondant aux Trp. Ils révèlent également un pic négatif à 281 nm correspondant aux tyrosines. Le spectre de la fibronectine agrégée à 70°C révèle un lissage des pics attribués aux tryptophanes et tyrosines. Ainsi, ces résultats indiquent que la **dénaturation thermique** favorisant l'agrégation de la fibronectine induit une **modification de l'environnement des Trp et Tyr**.

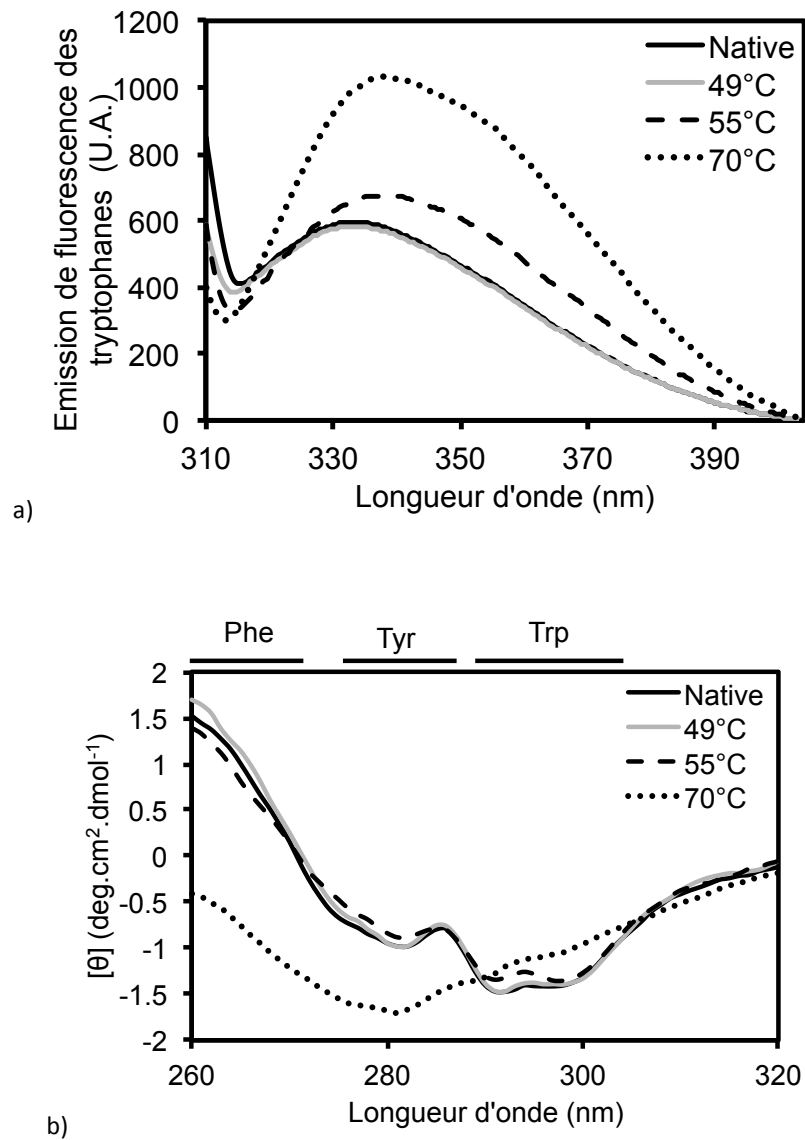


Figure 50 : Spectres de fluorescence intrinsèque et dichroïsme circulaire en UV proche de la fibronectine native ou assemblée

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée 24h à 49, 55 ou 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. a) Spectre de fluorescence des tryptophanes de la fibronectine diluée à 27 µg/ml après excitation à 295 nm. b) Spectre de dichroïsme circulaire en UV proche de la fibronectine diluée à 50 µg/ml. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

II. B. 2. Importance des ponts disulfures

Les cystéines sont absentes des modules de types III de la fibronectine mais sont impliquées dans des ponts disulfures intradomains dans les modules de type I et II. L'implication des **ponts disulfures** dans l'assemblage supramoléculaire de la fibronectine est encore sujette à débat (cf. Synthèse bibliographique, Partie 3, III.B). Ainsi le rôle des ponts disulfures dans les assemblages formés dans cette étude a été déterminé par **électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices**. La fibronectine a été incubée 24h à 49, 55 et 70°C. Puis les différents profils de migration ont été comparés à celui de la fibronectine native.

La fibronectine native (FNn) est un dimère de 450 kDa constitué de deux sous-unités avec un poids moléculaire apparent sur gel SDS-PAGE de 220-250 kDa maintenues par deux ponts disulfures. En conditions non-réductrices, la FNn présente une bande à environ 450 kDa (Figure 51.a). En conditions réductrices, la FNn présente effectivement une seule bande de poids moléculaire apparent de 220-250 kDa (Figure 51.b). La fibronectine incubée à 49°C présente les mêmes profils de migration que la FNn.

Suite au traitement de 24h à 55°C, la fibronectine présente un profil de migration électrophorétique intermédiaire. En conditions non-réductrices, on observe une bande de fibronectine à 450 kDa et une bande de haut poids moléculaire à la limite du gel de séparation (Figure 51.a). La température de 55°C semble donc être une température à laquelle l'assemblage de la fibronectine peut être initié. En conditions réductrices, une bande de haut poids moléculaire et une bande de 250 kDa sont détectées (Figure 51.b). La bande de 250 kDa correspond probablement à la forme réduite de la fibronectine n'ayant pas été incorporée dans les assemblages. Ces résultats indiquent que les assemblages de fibronectine formés à cette température ne sont pas maintenus par des ponts disulfures.

Malgré la présence d'agent réducteur à forte concentration (15%), la fibronectine assemblée à 70°C présente le même profil de migration qu'en conditions non-réductrices (Figure 51.a et b) : la fibronectine assemblée à 70°C présente une bande de haut poids moléculaire à la limite du gel de concentration et du gel de séparation. Ce résultat est identique y compris pour des assemblages formés pendant un temps plus long de 168h (Figure 51.c). Les ponts disulfures ne sont donc pas réduits. Ce résultat indique que **les assemblages formés à haute température de 70°C ne sont pas sensibles au β -mercaptoéthanol et ne semblent donc pas stabilisés par des ponts disulfures**. Malgré les conditions dénaturantes et réductrices, les agrégats ne sont pas solubilisés indiquant qu'ils sont maintenus par des liaisons fortes. Ces résultats concordent avec ceux de Chen et Ohashi qui montrent que les assemblages de fibronectine formés par les cellules ne sont pas stabilisés par des ponts disulfures (Chen & Mosher 1996; Ohashi & Erickson 2009).

Nous pouvons également noter qu'aucune bande de poids moléculaire inférieur à 250 et/ou 450 kDa n'est observée. Cela indique que le traitement thermique n'induit pas la fragmentation de la fibronectine au cours de son assemblage.

Dans le cas de la fibronectine assemblée à 70°, il est toutefois possible d'observer, en conditions réductrices, des bandes à 250 kDa indiquant que des monomères de fibronectine ont été incorporés ou que des monomères de fibronectine ne sont pas encore bien intégrés dans l'assemblage (en périphérie) et que le β -mercaptoéthanol les a séparés de l'assemblage.

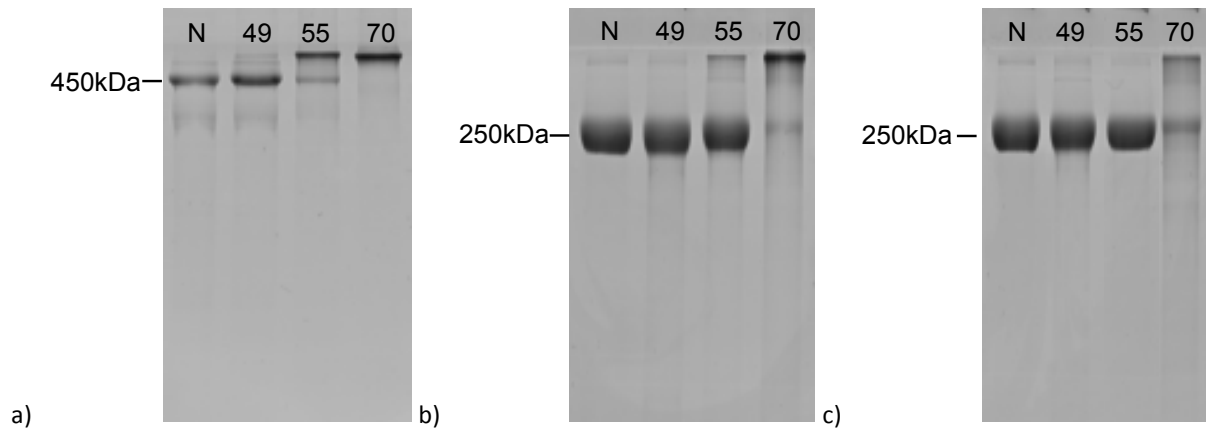


Figure 51 : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la fibronectine native ou assemblée

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée 24h (a et b) ou 168h (c) à 49, 55 ou 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. a) Conditions non-réductrices. b et c) Conditions réductrices en présence de 15% de β -mercaptoéthanol. N : fibronectine native, 49 : fibronectine incubée à 49°C, 55 : fibronectine incubée à 55°C, 70 : fibronectine incubée à 70°C. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II. B. 3. Rôle des interactions hydrophobes

Les profils de migration électrophorétiques montrent que les agrégats sont maintenus par des liaisons fortes. Des études *in vitro* et *in silico* semblent indiquer que les assemblages *in vivo* de fibronectine pourraient être stabilisés par des **interactions hydrophobes** (Briknarová et al. 2003; Ohashi et al. 2009; Gee, Yüksel, et al. 2013). L'étirement de la fibronectine provoquerait l'**exposition des zones hydrophobes** des modules de type III de la fibronectine. Ainsi, l'exposition des zones hydrophobes dans les agrégats de fibronectine a été déterminée par l'incorporation de l'ANS. Suite à sa liaison avec les zones hydrophobes exposées au solvant, l'excitation de ce dernier à 350 nm induit une augmentation de sa fluorescence et un déplacement de son pic de fluorescence de 500 à 460nm. En présence de fibronectine native ou incubée à 49°C, la fluorescence de l'ANS reste très faible indiquant que les zones hydrophobes de la fibronectine sont enfouies au cœur de la protéine (Figure 52). En présence de fibronectine incubée à 55 et 70°C, la fluorescence de l'ANS augmente et présente un déplacement du pic de 500 à 460 nm. Cela révèle que l'ANS se lie à des zones hydrophobes de la fibronectine assemblée qui ne sont pas présentes dans la fibronectine native. Cela suggère que la fibronectine a été dépliée et que son cœur hydrophobe est exposé au solvant lorsqu'elle est assemblée à 55 et 70°C. Le dépliement de la fibronectine entière mène donc à la formation de multimères maintenus par des **liaisons non-covalentes** de type **interaction hydrophobe**.

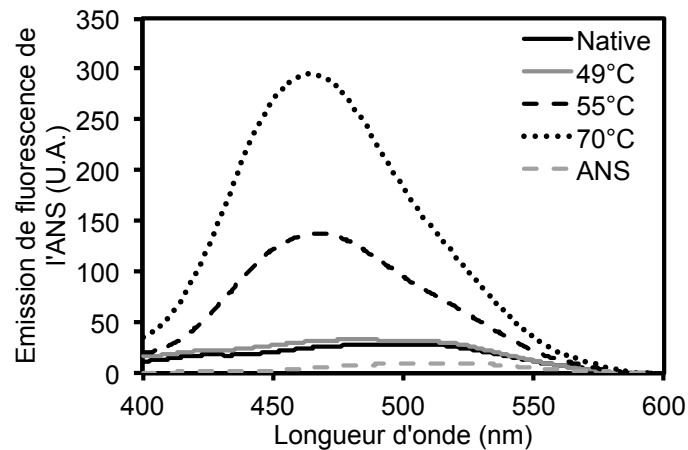


Figure 52 : Spectre de fluorescence de l'ANS en présence de fibronectine native ou assemblée

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée 24h à 49, 55 ou 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. L'émission de fluorescence de l'ANS en présence des différentes fibronectines est mesurée suite à l'excitation à 350 nm. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II. B. 4. Rôle des feuillets β

L'analyse par dichroïsme circulaire de la dénaturation thermique ainsi que la littérature (cf. Synthèse bibliographique, Partie 3, III.B.) indiquent que les assemblages de la fibronectine pourraient être maintenus par un réarrangement des feuillets β intramoléculaires en feuillets β intermoléculaires. Ainsi, les **structures secondaires impliquées** dans la conformation de la fibronectine sont analysées par **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier**.

Le spectre de la fibronectine native présente une bande à 1610 cm^{-1} et 1679 cm^{-1} qui correspondent aux feuillets β intermoléculaires, à 1628 cm^{-1} correspondant à la bande des feuillets β intramoléculaires, 1644 cm^{-1} pour les structures désordonnées et 1663 cm^{-1} pour les coudes (Figure 53.a et c). L'aire sous les différentes courbes permet de déterminer le pourcentage des différentes structures composant la fibronectine. Les feuillets β intramoléculaires représentent environ 38% des structures de la fibronectine, les feuillets β intermoléculaires correspondent à 18%, les coudes à 19% et les structures désordonnées à 27%.

Dans le cas des agrégats, la fibronectine présente également des bandes à 1618 et 1675 cm^{-1} correspondant aux feuillets β intermoléculaires, une bande à 1648 cm^{-1} pour les structures désordonnées et une bande à 1660 cm^{-1} pour les coudes. La différence la plus importante dans le profil de la fibronectine correspond au déplacement du pic à 1628 cm^{-1} vers 1635 cm^{-1} . Ce nouveau pic correspond à l'apparition de nouveaux feuillets β intermoléculaires. Dans les agrégats, les fibronectines sont constituées à 46% de feuillets β intermoléculaires, 22% de feuillets intramoléculaires, 18% de structures désordonnées et 14% de coudes (Figure 53.b et c). Les résultats montrent donc une augmentation en feuillets β intermoléculaires au détriment des feuillets β intramoléculaires, des structures désordonnées et des coudes. Le spectre de différence entre la fibronectine native et assemblée illustre ce résultat où le pic à 1618 cm^{-1} des feuillets β intermoléculaires est positif alors que le pic à 1628 cm^{-1} des feuillets β intramoléculaires est négatif (Figure 53.d).

Le **gain en feuillets β intermoléculaires** semble indiquer que les agrégats sont maintenus par les **liaisons hydrogènes formés lors de l'échange de feuillets β entre molécules de fibronectine**.

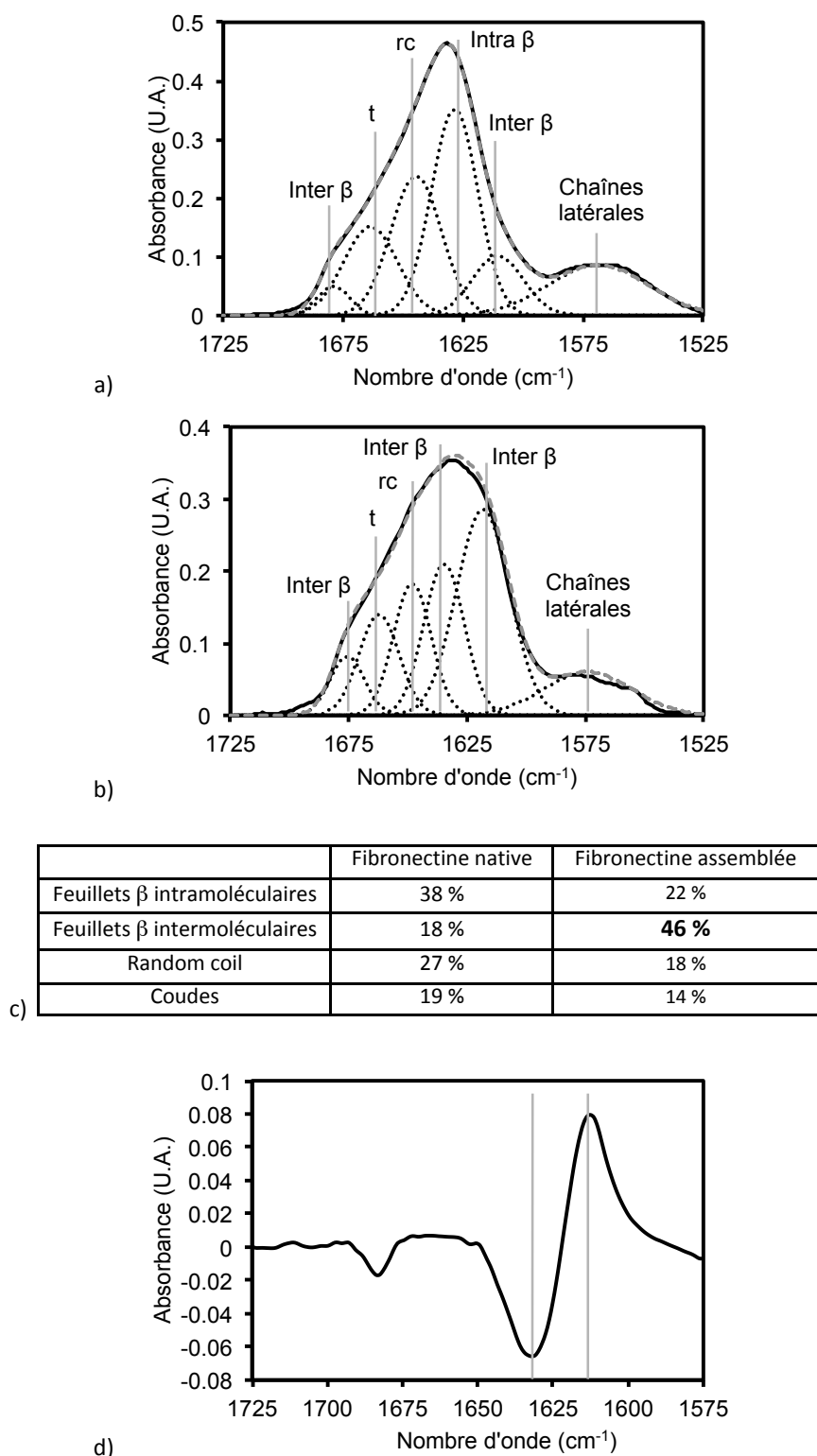


Figure 53 : Spectre infrarouge à transformée de Fourier de la fibronectine native et assemblée

La fibronectine est incubée 24h à 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. Le spectre de la fibronectine est mesuré par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. a) Fibronectine native. b) Fibronectine assemblée à 70°C. Intra β : feuillets β intramoléculaires, Inter β : feuillets β intermoléculaires, rc : structures désordonnées (random coil), t : coudes (turn), chaînes latérales : chaînes latérales des acides aminés. c) Tableau des pourcentages de structures secondaires présent dans la fibronectine. d) Spectre de différence entre la fibronectine native et assemblée. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La thioflavine T (ThT) est un colorant utilisé pour la détection des fibres amyloïdes. La ThT émet de la fluorescence lorsqu'elle interagit avec la surface des feuilletts β intermoléculaires. Suite à l'arrêt de la réaction de polymérisation par refroidissement, la ThT est ajoutée à une concentration équimolaire à la fibronectine. Son spectre de fluorescence est mesuré entre 460 et 560 nm après excitation à 442nm. Les résultats montrent que la fluorescence est faible en présence de fibronectine native ou incubée à 49°C, et augmente à partir de 55°C jusqu'à 70°C (Figure 54). Les **températures supérieures ou égales à 55°C** semblent donc permettre la **formation de feuilletts β intermoléculaires**.

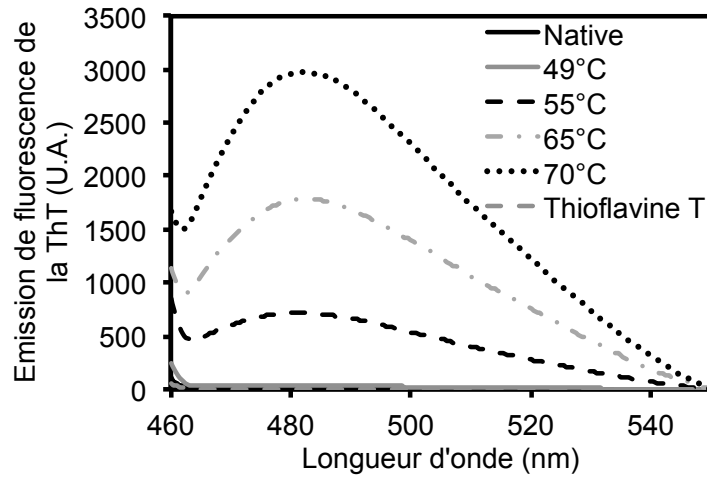


Figure 54 : Spectre de fluorescence de la thioflavine T en présence de fibronectine native ou assemblée

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée 24h à 49, 55 ou 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. L'émission de fluorescence de la ThT en présence des différentes fibronectines est mesurée suite à son excitation à 442 nm. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

II. B. 5. Stabilité des assemblages

Les assemblages amyloïdes ont la particularité d'être **résistants à la dénaturation et persistants dans le temps** (cf. Revue bibliographique, Partie 2, III.A). Ainsi, pour conforter le caractère amyloïde des agrégats de fibronectine, leur **stabilité** dans le temps a été étudiée.

La fibronectine a été incubée 24h à 70°C. La fibronectine native et assemblée ont ensuite été stockées à + 4°C pendant 109 jours. Enfin, la fluorescence de la ThT à 482 nm a été mesurée à différents temps au cours de la période de stockage. La fluorescence de la ThT en présence de fibronectine native reste faible au cours des 109 jours et celle en présence de la fibronectine assemblée reste stable à 400 U.A. (Figure 55.a).

Après les 109 jours de stockage, la séparation sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes non-réductrices présente une bande à 450 kDa pour la fibronectine native et une bande de haut poids moléculaire ne pénétrant pas dans le gel de séparation pour la fibronectine assemblée (Figure 55.b). Ces profils de migration sont comparables à ceux de la fibronectine observés avant le stockage de 109 jours (Figure 51.a). Ces résultats montrent que la fibronectine native et ses **agrégats sont stables dans le temps**. Ces résultats semblent également confirmer le **caractère amyloïde des agrégats de la fibronectine résistants à la dénaturation et persistants dans le temps**.

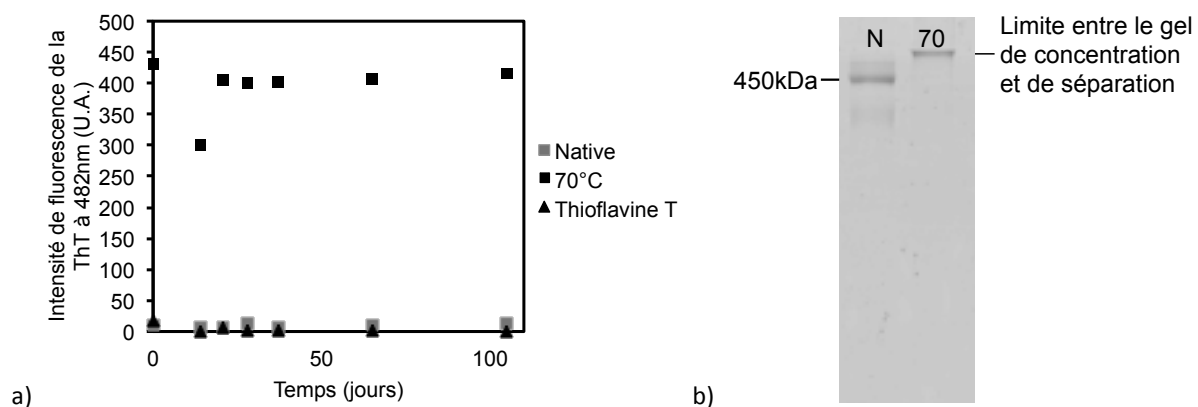


Figure 55 : Fluorescence de la thioflavine T en présence de fibronectine native ou assemblée au cours du temps de stockage et profil électrophorétique

La fibronectine à 0.5 mg/ml est assemblée 24h à 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native. a) Fluorescence de la ThT mesurée à 482 nm pendant 109 jours en présence de la fibronectine native ou incubée à 70°C. b) Séparation sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes non-réductrices de la fibronectine native (N) et assemblée (70).

En conclusion, le **déplieement de la fibronectine plasmatique humaine entière** mène à la formation d'**agrégats compacts** maintenus par des liaisons non-covalentes de type **hydrophobe** mais également de type **liaison hydrogène entre feuilletts β intermoléculaires**. Ces agrégats lient les deux colorants que sont l'**ANS** et la **thioflavine T**, sont **résistants aux conditions dénaturantes (SDS) et réductrices** (β -mercaptoéthanol) et persistent dans le temps. Ces propriétés sont caractéristiques des assemblages amyloïdes indiquant ainsi que la fibronectine forme des **agrégats de type amyloïde**. De plus en plus d'études tendent à montrer que les assemblages amyloïdes sont plus répandus que ce qu'il n'était initialement pensé et qu'ils peuvent avoir une implication physiologique (Maji et al. 2009; Romero et al. 2010). Il est notamment possible de citer les assemblages amyloïdes formés par certaines hormones dont la β -endorphine (Maji et al. 2009). D'autres exemples dans la littérature ont suggéré que la fibronectine pourrait former des assemblages de type amyloïde. La sonication en

présence de SDS ou encore l'apport du fragment anastelline favorisent la formation de fibres avec des propriétés amyloïdes (Huang et al. 2010; Morla et al. 1994; Briknarová et al. 2003).

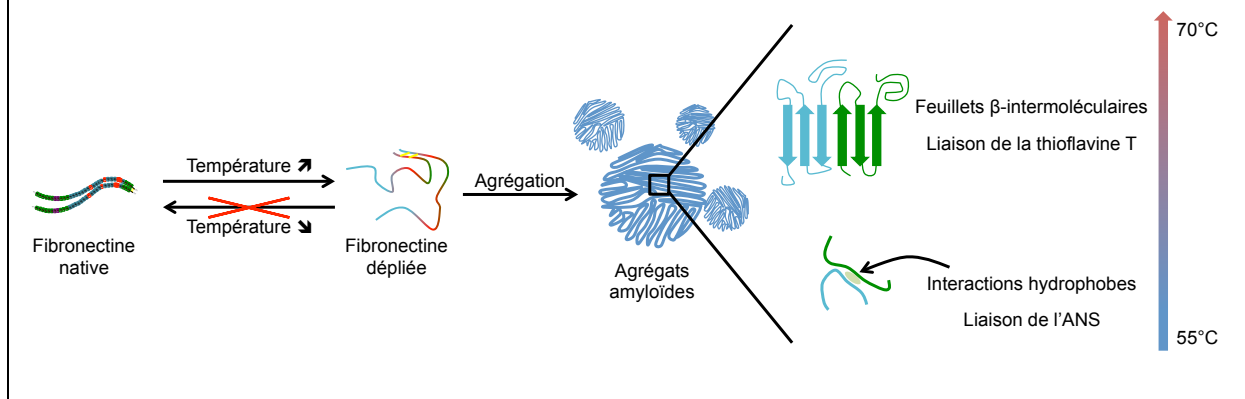
La fibronectine pourrait donc avoir une tendance intrinsèque à former des assemblages de type amyloïde dont la formation *in vivo* reste encore à élucider.

En résumé :

L'analyse structurale de la fibronectine révèle qu'elle est capable de former des agrégats de type amyloïde. Ces assemblages sont stabilisés par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes intervenant dans la formation des feuillettes β intermoléculaires, et lient l'ANS et la thioflavine T. Les agrégats ne sont pas maintenus par des ponts disulfures mais persistent dans le temps.

Selon les conditions d'assemblage, les agrégats formés ont tout de même des signatures différentes. Le traitement de la fibronectine à une température de 55°C montre que le processus d'agrégation est partiel. Il existe un mélange entre fibronectine native et fibronectine agrégée.

L'assemblage à haute température (70°C) permet la formation d'agrégats stables et résistants aux conditions dénaturantes et réductrices. Toutes les molécules de fibronectine semblent incorporées dans les assemblages.



III. CINÉTIQUE D'ASSEMBLAGE DE LA FIBRONECTINE

III. A. Cinétique d'assemblage concentration dépendante

La **cinétique d'assemblage** de la fibronectine a été analysée par fluorescence de la thioflavine T (ThT) pour différentes concentrations de fibronectine allant de 0,25 à 1,25 mg/ml afin de mieux caractériser le **mécanisme de polymérisation** (Figure 56). A différents temps de la cinétique, la réaction d'assemblage est arrêtée par refroidissement. La ThT est ensuite ajoutée dans la solution de fibronectine et son pic d'émission maximal à 482 nm est mesuré après excitation à 442nm. Les résultats montrent dans un premier temps que la fluorescence de la ThT augmente avec la concentration et avec le temps. L'agrégation de la fibronectine est donc **dépendante de la concentration et du temps**.

Les cinétiques d'assemblage ne présentent pas de phase de latence et ne semblent pas montrer de concentration critique pour initier la polymérisation (Figure 56.a).

Ainsi, les cinétiques ont été modélisées avec une double exponentielle :

$$y = A + A_1(1 - e^{-k_1x}) + A_2(1 - e^{-k_2x})$$

avec y l'intensité de fluorescence de la ThT au temps t , A la fluorescence de la ThT au temps $t=0$, A_1 et A_2 l'intensité de fluorescence de la ThT au plateau pour les deux exponentielles, k_1 et k_2 la constante de vitesse d'augmentation de fluorescence de la ThT pour les deux exponentielles en h^{-1} .

Quelle que soit la concentration, les cinétiques présentent **deux phases**. La modélisation des cinétiques permet de déterminer la constante de vitesse d'augmentation de la fluorescence (k_1 et k_2) (Figure 56.b) et l'amplitude maximale de fluorescence (A_1 et A_2) des deux exponentielles pour chaque cinétique (Figure 56.c). Pour les deux exponentielles, même si A_1 et A_2 augmentent linéairement avec A_1 deux fois plus élevée que A_2 , k_1 et k_2 diminuent avec la concentration.

Ainsi, la première exponentielle modélise la première phase rapide d'augmentation de la fluorescence et la deuxième exponentielle modélise la deuxième phase lente. Cela indique que la polymérisation de la fibronectine est en deux étapes avec une **polymérisation rapide** sur les premières heures de la cinétique, suivie d'une **diminution du taux de polymérisation**.

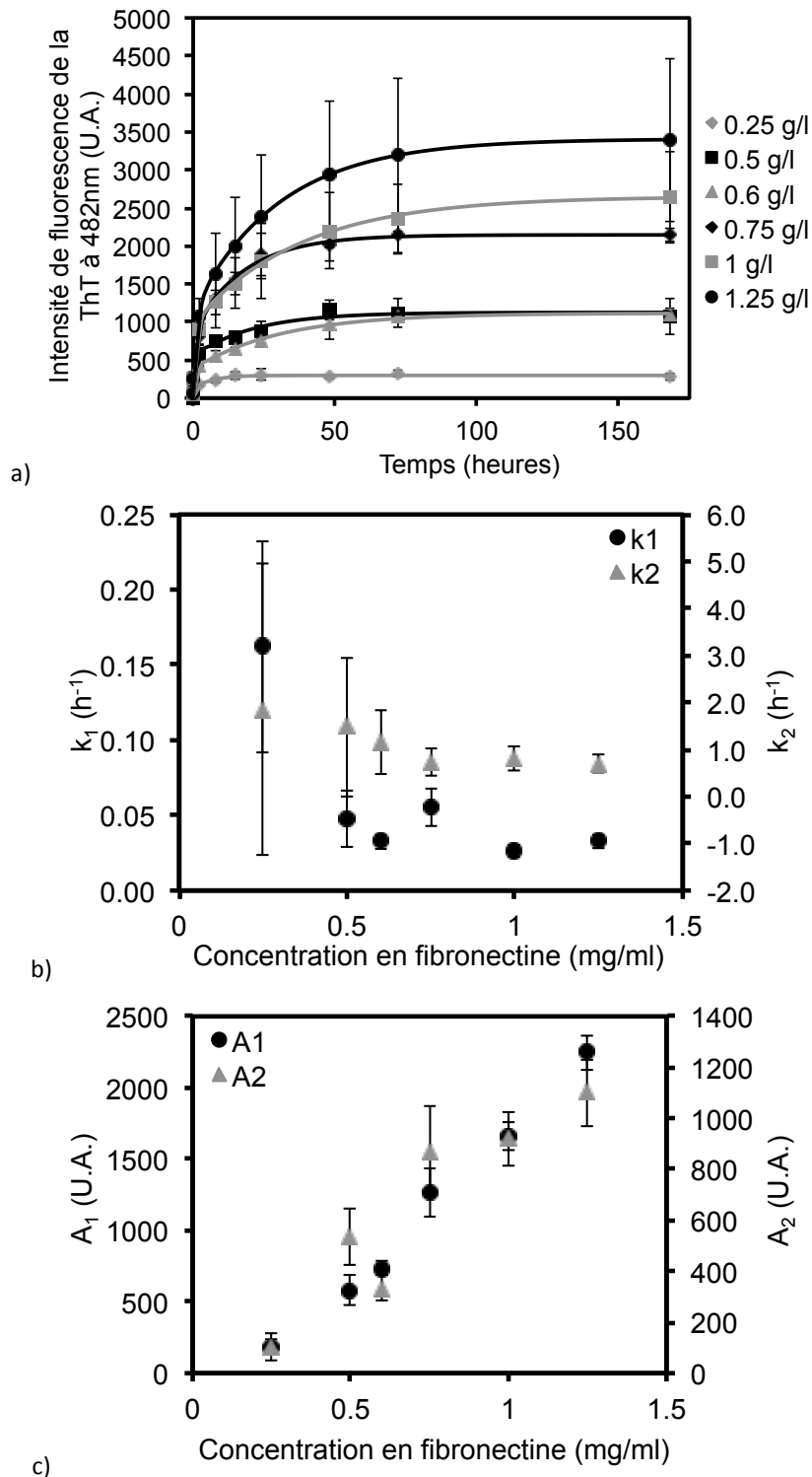
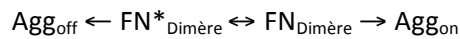


Figure 56 : Effet de la concentration sur l'assemblage de la fibronectine

La fibronectine à 0.25, 0.5, 0.6, 0.75, 1 et 1.25 mg/ml est incubée à 70°C pendant 5min, 2, 8, 15, 24, 48, 72, 168h sous agitation orbitale de 600 rpm. a) Fluorescence de la ThT en présence de fibronectine suivie à 482 nm au cours de la cinétique d'agrégation. Les traits pleins représentent la modélisation des cinétiques selon l'équation à double exponentielle. b et c) Constantes de vitesse d'augmentation (k_1 et k_2) et amplitudes maximales (A_1 et A_2) de fluorescence de la ThT obtenues à partir des cinétiques et représentées en fonction de la concentration. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Le ratio des amplitudes A_1 et A_2 entre les deux exponentielles est de 2. Cela suggère que deux types d'agrégats pourraient être formés à partir de deux états de la fibronectine :



$\text{FN}_{\text{Dimère}}$ et $\text{FN}^*_{\text{Dimère}}$ correspondraient à deux états conformationnels de la fibronectine native présent en solution. Chacun des deux états forment un type d'agrégat différent. Un état de la fibronectine formerait des **agrégats on-pathway** (Agg_{on}) de type amyloïde, alors que le deuxième état de la fibronectine native formerait des **agrégats off-pathway** (Agg_{off}) de structure différente et liant moins la thioflavine T.

A faible concentration, la formation des agrégats *on-pathway* serait majoritaire. Avec l'augmentation de la concentration, la formation des agrégats *off-pathway* serait favorisée aux dépens de celle des agrégats *on-pathway*, pouvant ainsi expliquer la diminution de la constante de vitesse k . Ces deux types d'agrégats pourraient résulter de l'interaction non-native entre les modules de la fibronectine suite à son dépliement thermique complexe.

D'après les résultats de spectrométrie de masse, la fibronectine forme également deux populations d'agrégats (Figure 48) : une population d'agrégat de petite taille et une population d'agrégat de plus grande taille mais portant moins de charge par fibronectine. On peut ainsi supposer que certaines molécules de fibronectine seraient plus compactes ($\text{FN}^*_{\text{Dimère}}$) et formeraient ainsi des agrégats *off-pathway* de haut poids moléculaire eux aussi compacts et liant moins facilement la ThT. D'autres molécules de fibronectine ($\text{FN}_{\text{Dimère}}$), moins compactes, pourraient se déplier plus facilement pour former des agrégats *on-pathway* plus petits et plus allongés qui lieraient mieux la ThT dans les feuillettes β intermoléculaires.

Des expériences complémentaires sont à réalisées afin de vérifier le modèle proposé ici.

III. B. Cinétique d'assemblage température induite

La cinétique d'assemblage de la fibronectine a été suivie sur 168h à différentes températures entre 49 et 70°C par gel SDS-PAGE et par incorporation de la thioflavine T.

III. B. 1. Analyse par SDS-PAGE

Les cinétiques d'assemblage de la fibronectine à 49, 55 et 70°C sont analysées par électrophorèse (Figure 57). Dans le cas de la fibronectine native, la Figure 57.a montre une bande majoritaire de dimère de fibronectine au alentour de 450 kDa ainsi qu'une bande légère de monomère au environ de 220-250 kDa. Suite au traitement à 49°C, la fibronectine possède le même profil de bande que la fibronectine native quel que soit le temps d'incubation (Figure 57.a). On observe également la persistance de la bande de fibronectine monomérique. Cela indique donc que même si elle induit des modifications de structure, la température de 49°C n'est pas suffisante pour provoquer un assemblage de la fibronectine détectable par électrophorèse. A 55°C, le profil de migration de la fibronectine à 5 minutes est quasi similaire à celui de la fibronectine native (Figure 57.b). Par contre, à partir de 2h, des bandes de plus haut poids moléculaire commence à apparaître. Après 15h, l'intensité de la bande à 450 kDa de la fibronectine native et de la bande de haut poids moléculaire sont quasiment identiques. A partir de 72h, seule la bande de haut poids moléculaire est

délectable. Toute la fibronectine, dimérique et monomérique, semble incorporée dans les assemblages à partir de 72h.

Le profil de migration est différent dans le cas du traitement à 70°C (Figure 57.c). La bande de haut poids moléculaire apparaît dès 5 minutes d'incubation. A 2h, toutes les molécules de fibronectine se retrouvent dans la bande de haut poids moléculaire et ne pénètrent pas dans le gel de séparation. Toutes les molécules de fibronectine semblent donc être incorporées dans les assemblages, avec une disparition totale des bande de la fibronectine native au alentour de 250 et 450 kDa. Les agrégats de haut poids moléculaires à 70°C se forment donc en quelques minutes et sont stables jusqu'à 168h. A 168h, on observe une seule bande à la limite du gel de séparation mais d'intensité moins importante. Il se pourrait que la fibronectine ait formé des assemblages de plus haut poids ne pénétrant pas dans le gel de concentration.

Ces résultats indiquent que la polymérisation de la fibronectine est d'autant plus rapide avec la température. A 55°C, le processus d'assemblage est plus lent qu'à 70°C. Le dépliement subit à 55°C permettrait un assemblage plus lent et progressif de la fibronectine, alors que le dépliement plus important à 70°C serait suffisant pour favoriser un assemblage dès 5 min.

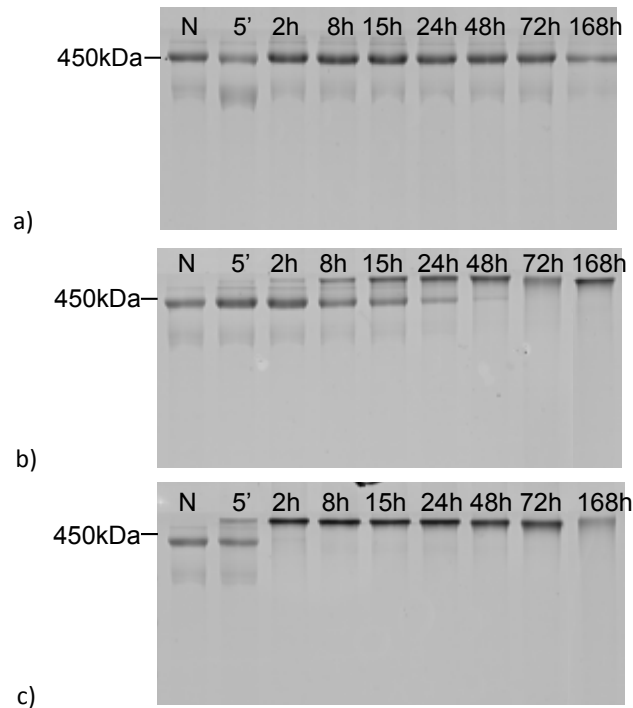


Figure 57 : Analyse par électrophorèse de la cinétique d'assemblage de la fibronectine

La fibronectine est assemblée à 49°C (a), 55°C (b) et 70°C (c) pendant 5min, 2, 8, 15, 24, 48, 72 et 168h sous agitation orbitale de 600 rpm et comparée à la fibronectine native (N). La fibronectine est séparée en conditions dénaturantes non-réductrices. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

III. B. 2. Cinétique d'assemblage suivie par fluorescence de la thioflavine T

Afin de mieux définir le mécanisme cinétique de polymérisation, l'assemblage de la fibronectine à différentes températures est suivi par incorporation de la thioflavine T (ThT) (Figure 58). Comme précédemment, la réaction d'assemblage est arrêtée par refroidissement à différents temps de la cinétique puis la ThT est ajoutée dans la solution de fibronectine pour mesurer son pic d'émission maximal à 482 nm après excitation à 442 nm. La Figure 58.a montre une augmentation de la fluorescence de la ThT avec le temps et avec la température. L'assemblage de la fibronectine est donc **dépendant de la température et du temps**.

La Figure 58.a présente également des cinétiques sans phase de latence quelles que soit la température et peuvent ainsi être modélisées avec la même double exponentielle que celle présentée dans le paragraphe III.A (cf. p. 157) :

$$y = A + A_1(1 - e^{-k_1x}) + A_2(1 - e^{-k_2x})$$

avec y l'intensité de fluorescence de la ThT au temps t , A la fluorescence de la ThT au temps $t=0$, A_1 et A_2 l'intensité de fluorescence de la ThT au plateau pour les deux exponentielles, k_1 et k_2 la constante de vitesse d'augmentation de fluorescence de la ThT pour les deux exponentielles en h^{-1} .

Quelle que soit la température, les cinétiques présentent **deux phases**. La modélisation des cinétiques permet également de déterminer la constante de vitesse d'augmentation de la fluorescence (k_1 et k_2) et l'amplitude maximale de fluorescence (A_1 et A_2) des deux exponentielles pour chaque cinétique (Figure 58.b). Pour les deux exponentielles de la cinétique, A_1 est constant et A_2 augmentent avec la concentration. Dans le cas des constantes de vitesse k , k_1 augmente avec la concentration alors que k_2 est constant.

Ainsi, la première exponentielle modélise également la première phase rapide d'augmentation de la fluorescence et la deuxième exponentielle modélise la deuxième phase lente. Cela indique que la polymérisation de la fibronectine est en deux étapes avec une **polymérisation rapide** sur les premières heures de la cinétique, suivie d'une **diminution du taux de polymérisation**.

La cinétique d'assemblage à 49°C révèle que la fluorescence de la thioflavine T ne varie pas avec le temps. Cela indique qu'à 49°C, la fibronectine n'est pas agrégée. Ainsi, la température de 49°C n'est pas pris en compte dans la suite de l'interprétation des résultats d'agrégation.

Les valeurs logarithmiques de k_1 et k_2 ont été représentées en fonction de la température en Kelvin d'après la loi d'Arrhenius (Figure 58.c et e) :

$$k = a \times e^{\frac{-Ea}{RT}}$$

donc

$$\ln k = \ln a - \frac{Ea}{RT}$$

avec k la constante de vitesse d'augmentation de fluorescence de la ThT, a la constante d'Arrhenius qui correspond au facteur de fréquence de collision entre les molécules, Ea l'énergie d'activation de

la réaction d'assemblage, R la constante des gaz parfaits égale à $8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, T la température en Kelvin.

L'interprétation des résultats est difficile avec seulement quatre points (Figure 58.c). Néanmoins, les valeurs logarithmiques de k_1 et k_2 peuvent être modélisées par des courbes de tendance linéaire.

Les pentes de ces courbes de tendance permettent de calculer les énergies d'activation (E_a) de la réaction d'agrégation de la fibronectine. Pour les valeurs logarithmiques de k_1 , l' E_a est d'environ 80000 J/mol alors qu'elle est de 25000 J/mol environ pour k_2 (Figure 58.d).

D'après Milto & al, la formation des fibres amyloïdes de la protéine prion nécessite une E_a d'environ $170\,000 \text{ J/mol}$. La dénaturation préalable de la protéine par l'urée diminue l' E_a nécessaire à son assemblage amyloïde. Ainsi, les valeurs d' E_a obtenues dans notre étude montre que l'agrégation de la fibronectine nécessite une énergie moins importante que la formation de certains autres assemblages de protéines (Milto et al. 2014). Ces deux valeurs d' E_a suggèrent également la formation de deux types d'agrégats qui se formeraient à partir de deux conformations de la fibronectine. Une population de fibronectine, se dépliant plus facilement, formerait plus facilement des agrégats avec une barrière énergétique d'agrégation moins importante. Il se pourrait que cette population corresponde à des agrégats *off-pathway* et lieraient moins la ThT (expliquant les valeurs de A_2 inférieures à A_1). La deuxième population d'agrégats aurait une barrière énergétique plus importante à passer et correspondrait à la formation d'agrégats *on-pathway* liant plus la ThT.

Avec l'augmentation de la température, la formation des agrégats *on-pathway* serait défavorisée expliquant alors l'augmentation de la constante de vitesse k_1 .

Ces résultats semblent confirmer le modèle d'un assemblage où deux réactions mènent à la formation de deux types d'agrégats différents de la fibronectine.

Cette partie des résultats mérite d'être approfondie en effectuant des mesures supplémentaires à des températures intermédiaires.

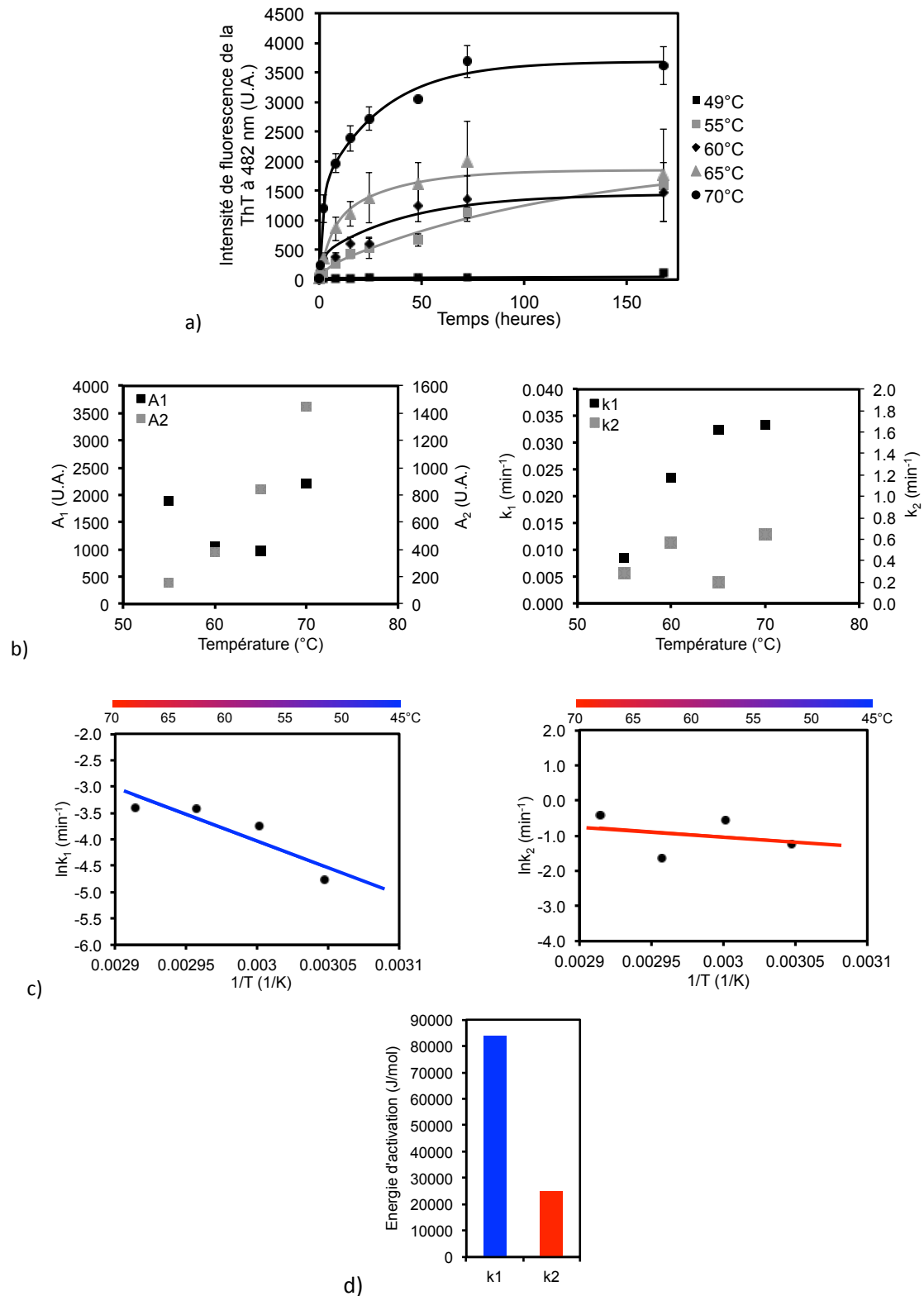


Figure 58 : Effet de la température sur l'assemblage et l'énergie d'activation de la fibronectine

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée à 49, 55, 60, 65 et 70°C pendant 5min, 2, 8, 15, 24, 48, 72, 168h sous agitation orbitale de 600 rpm.

a) Fluorescence de la ThT en présence de fibronectine suivie à 482 nm. Les traits pleins représentent la modélisation des cinétiques selon l'équation à double exponentielle.

b) Amplitudes maximales de fluorescence de la ThT (A_1 et A_2) (à gauche) et constantes de vitesse d'augmentation de la fluorescence (k_1 et k_2) (à droite) obtenues à partir des cinétiques et représentées en fonction de la température.

c et d) Représentation logarithmique des valeurs de k_1 et k_2 et énergie d'activation déterminées selon la loi d'Arrhenius. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- SEM.

Nous avons montré que la fibronectine forme des agrégats de type amyloïde. La littérature décrit une polymérisation généralement nucléation-dépendante pour la formation des fibres amyloïdes (cf. Synthèse bibliographique, Partie 2, II.A). La polymérisation nucléation-dépendante se fait en trois étapes : la phase de latence correspond au temps nécessaire pour la formation d'un premier noyau constitué de deux à plusieurs protéines, puis le polymère s'allonge à partir de ce noyau, enfin le polymère atteint une taille stable en raison de la diminution de la concentration en protéines monomériques dans le milieu réactionnel. Il existe néanmoins des protéines dont la polymérisation est isodesmique, c'est-à-dire en deux phases et sans phase de latence. La fibronectine semble faire partie de cette catégorie et présente une première phase rapide de polymérisation suivie d'un ralentissement due à une diminution de la concentration en fibronectine native dans la solution.

III. B. 3. Cinétique suivie par fluorescence de l'ANS et des tryptophanes

L'assemblage de la fibronectine a également été suivi par fluorescence des tryptophanes et de l'ANS sur 168h (Figure 59 et Figure 60). Suite au traitement à 70°C, les résultats montrent que la fluorescence de l'ANS atteint un plateau dès 2h d'assemblage (Figure 59) alors que la fluorescence intrinsèque des tryptophanes n'atteint un plateau qu'à partir de 15h (Figure 60) et la fluorescence de la ThT atteint un plateau à 48-72h (Figure 58.a). Avec seulement trois points dans la phase croissante, il est difficile d'interpréter les résultats. Néanmoins, ces données indiquent qu'il pourrait exister une hiérarchie dans le dépliement et la mise en place des différentes structures permettant le maintien des assemblages avec : une première exposition des zones hydrophobes et des tryptophanes sur les premières heures de la cinétique et une réorganisation progressive des feuillets β jusqu'à 48-72h. Néanmoins, une étude cinétique plus approfondie sur des temps d'agrégation plus courts entre 0 et 1 heure sont à réaliser pour confirmer cette hypothèse.

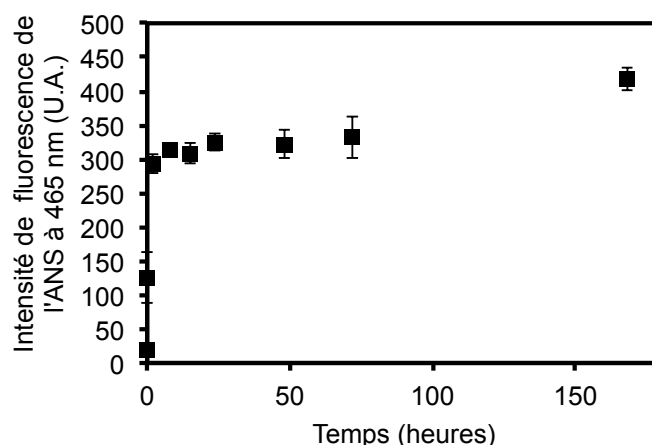


Figure 59 : Incorporation de l'ANS au cours de l'assemblage de la fibronectine

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée à 70°C pendant 5min, 2, 8, 15, 24, 48, 72, 168h sous agitation orbitale de 600 rpm. La fluorescence de l'ANS en présence de fibronectine est suivie à 465 nm suite à son excitation à 350 nm. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- SEM.

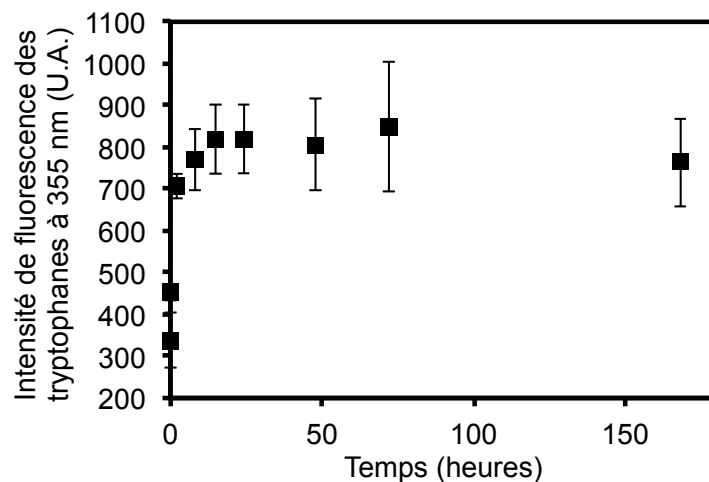


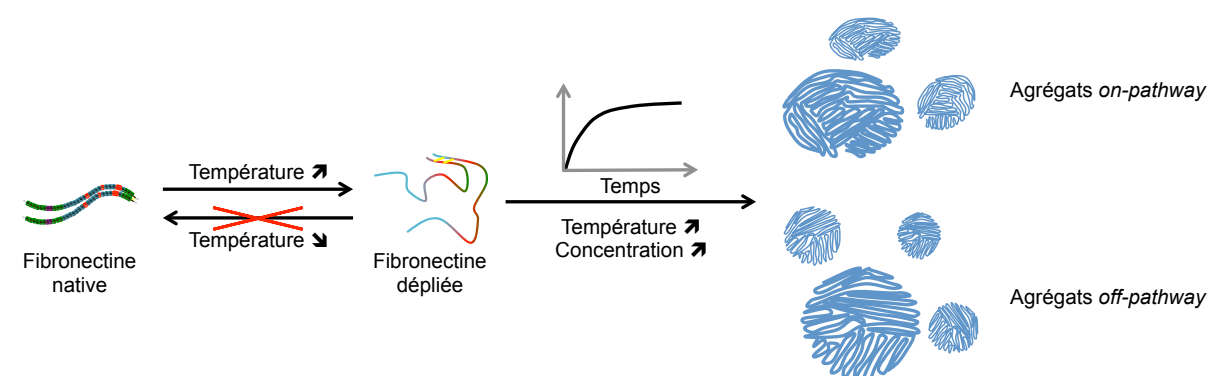
Figure 60 : Fluorescence des tryptophanes au cours de l'assemblage de la fibronectine

La fibronectine à 1 mg/ml est incubée à 70°C pendant 5min, 2, 8, 15, 24, 48, 72, 168h sous agitation orbitale de 600 rpm. La fluorescence des tryptophanes de la fibronectine est suivie à 355 nm après excitation à 295 nm. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- SEM.

En résumé :

La fibronectine présente une cinétique de polymérisation isodesmique en deux phases : une phase rapide d'assemblage suivie d'une phase plus lente probablement en raison de la diminution de la concentration en fibronectine dimérique dans la solution. L'agrégation de la fibronectine est dépendante de la concentration, la température et du temps d'assemblage. L'augmentation de ces trois paramètres favorise la polymérisation isodesmique de la fibronectine.

La fibronectine semble former deux types d'agrégats : des agrégats amyloïdes *on-pathway* et des agrégats *off-pathway*. La formation des agrégats *off-pathway* semble favorisée à haute concentration en protéine et basse température alors que les agrégats amyloïdes *on-pathway* pourraient être favorisés à haute température et basse concentration. De façon plus atypique, la constante d'assemblage de la fibronectine diminue avec la concentration en fibronectine. La constante d'assemblage des agrégats *on-pathway* augmente avec la température alors qu'elle diminue pour les agrégats *off-pathway*.



***PARTIE 2 : ÉTUDE DE LA FONCTIONALITE ET DE L'INFLUENCE DES AGREGATS DE
FIBRONECTINE SUR LE COMPORTEMENT CELLULAIRE***

La dénaturation thermique de la fibronectine mène à la formation d'agrégats de type amyloïde. La fonctionnalité de ces agrégats ainsi que leur influence sur le comportement cellulaire a été étudiée.

A noter dans cette étude :

Sauf cas indiqués, les agrégats de fibronectine sont formés à 70°C pendant 24h et sous agitation orbitale de 600 rpm (tampon HEPES 10 mM, pH 7.4). La réaction d'assemblage est stoppée par refroidissement à +4°C. Pour les études cellulaires, la fibronectine est ensuite diluée dans le milieu de culture. Puis, toutes les études en présence de la fibronectine sont réalisées dans les conditions optimales de culture : 37°C et 5% de CO₂.

I. CARACTERISATION DE L'ACCESSIBILITE DES SITES DE LIAISON DE LA FIBRONECTINE

I. A. Accessibilité du domaine d'affinité pour la gélatine

La fibronectine est une protéine modulaire qui contient des séquences d'affinité à différents partenaires. Parmi ces séquences se trouve le domaine de liaison à la gélatine (GBD, *Gelatin binding domain*) de 42 kDa formé des domaines I₆₋₉ et qui permet à la fibronectine de se lier au collagène. Cette séquence GBD correspond également à une des séquences d'auto-assemblage de la fibronectine. C'est pourquoi l'accessibilité de cette séquence GBD une fois la fibronectine agrégée a été étudiée par chromatographie d'affinité (Figure 61). L'analyse des résultats montre que l'affinité des agrégats pour la gélatine n'est pas modifiée si la fibronectine est incubée à 49°C, alors qu'elle diminue avec l'élévation de la température d'assemblage à 55°C et 70°C par rapport à la fibronectine plasmatique native. La perte d'affinité est d'environ 45% pour les agrégats formés à 55°C alors qu'elle est d'environ 65% pour les agrégats formés à 70°C par rapport à la fibronectine native.

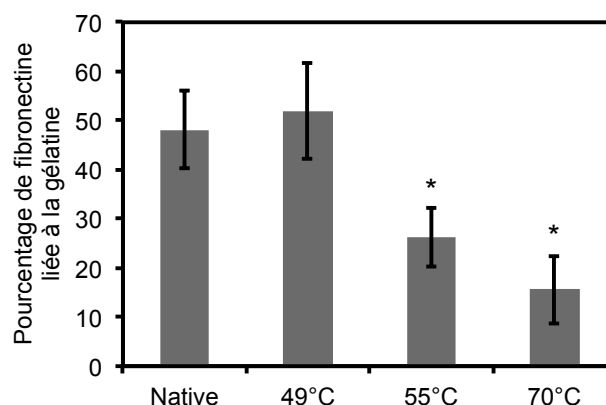


Figure 61 : Accessibilité des sites d'affinité à la gélatine de la fibronectine native ou agrégée

La fibronectine est incubée 24h à 49°C, 55°C et 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm. L'accessibilité des sites est déterminée par affinité à la gélatine en système batch. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- SEM. * p < 0.05.

I. B. Accessibilité de la séquence RGD

Les cellules adhèrent à la fibronectine en partie grâce à la reconnaissance de la séquence RGD située dans le module III₁₀. Ainsi, l'accessibilité de cette séquence dans la fibronectine agrégée a été déterminée par test ELISA pour différentes quantités de protéine pour lesquelles une réponse linéaire du signal en fonction de la quantité en fibronectine a été observée avec la fibronectine native (Figure 62.a).

La fibronectine incubée 24h à 49°C présente un profil d'accessibilité de ses séquences RGD similaire à celui de la fibronectine native (Figure 62.b). Dans le cas des agrégats assemblés à 55°C, on observe une perte de cette accessibilité de 80 à 90%. La perte d'accessibilité est totale pour les agrégats formés à 70°C.

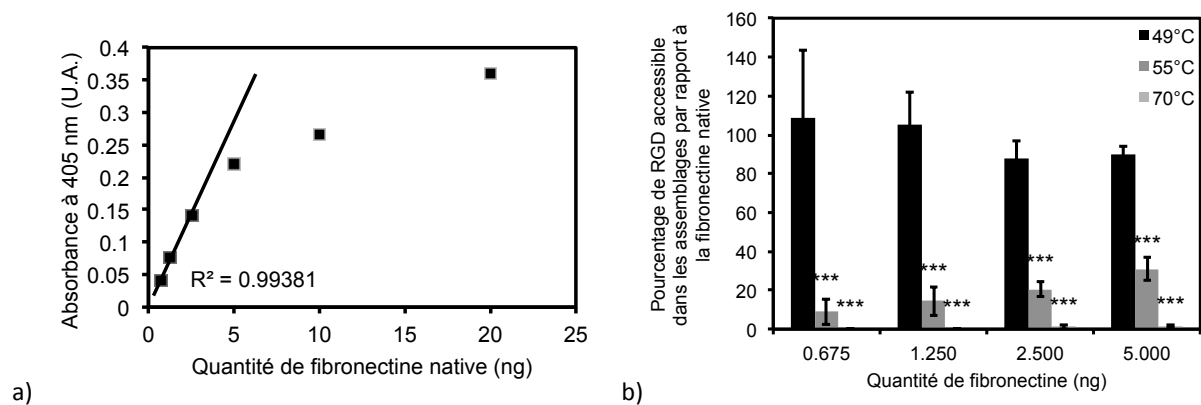


Figure 62 : Accessibilité de la séquence RGD de la fibronectine native ou agrégée

La fibronectine est incubée 24h à 49°C, 55°C et 70°C sous agitation orbitale de 600 rpm. Puis l'accessibilité des sites RGD est déterminée par test ELISA. a) Gamme étalon du dosage des séquences RGD de la fibronectine native. b) Accessibilité des sites RGD déterminée par test ELISA pour différentes quantités de fibronectine. Les résultats sont présentés en pourcentage de RGD détecté pour chaque forme de fibronectine par rapport à la fibronectine native. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes en triplet +/- SEM. *** correspond à $p < 0.005$.

Les tests d'affinité et les tests ELISA montrent que l'agrégation de la fibronectine modifie son interaction avec deux de ses partenaires.

L'analyse des agrégats de fibronectine par électrophorèse a montré que le processus d'agrégation est partiel à 55°C. Il existe un mélange entre fibronectine native et fibronectine agrégée. Par contre, toutes les molécules de fibronectine sont incorporées dans les agrégats formés à 70°C. Ainsi, les sites RGD et GBD accessibles de la fibronectine agrégée à 55°C pourrait correspondre aux sites des molécules de fibronectine non-incorporées dans les agrégats. Néanmoins, l'analyse par spectrométrie de masse et les cinétiques d'assemblage de la fibronectine ont montré que deux populations de fibronectine sont formées aux cours du processus d'agrégation. Le masquage partiel des sites RGD pourrait donc correspondre à la différence d'accessibilité de la séquence RGD dans les deux populations d'agrégats. Une des populations pourrait avoir une accessibilité de ses sites altérée alors que la deuxième ne serait pas modifiée.

L'absence de détection des sites RGD et la très faible accessibilité des séquences d'affinité à la gélatine de la fibronectine agrégée à 70°C sont probablement dues à l'incorporation de toutes les molécules de fibronectine dans les agrégats. Ces résultats semblent montrer que la perte

d'accessibilité à ces deux séquences est probablement due à un enfouissement des séquences au sein des agrégats.

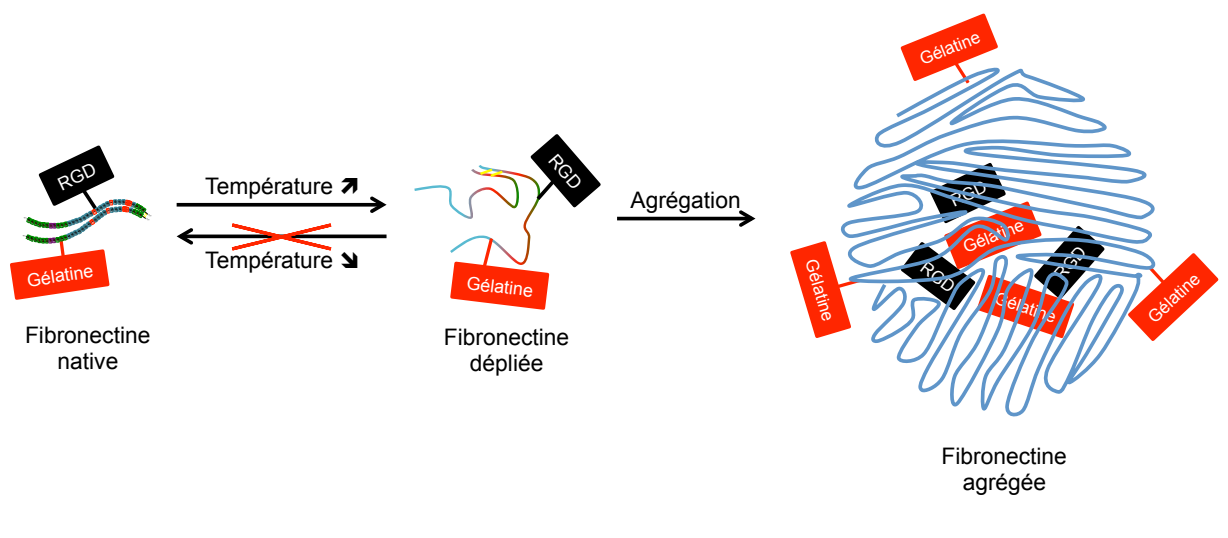
La séquence d'affinité à la gélatine de la fibronectine est située dans la partie amino-terminale de la protéine et comprise dans les modules I₆₋₉ (cf. Revue bibliographique, Partie 3, I. B. 1, Figure 31). Cette partie amino-terminale contient également des séquences d'auto-assemblage de la fibronectine (cf. Revue bibliographique, Partie 3, I. B. 2). Ainsi, la perte d'affinité à la gélatine pourrait être concomitante à l'agrégation de la fibronectine. La séquence RGD se trouve également dans un site cryptique d'auto-assemblage. En effet, cette séquence se trouve dans le module III₉ qui peut interagir avec le module III₁ (Pankov & Yamada 2002). Il est donc possible que cette séquence soit également impliquée dans une interaction permettant l'auto-assemblage de la fibronectine.

Contrairement à ce qui est observé ici, des études antérieures ont montré que la dénaturation de la fibronectine par l'urée permet de former des agrégats qui conservent leur affinité pour la gélatine (Patel et al. 2006). La fibronectine semble donc capable de former différents assemblages supramoléculaires dont les séquences d'auto-assemblage restent à mieux définir.

D'autre part, la séquence d'affinité à la gélatine contenue dans la fibronectine est un site de clivage de plusieurs protéases dont la plasmine ou la thrombine. C'est également une séquence d'interaction pour l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (Pankov & Yamada 2002). En conséquence, la reconnaissance des agrégats par les protéases et les intégrines pourrait être altérée.

En résumé :

L'accessibilité des séquences RGD de liaison aux cellules et GBD d'affinité à la gélatine est diminuée avec l'agrégation de la fibronectine.



II. CARACTERISATION DE L'INFLUENCE DES AGREGATS DE FIBRONECTINE SUR LES CELLULES

L'état de type amyloïde et la moindre accessibilité des deux sites d'interaction, RGD et GBD, pourraient modifier les interrelations cellules-fibronectine et les réponses cellulaires qui en découlent.

REMARQUE INTRODUCTIVE :

L'objectif du travail étant de déterminer l'effet des agrégats de la fibronectine sur le comportement cellulaire par rapport à la fibronectine sous sa forme native dimérique, il a fallu dès les prémices de l'étude s'interroger sur le choix du modèle cellulaire. L'influence des assemblages de protéines de type amyloïde est très souvent étudiée sur les cellules nerveuses en raison de leur implication dans les maladies neurodégénératives. Cependant, il a récemment été montré que des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose, notamment Bcl-xL ou p53 (Chenal et al. 2012; Ano Bom et al. 2012) (cf. Revue bibliographique, Partie 2, III. A), forment également des assemblages fonctionnels de type amyloïde dans les cellules cancéreuses. En outre, l'étude de Huang & al a montré que les assemblages fibrillaires de type amyloïde de fibronectine formés par sonication en présence de détergent altèrent la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes SKOV3 (Huang et al. 2010). Cette étude pouvait donc correspondre à un cas comparatif pour notre travail. Ainsi, le modèle cellulaire choisi pour notre étude est celui des cellules cancéreuses SKOV3.

D'autre part, ces cellules sont capables de remodeler la fibronectine et peuvent donc l'incorporer dans les réseaux matriciels et/ou la dégrader (Kenny et al. 2008). Ainsi, ces cellules seront sensibles à l'apport exogène de fibronectine.

Des études préliminaires ont également été réalisées sur les fibroblastes et les CHO K1 qui sont également capables de sécréter et/ou remodeler la fibronectine.

II. A. Analyse de la viabilité cellulaire

Nous avons dans un premier temps testé la viabilité des cellules SKOV3 en présence des agrégats formés à 70°C. Après 16h de culture, les résultats montrent que la viabilité cellulaire est inchangée y compris en présence de concentrations élevées d'agrégats de fibronectine (Figure 63.a). Ce résultat est reproductible sur des temps d'incubation plus long de 48h (Figure 63.b).

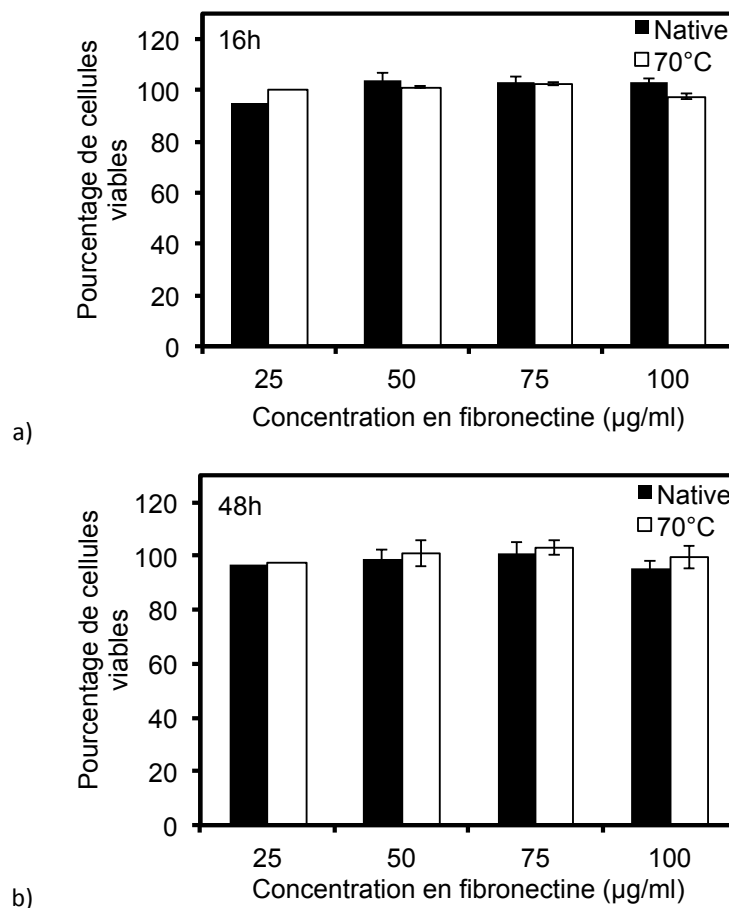


Figure 63 : Viabilité des cellules cancéreuses SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée

Les cellules SKOV3 sont cultivées 16h ou 48h en présence de différentes concentrations de fibronectine native ou agrégée à 70°C. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules viables par rapport au contrôle sans fibronectine. a) Viabilité à 16h. b) Viabilité à 48h. Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes en triplet +/- SEM.

Contrairement à ce que nous observons, les études menées par Huang & al ont montré que des assemblages fibrillaires de type amyloïde de la fibronectine formés par sonication en présence de SDS induisent l'apoptose des cellules SKOV3 (Huang et al. 2010). Compte tenu du caractère amyloïde des agrégats de fibronectine que nous obtenons, l'absence de cytotoxicité peut paraître surprenant. S'ils sont généralement cytotoxiques, les assemblages amyloïdes présentent une grande diversité de structures avec différents potentiels cytotoxiques (Marshall et al. 2014). Les assemblages formés dans notre étude sont différents de ceux de Huang & al : la fibronectine forme des agrégats et non des fibres, ce qui peut expliquer la différence de cytotoxicité. Ainsi, les deux morphologies d'assemblage, fibres et agrégats, pourraient générer des signaux topographiques différents auxquels les cellules répondraient différemment. McKeown-Long & al ont montré que la polymérisation de la fibronectine induit par l'anastelline empêche également la prolifération des cellules endothéliales (Ambesi et al. 2005; Ambesi & McKeown-Longo 2014). Ces données et nos résultats indiquent que malgré une structure commune en feuillets β intermoléculaires, la fibronectine peut former divers assemblages avec des effets cytotoxiques et cytostatiques différents.

D'autre part, s'ils ont longtemps été étudiés pour leur cytotoxicité, des études récentes tendent à montrer la formation d'assemblages amyloïdes dit « fonctionnels ». Par exemple, l'agrégation

amyloïde des protéines p53 inhibe leur fonction pro-apoptotique et confère aux cellules cancéreuses un potentiel oncogénique accrue (Xu et al. 2011; Ano Bom et al. 2012).

II. B. Analyse de l'incorporation matricielle

La fibronectine plasmatique soluble est incorporée dans les matrices solides au cours de la fibrillogenèse. Ce processus est essentiel pour qu'elle exerce ses effets régulateurs. Nous nous sommes donc intéressés à savoir si la fibronectine sous sa forme agrégée conserve sa capacité à être incorporée dans les matrices cellulaires. Pour cela, des cellules adhérentes ont été incubées en présence de fibronectine native ou agrégée à 70°C apportée en solution dans le milieu de culture. L'incorporation de la fibronectine a été analysée pour différents types cellulaires ayant des profils d'expression et de remodelage de la fibronectine différents : les fibroblastes de lignée BJ qui sécrètent et assemblent la fibronectine, les cellules épithéliales ovariennes saines de la lignée CHO K1 qui, dans nos conditions, n'expriment pas de fibronectine endogène mais sont capables de former un réseau matriciel à partir de fibronectine exogène et enfin les cellules cancéreuses ovariennes de lignée SKOV3 qui synthétisent peu la fibronectine mais la remodelent au cours des processus invasifs (Figure 64, colonne témoin).

Pour les fibroblastes BJ et les cellules CHO K1, on observe une incorporation matricielle importante de la fibronectine native suite à son ajout dans le milieu cellulaire (en rouge) (Figure 64, colonne 2). Dans le cas des cellules SKOV3, on observe que l'apport de fibronectine native en solution à une concentration de 50 µg/ml n'est pas suffisant pour la formation du réseau. Le réseau n'est visible qu'à partir d'un apport en fibronectine native à une concentration de 100 µg/ml. Ce réseau est plus important avec la concentration de 500 µg/ml (Figure 64, colonne 2).

En présence de fibronectine agrégée à 70°C, le réseau matriciel de fibronectine est atténuée quelle que soit la lignée considérée (Figure 64, colonne 3).

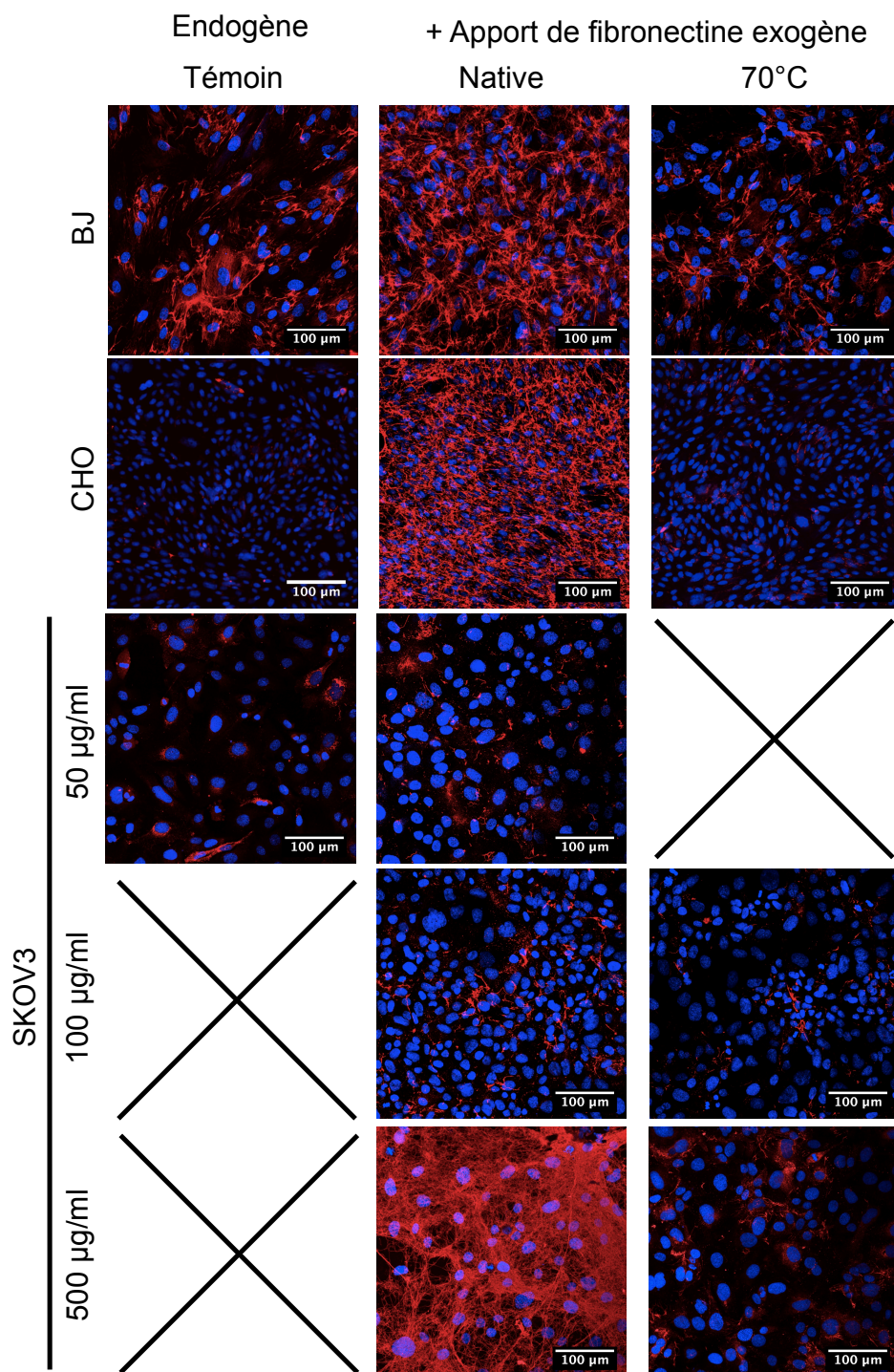


Figure 64 : Formation *in vitro* du réseau matriciel de fibronectine en présence ou non de fibronectine native ou agrégée

Les cellules adhérentes sont cultivées en présence de fibronectine native ou agrégée à 70°C. Les fibroblastes BJ et les cellules CHO K1 sont respectivement incubés en présence de fibronectine à 25 μg/ml et 50 μg/ml. Les cellules SKOV3 sont incubées en présence de fibronectine à 50, 100 ou 500 μg/ml. En bleu, marquage des noyaux au DAPI. En rouge, immunomarquage de la fibronectine (barre d'échelle : 100 μm). Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes et de trois champs d'acquisition.

Les cellules utilisées dans cette expérience expriment toutes les intégrines $\alpha 5\beta 1$ nécessaires à la fibrillogenèse (Robinson et al. 2003; Lobert et al. 2010; Peng et al. 2012). La fibrillogenèse est initiée en partie par ces intégrines $\alpha 5\beta 1$ qui reconnaissent la séquence RGD et les intégrines de la famille αv (Boregowda et al. 2012; Jia et al. 2012). Ainsi, l'altération de l'incorporation matricielle pourrait être le résultat de la perte d'accessibilité de ce site RGD.

Les cellules saines CHO K1 et fibroblastes BJ forment un réseau dense à partir de la fibronectine native alors que les cellules cancéreuses ovariennes SKOV3 le forme difficilement, sauf à très haute concentration en protéine. La capacité à faire de la fibrillogenèse ne dépend donc pas de l'expression de ces intégrines mais plutôt du phénotype cellulaire. La fibrillogenèse de la fibronectine est inversement proportionnelle aux capacités invasives des cellules (Sabari et al. 2011; Jia et al. 2012). La moindre fibrillogenèse observée avec les cellules SKOV3 pourrait être liée à leurs propriétés invasives. D'ailleurs, Kenny & al ont montré que la première étape de la dissémination des cellules SKOV3 est médiée par le clivage rapide de la fibronectine par les MMP-2, expliquant ainsi l'abondance de cette protéine dans le stroma et son absence dans les foyers tumoraux (Kenny et al. 2008).

Klein et Prabhakaran ont montré que l'anastelline, un fragment de la fibronectine impliqué dans sa polymérisation, peut se lier au réseau de fibronectine préexistant pour altérer son organisation (Klein et al. 2003; Prabhakaran et al. 2009). Dans notre étude, la forme agrégée de la fibronectine semble avoir un effet similaire et limite son incorporation dans les réseaux matriciels formés par les cellules. La fibronectine possède un rôle « stabilisateur/organisateur » de la matrice. La déstructuration de son réseau matriciel formé par les cellules mène à la désorganisation des réseaux d'autres molécules dont le collagène, la fibrine et la thrombospondine (Shi & Sottile 2008; Shi & Sottile 2011; Pereira et al. 2002; Sottile & Hocking 2002; Shi et al. 2010; Ramanathan & Karuri 2014). Ainsi, l'influence des agrégats de fibronectine dans l'organisation des différentes molécules de la matrice pourrait être suivi par immunomarquage et microscopie.

Ambesi & al ont montré que la modification du réseau de fibronectine en présence de l'anastelline impacte les comportements cellulaires en inhibant la prolifération des cellules endothéliales (Ambesi & McKeown-Longo 2014). Ainsi, la perte de l'incorporation matricielle des agrégats de fibronectine peut influencer d'autres comportements cellulaires dont l'adhérence et la migration cellulaire.

II. C. Analyse de l'adhérence et de l'étalement cellulaire

La capacité des cellules SKOV3 à adhérer sur la fibronectine a été déterminée par test colorimétrique au crystal violet.

La Figure 65.a montre que l'adhérence des cellules SKOV3 sur la fibronectine native est importante dès la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$. L'adhérence est maximale dès 5 $\mu\text{g/ml}$. Lorsque les cellules sont ensemencées sur un revêtement de fibronectine traitée à 49°C, le profil d'adhérence est similaire à celui sur recouvrement de fibronectine native.

Sur un revêtement à 1 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectine agrégée à 55°C, l'adhérence est diminuée de 55%. Néanmoins, avec l'augmentation de la concentration en fibronectine agrégée à 55°C, l'adhérence des cellules SKOV3 augmente.

En revanche, en présence des agrégats formés à 70°C, l'inhibition d'adhérence est de plus de 80% quelle que soit la concentration en fibronectine.

L'analyse par microscopie confocale des cellules SKOV3 adhérentes sur la fibronectine native après marquage du cytosquelette montre qu'elles s'étalent. Elles présentent une morphologie étalée caractéristique avec une organisation de l'actine corticale et sous forme de fibre de stress à 24h sur un coating de fibronectine native ou traitée à 49°C (Figure 65.b). Sur revêtement de fibronectine agrégée à 55 et 70°C, les cellules présentent des morphologies moins étalées.

La perte d'adhérence cellulaire est souvent associée à l'anoïkis (mort cellulaire par perte d'adhérence) (Paoli et al. 2013). Néanmoins, nous avons montré que les agrégats n'ont pas d'activité cytotoxique sur les cellules SKOV3 (Figure 63). Ainsi, les agrégats semblent entrainer un retard de l'adhérence et de l'étalement plutôt qu'une mort cellulaire.

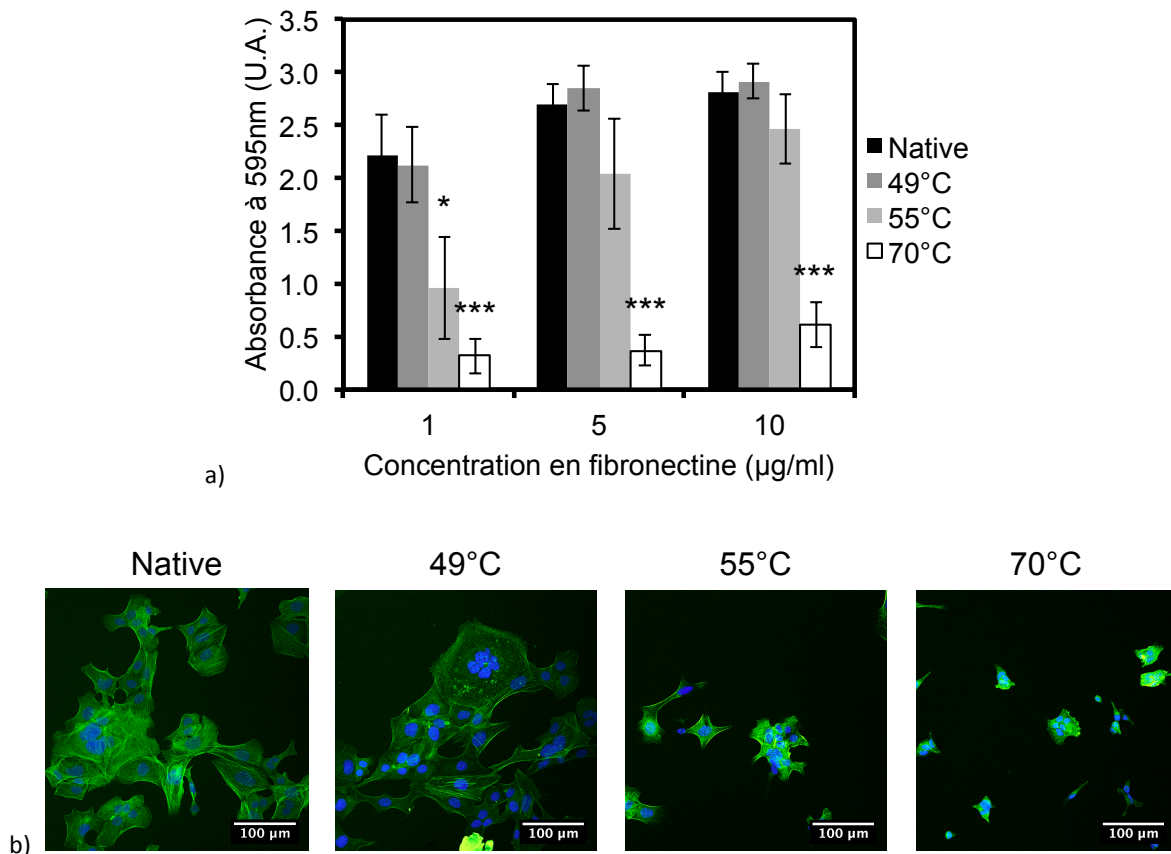


Figure 65 : Adhérence et étalement des cellules SKOV3 sur coating de fibronectine native ou agrégée

a) Adhérence des cellules SKOV3, après 15 minutes, sur revêtement de fibronectine native ou incubée à 49, 55 et 70°C à différentes concentrations. Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes en triplet +/- SEM. * correspond à $p < 0.01$ et *** à $p < 0.005$. b) Etalement des cellules SKOV3 observé par microscopie confocale après marquage du cytosquelette à la phalloïdine. Les cellules sont incubées 24h sur coating à 50 µg/ml de fibronectine native ou incubée à 49, 55 et 70°C. En bleu, marquage des noyaux au DAPI. En vert, marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine (barre d'échelle : 100 µm). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et trois champs d'acquisition.

La forme agrégée de la fibronectine pourrait mener à la formation d'un revêtement non-homogène. Ainsi, les tests d'adhérence ont également été réalisés avec apport exogène en solution de la fibronectine (Figure 66).

Dans ces conditions, le profil d'adhérence des cellules SKOV3 en présence de fibronectine exogène native ou incubée à 49°C est similaire.

L'adhérence des cellules SKOV3 en présence de fibronectine agrégée à 55°C est également similaire au profil d'adhérence en présence de fibronectine native. L'apport exogène en solution de la fibronectine agrégée à 55°C ne semble donc pas modifier l'adhérence des cellules SKOV3 pour des concentrations en fibronectine inférieures ou égales à 10 µg/ml.

La fibronectine agrégée à 70°C inhibe l'adhérence des cellules SKOV3 de 30-45% par rapport à la fibronectine native.

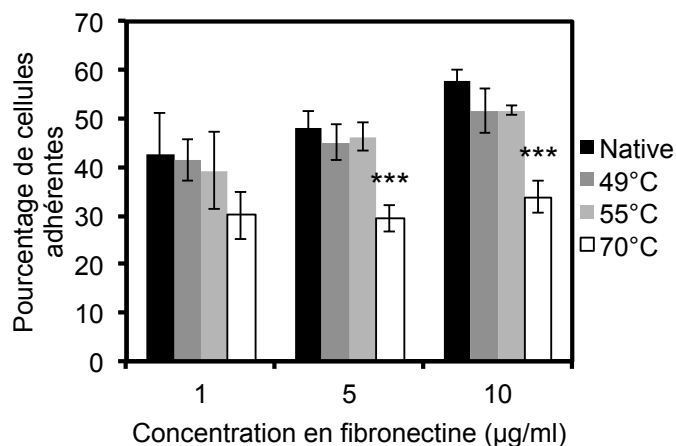


Figure 66 : Adhérence des cellules SKOV3 avec apport exogène en solution de fibronectine native ou agrégée
Adhérence des cellules SKOV3, après 1h, en présence de fibronectine exogène native ou incubée à 49, 55 et 70°C à différentes concentrations. Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes en triplet +/- SEM. *** $p < 0.005$.

L'influence des agrégats de fibronectine en solution sur la morphologie cellulaire a été étudiée par microscopie. Pour cela, les cellules SKOV3 sont cultivées dans les conditions optimales de culture pendant 6h. Suite à leur adhérence, les cellules sont privées de sérum pendant une nuit puis cultivées en présence de fibronectine à 25 µg/ml pendant 6h.

Les clichés de microscopie montrent que les cellules SKOV3 ont une morphologie étalée en présence de fibronectine native (Figure 67.a). Par contre, en présence d'agrégats les cellules ont une morphologie plus étirée. Le CSI (*cell shape index*) ou indice de morphologie cellulaire a été déterminé (Figure 67.b). Un indice de 1 reflète une cellule étalée circulaire, alors qu'un indice de 0 correspond à une cellule étirée.

Le pourcentage de cellules étalées circulaires (en rouge sur l'histogramme) est similaire lorsque les cellules sont cultivées en présence de fibronectine native ou agrégée à 70°C. En revanche, le pourcentage de cellules étirées (en vert sur l'histogramme) augmente significativement de 22% en présence de fibronectine native à 34% en présence de la fibronectine agrégée à 70°C. Cela indique que les agrégats favorisent la formation d'une sous-population cellulaire à morphologie allongée.

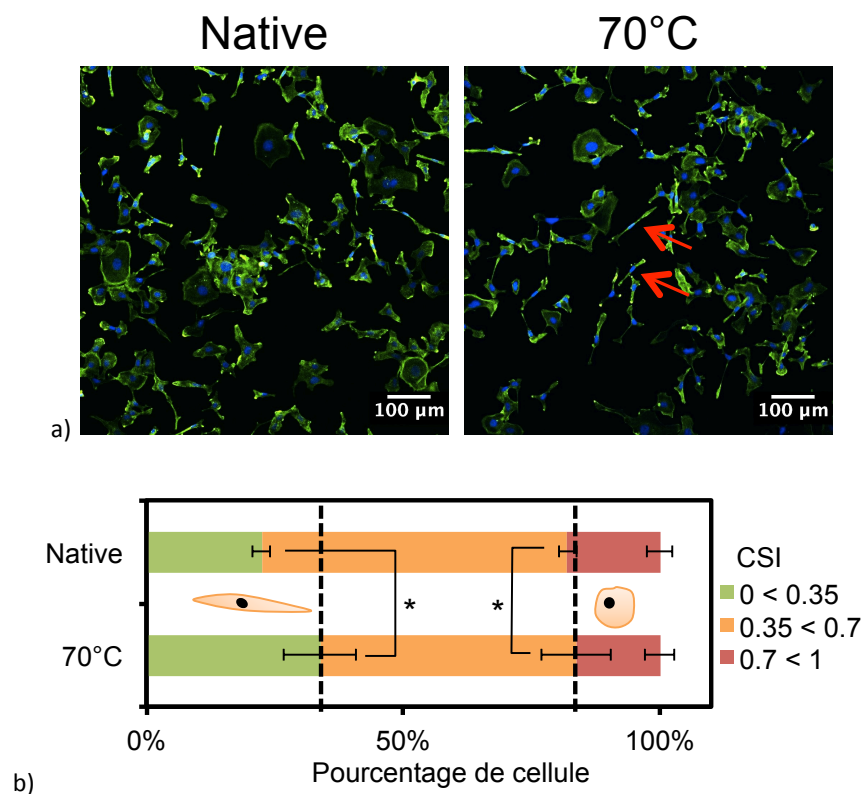


Figure 67 : Morphologie des cellules SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée

Les cellules SKOV3 adhérentes sont privées de sérum pendant une nuit puis cultivées pendant 6h en présence de 25 µg/ml de fibronectine native ou agrégée à 70°C. a) Morphologie des cellules SKOV3 observée par microscopie confocale. En bleu, marquage des noyaux au DAPI. En vert, marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine (barre d'échelle : 100 µm). b) Indice de morphologie des cellules SKOV3. L'analyse a été effectuée sur un total de 317 (fibronectine native) et 322 (fibronectine agrégée) cellules à partir de trois expériences indépendantes. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences +/-SEM. * correspond à $p < 0.01$.

En conclusion, le changement de conformation de la fibronectine en assemblage supramoléculaire de type amyloïde altère l'adhérence et l'étalement cellulaire.

Les résultats d'adhérence ont montré des différences entre le recouvrement (*coating*) et l'apport exogène en solution de fibronectine. L'inhibition de l'adhérence en présence de fibronectine agrégée à 55°C et 70°C est plus importante sur un revêtement. Une partie de l'inhibition d'adhérence est restaurée en présence de fibronectine exogène. Cela semble confirmer que la forme supramoléculaire empêche le revêtement de la fibronectine ou alors mène à la formation d'un recouvrement non-homogène. Ces éventuelles variations dans la capacité d'adsorption au support pourraient être dûes aux modifications des charges exposées dans les différentes conformations de la protéine ou alors, pourraient être dû à une modification de la capacité de la fibronectine à subir des changements de conformations lui permettant de s'adsorber (Pellenc et al. 2006; Baujard-Lamotte et al. 2008).

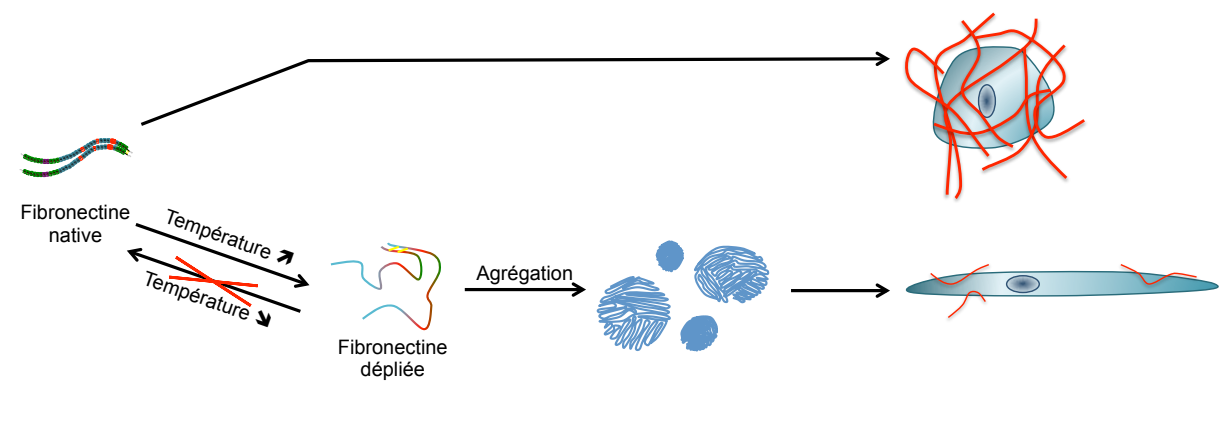
Sur la fibronectine agrégée à 70°C, qui présente une perte d'accessibilité au site RGD totale, une inhibition de l'adhérence des cellules SKOV3 est observée de façon partielle. Ainsi cette perte d'adhérence peut être due à l'altération de l'accessibilité des sites RGD. Néanmoins, même si la séquence RGD est l'une des séquences d'interaction aux cellules la plus importante, la fibronectine possède de nombreuses autres séquences d'interaction avec de nombreuses intégrines, ce qui peut

expliquer l'inhibition de l'adhérence qui n'est que partielle (Synthèse bibliographique, Partie 1, II. A. 2). La fibronectine possède par exemple un site synergique dans le module III₉ nécessaire pour une interaction optimale des intégrines $\alpha 5\beta 1$ avec la fibronectine (Pankov & Yamada 2002). Une caractérisation de l'accessibilité de cet épitope dans les agrégats serait intéressante.

Les agrégats de fibronectine semblent influencer la capacité d'étalement des cellules. En outre, la fibronectine agrégée à 70°C favorise l'apparition d'une population de cellules étirées. Les cellules SKOV3 ont un phénotype intermédiaire entre le phénotype épithélial et mésenchymateux et peuvent donc basculer d'un des côtés du spectre épithéliale/mésenchymateux en fonction du microenvironnement (Carduner et al. 2014). La forme étirée des cellules en présence des agrégats suggère un basculement vers un phénotype mésenchymateux (Lee 2006). Le passage vers un phénotype de type mésenchymateux suggère donc que les cellules SKOV3 pourraient subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en présence des agrégats de fibronectine. Il existe des marqueurs moléculaires, notamment les N- et E-cadhérines, dont l'expression reste à étudier afin de confirmer l'éventuelle TEM des cellules (Synthèse bibliographique, Partie 1, III. C. 1).

En résumé :

Malgré les caractéristiques de type amyloïde des agrégats, la fibronectine agrégée ne possède pas d'activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses ovariennes SKOV3. L'incorporation de la fibronectine agrégée à 70°C dans les réseaux matriciels formés *in vitro* par les cellules est atténuée. La fibronectine agrégée inhibe l'adhérence des cellules SKOV3 mais favorise des changements de morphologie en permettant la formation d'une sous-population cellulaire allongée.



III. CARACTERISATION DE L'INFLUENCE DES AGREGATS DE FIBRONECTINE SUR LA MIGRATION CELLULAIRE

Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses ont un comportement migratoire plus important. Ainsi, la migration des cellules SKOV3 a été suivie en présence des agrégats de fibronectine.

III. A. Comblement de blessure par les cellules SKOV3

Les cellules SKOV3 sontensemencées de sorte à laisser une surface libre calibrée dans le tapis cellulaire (Figure 68.a). Le pourcentage de comblement de cette surface au cours du temps est déterminé (Figure 68.a et b). Les résultats montrent que le pourcentage de comblement est similaire en présence des agrégats ou de la forme native de la fibronectine et ce quelle que soit la concentration en fibronectine testée.

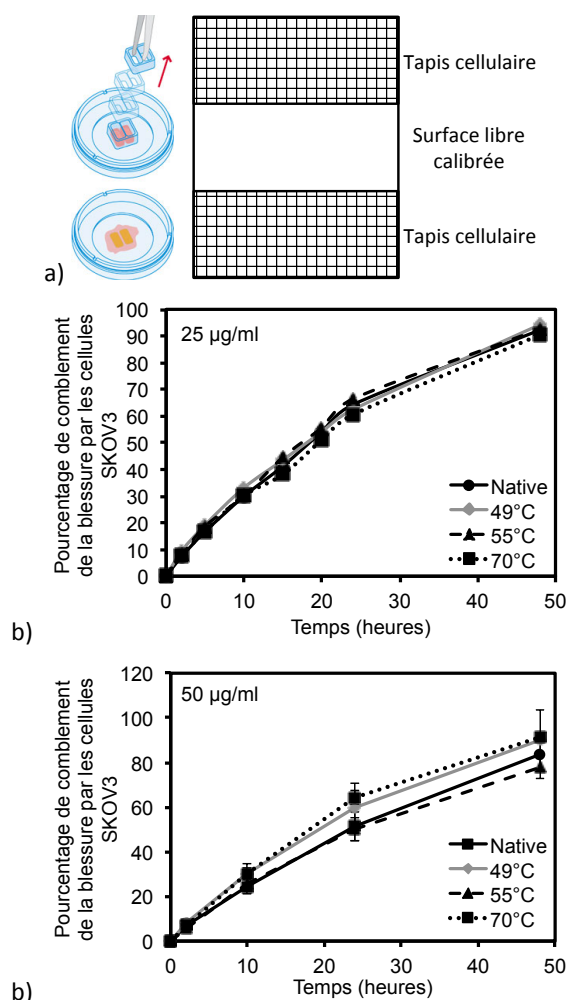


Figure 68 : Pourcentage de comblement par les cellules en présence de fibronectine native ou agrégée

a) Représentation du système permettant de générer deux tapis cellulaires séparés par un espace libre de surface calibrée. La migration des cellules au sein de l'espace libre est analysée pendant 48h. Le pourcentage de comblement est déterminé en mesurant la surface de la blessure à différents temps en présence de 25 µg/ml (b) ou 50 µg/ml (c) de fibronectine native ou incubée à 49, 55 et 70°C. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes en duplicata +/- ecartype.

III. B. Analyse du profil de migration

Si la cinétique de comblement par les cellules ne varie pas, l'étude de l'étalement cellulaire montre des différences de morphologie cellulaire. Ainsi, nous sommes intéressés ici à l'étude de l'influence de cette modification de morphologie sur le déplacement des cellules en présence de fibronectine agrégée à 70°C.

Un marquage du cytosquelette à la phalloïdine (en vert) a été réalisé afin d'observer les morphologies des cellules au cours de la migration. Les cellules en présence de fibronectine native semblent avoir une **migration collective en feuillet** (Figure 69.b, flèche en rouge). Les cellules restent cohésives entre elles. Par contre, en présence de fibronectine agrégée à 70°C, les cellules semblent avoir une **migration individualisée** (Figure 69.c, flèches rouges). Les images de microscopie montrent des cellules de **morphologie étirée**, qui se **détachent du front de migration** et se **dispersent** dans l'espace libre avec des **orientations cellulaires différentes** les unes des autres. Ces images semblent montrer le caractère **dispersif** et **aléatoire** de la migration cellulaire en présence des agrégats de fibronectine.

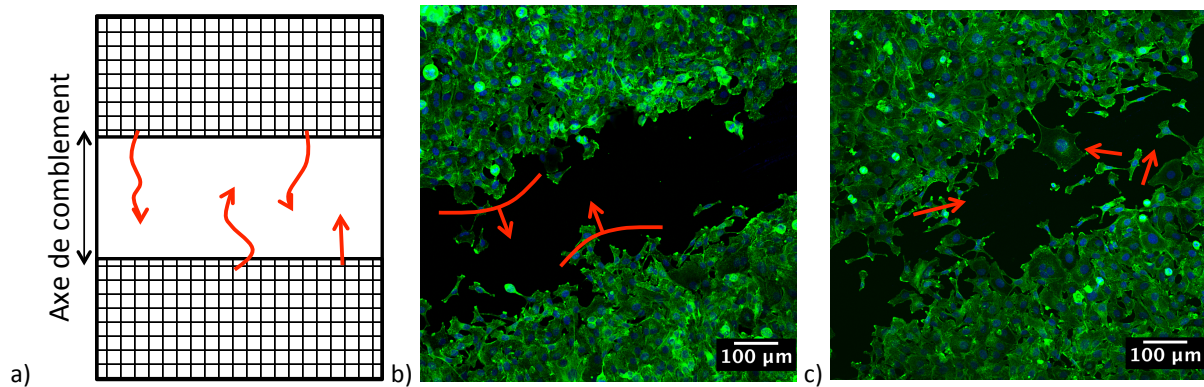


Figure 69 : Marquage des cellules en migration en présence de fibronectine native ou agrégée

a) Représentation schématique du déplacement des cellules au sein d'une surface libre. Les cellules en présence de 25 µg/ml de fibronectine native (b) ou agrégée à 70°C (c) sont observées par microscopie confocale après 6h de migration. En bleu, marquage des noyaux au DAPI. En vert, marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine (barre d'échelle : 100 µm).

A partir des tests de blessure, le chemin de déplacement individuel des cellules a été suivi pendant 24h (Figure 70). Sur les représentations graphiques, chaque ligne correspond au chemin de déplacement d'une cellule. Le profil de déplacement en présence de fibronectine native révèle ainsi que les cellules ont une **migration plutôt directionnelle** (Figure 70.a) avec un **champ de déplacement étroit** : près de 60% des cellules migrent entre +/- 20° par rapport à l'axe du comblement (Figure 70.c). En présence de fibronectine agrégée à 70°C, le profil de migration semble plus **aléatoire** (Figure 70.b) et le **champ de déplacement est plus large** avec 45% des cellules qui migrent entre +/- 20° et 50% des cellules qui migrent entre +/- 20-40° par rapport à l'axe de comblement. La structure supramoléculaire de type agrégat de la fibronectine semble donc induire une migration aléatoire des cellules SKOV3.

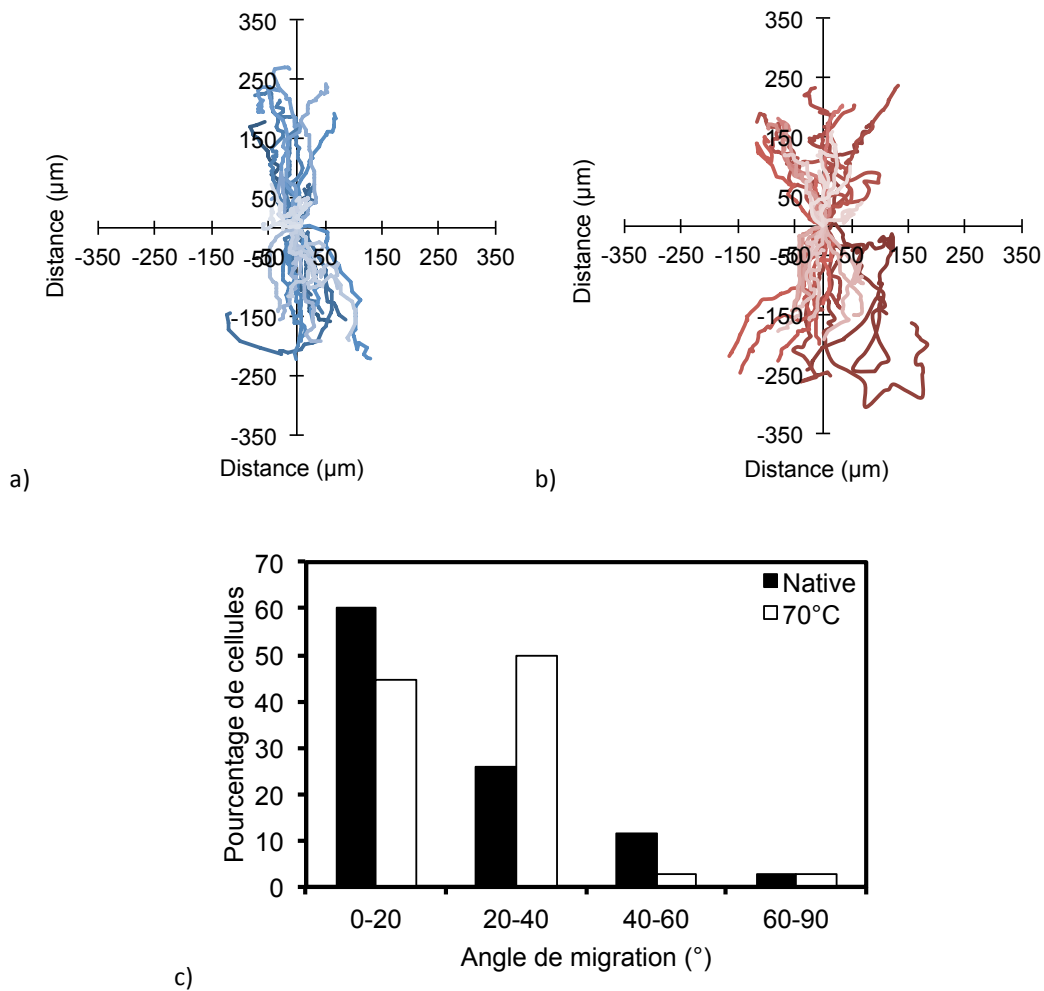


Figure 70 : Profil de migration et champ de déplacement des cellules SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée

Le chemin et le champ de déplacement individuel des cellules au sein d'une blessure de surface libre calibrée sont quantifiés pendant 24h en présence de 25 µg/ml de fibronectine native ou agrégée à 70°C. a) Profil de migration en présence de fibronectine native. b) Profil de migration en présence de fibronectine agrégée à 70°C. c) Pourcentage de cellules ayant migré dans le champ de déplacement entre 0-20, 20-40, 40-60 et 60-90° par rapport à l'axe de comblement de la blessure. L'analyse a été effectuée sur un total de 35 (fibronectine native) et 36 (fibronectine agrégée) cellules à partir de trois expériences indépendantes en duplicata.

A partir des profils de migration, la **persistance de migration**, la **distance moyenne** parcourue par jour, ainsi que la **vitesse de migration** des cellules SKOV3 ont pu être déterminées. La persistance permet de déterminer le **degré de tortuosité** dans le déplacement des cellules (Figure 71.a). Une persistance de 1 correspond à une migration directionnelle tandis qu'une persistance plus proche de 0 correspond à une migration aléatoire. Dans les conditions de l'étude, les valeurs montrent que la persistance, proche de 1, est peu modifiée en présence de fibronectine agrégée par rapport à la fibronectine native. Ainsi, ensemble avec les profils de migration, ce résultat suggère que les assemblages de fibronectine induisent une **dispersion** des cellules SKOV3 à partir du tapis cellulaire plutôt qu'une migration aléatoire.

Les Figure 71.b et c montrent que la distance parcourue par les cellules et leur vitesse de migration en présence d'agrégats de fibronectine sont plus importantes. La vitesse de migration augmente de 9.1 à 12.3 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Figure 71.b) et les cellules parcourent en moyenne 75 μm de plus en 24 heures par rapport à la présence de fibronectine native.

Ainsi, les agrégats de type amyloïde de la fibronectine modifient le profil de migration des cellules vers une migration **individualisée** et **disperse** avec une **vitesse de migration** et une **distance parcourue moyenne** accrues par rapport à la présence de fibronectine native.

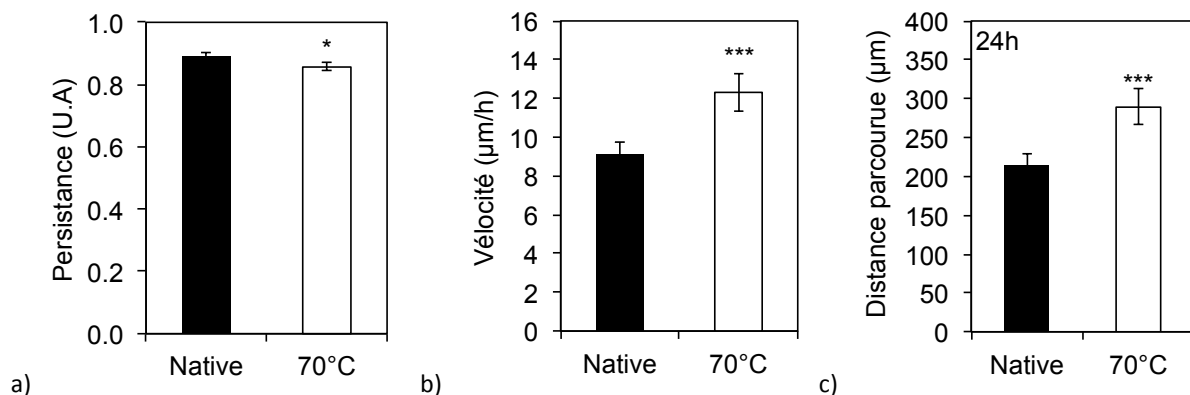


Figure 71 : Persistance, vélocité et distance parcourue des cellules SKOV3 en présence de fibronectine native ou agrégée

La persistance (a), la vitesse de déplacement (b) et la distance moyenne parcourue (c) par les cellules sont quantifiées pendant 24h en présence de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibronectine native ou agrégée à 70°C après avoir réalisé une blessure de surface calibrée dans la monocouche de cellules. *** $p < 0.005$. L'analyse a été effectuée sur un total de 35 (fibronectine native) et 36 (fibronectine agrégée) cellules à partir de trois expériences indépendantes en duplicata.

Au sein du laboratoire, il a été montré que le phénotype mésenchymateux est associé à une accentuation de la migration des cellules SKOV3 (Carduner et al. 2014). Dans notre étude, les cellules SKOV3 en présence des agrégats ont une migration accélérée, individualisée et disperse. Or, Morla & al ont montré que la superfibronectine, un assemblage fibrillaire de la fibronectine formé en présence de l'anastelline et maintenu par des feuilletts β intermoléculaires, favorise l'adhérence et diminue la migration (Morla et al. 1994). Les assemblages formés dans notre étude sont différents de ceux de Morla & al. La fibronectine forme des agrégats et non des fibres dans notre étude, ce qui peut expliquer la modification dans le comportement migratoire. Ainsi, les cellules répondent différemment aux deux morphologies d'assemblage de la fibronectine malgré leur caractéristique commune de type amyloïde.

L'absence de différences dans les cinétiques de comblement d'une surface en présence de fibronectine native ou agrégée peut paraître surprenante. Néanmoins, les travaux récents de Weiger & al ont montré que l'étude du profil de déplacement et de l'orientation du trajet de migration peut apporter des informations complémentaires expliquant les comportements des cellules cancéreuses (Weiger et al. 2013). Nos résultats sont en accord avec cette étude qui montre que les cellules tumorigènes ne migrent pas plus loin que les cellules saines mais ont une migration moins directionnelle (Weiger et al. 2013).

La direction de migration des cellules est contrôlée par la combinaison de la topographie de surface, l'expression des intégrines et l'expression de protéases. Sur des supports fibrillaires de fibronectine, si la séquence RGD d'ancrage cellulaire n'a pas de rôle dans le contrôle de l'orientation de la migration, elle interviendrait en revanche sur la vitesse de migration (Corall et al. 2014). Dans notre étude, nous avons montré que l'accessibilité à la séquence RGD de la fibronectine agrégée à 70°C est inhibée et que la vitesse de migration augmente. Contrairement à l'étude de Corall & al, l'augmentation de la vitesse de migration en présence des agrégats de fibronectine serait donc indépendante de cette séquence RGD.

Nous avons montré qu'en présence de fibronectine agrégée les cellules ont une morphologie étirée et une migration moins directionnelle. Néanmoins, sur des revêtements de fibronectine, l'expression des MT1-MMP est nécessaire pour favoriser l'orientation directionnelle et la vitesse de migration des cellules (Corall et al. 2014). Kwon & al ont également montré que les cellules SKOV3 ont un profil d'invasion de type mésenchymateux et dégradation dépendant plutôt qu'amiboïde (Kwon et al. 2011). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des protéases afin de déterminer leur rôle dans la perte de l'orientation en présence des agrégats de fibronectine dans notre étude.

Nous avons montré par microscopie que la fibronectine native est incorporée dans les réseaux matriciels fibrillaires formés par les cellules alors que les agrégats ne le sont pas. Or, Sabari et Jia ont montré que la fibrillogenèse de la fibronectine empêche la dispersion des cellules cancéreuses (Sabari et al. 2011; Jia et al. 2012). La capacité accrue des cellules à se disperser à partir du tapis cellulaire confluent peut donc s'expliquer en partie par l'altération du réseau de fibronectine en présence des agrégats. Les résultats de pourcentage de comblement d'une surface montrent que, malgré la vitesse et la distance parcourue accrues, la surface comblée dans les conditions de l'étude et dans un environnement confiné est identique entre la fibronectine native et agrégée. Dans un environnement différent plus large et en 3D, les agrégats de fibronectine pourraient permettre une meilleure dispersion des cellules dans des espaces plus larges et plus distants.

III. C. Localisation des intégrines de la famille αv et $\beta 1$ au cours de la migration

La migration des cellules est médiée, entre autre, par le trafic des intégrines et la dynamique des structures d'adhérence. De nombreuses études montrent que la différence dans le profil de migration collective vs individuelle et directionnelle vs aléatoire est en partie due à une modification du trafic des intégrines. Ainsi, la répartition cellulaire des intégrines de la famille αv et $\beta 1$, qui sont les principales impliquées dans l'interaction cellule-fibronectine, a été déterminée afin d'étudier leur devenir au cours de la migration.

La localisation des intégrines de la famille αv et $\beta 1$ au cours de la migration a été suivie en *pulse-chase* par microscopie confocale (Figure 72). Après avoir fait une blessure dans le tapis cellulaire confluent, les cellules sont incubées en présence d'anticorps dirigés contre les intégrines pendant 30 minutes. Après rinçage, les cellules sont cultivées en présence de 25 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectine native ou agrégée à 70°C pendant 6h.

L'immunomarquage montre qu'au début de la migration, les intégrines de la famille αv sont localisées dans des structures sous formes de tirets à la périphérie des cellules (Figure 72, marquage rouge). Ces intégrines sont donc localisées dans les **contacts focaux au niveau du front de migration**. Après 6h de migration en présence de fibronectine native, les intégrines de la famille αv sont toujours localisées dans ces structures. Par contre, en présence de fibronectine agrégée à 70°C, la localisation de ces intégrines dans les contacts focaux est atténuée. Une fluorescence rouge périnucléaire plus importante qu'au début de la migration est observée. Cela suggère une **déstabilisation des contacts focaux** constitués des intégrines de la famille αv et une éventuelle **internalisation** de ces dernières.

Les intégrines de la famille $\beta 1$ ont une localisation péricellulaire au début de la migration (Figure 72, marquage rouge). Cette localisation est conservée après 6h de migration en présence de fibronectine native. Par contre en présence de fibronectine agrégée à 70°C, on observe un **marquage des intégrines de la famille $\beta 1$ qui semble être en « gradient »**. Le marquage des intégrines est faible au niveau du front avant et s'intensifie vers le front arrière de la cellule en migration. On observe également une localisation périnucléaire des intégrines de la famille $\beta 1$. Ces résultats suggèrent une **internalisation et/ou une relocalisation** des intégrines de la famille $\beta 1$ vers le front arrière.

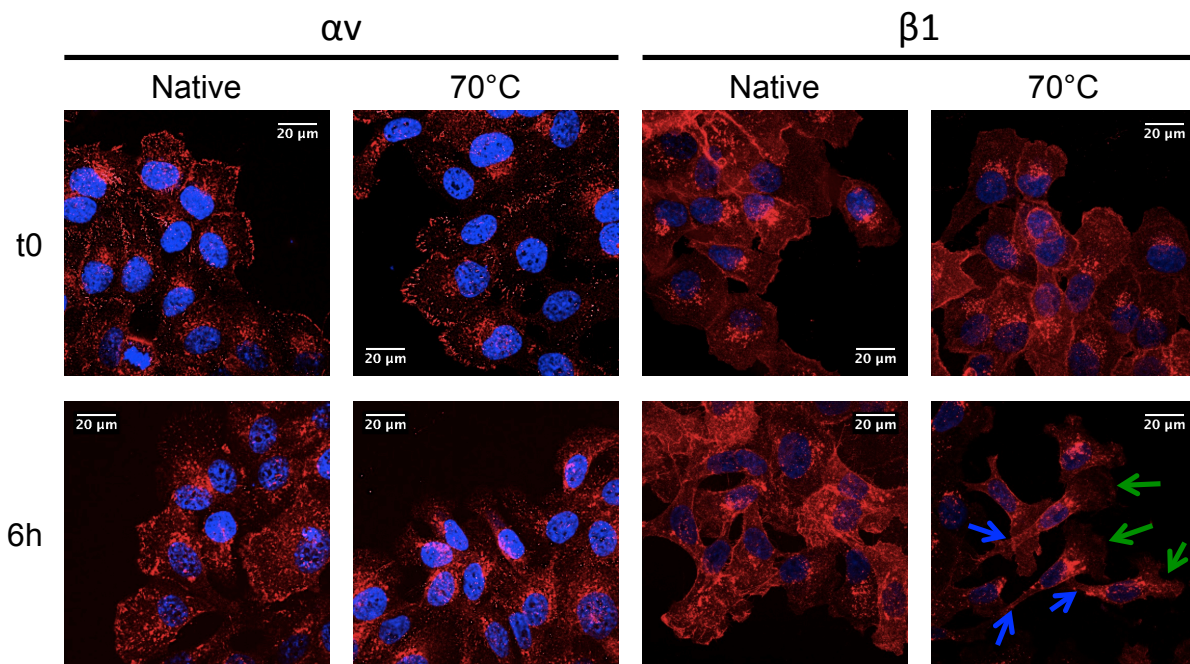


Figure 72 : Localisation des intégrines de la famille αv et $\beta 1$ dans les cellules en migration en présence de fibronectine native ou agrégée

Les cellules SKOV3 sont observées après 6h de migration en présence de 25 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectine native ou agrégée à 70°C. Le trafic des intégrines de la famille αv et $\beta 1$ est suivi par une expérience de « *pulse-chase* » avec l'anticorps primaire anti-intégrine αv et $\beta 1$. Les flèches vertes et bleues pointent respectivement le front avant et le front arrière des cellules en migration. En bleu, marquage des noyaux au DAPI. En rouge, marquage des intégrines (barre d'échelle : 20 μm).

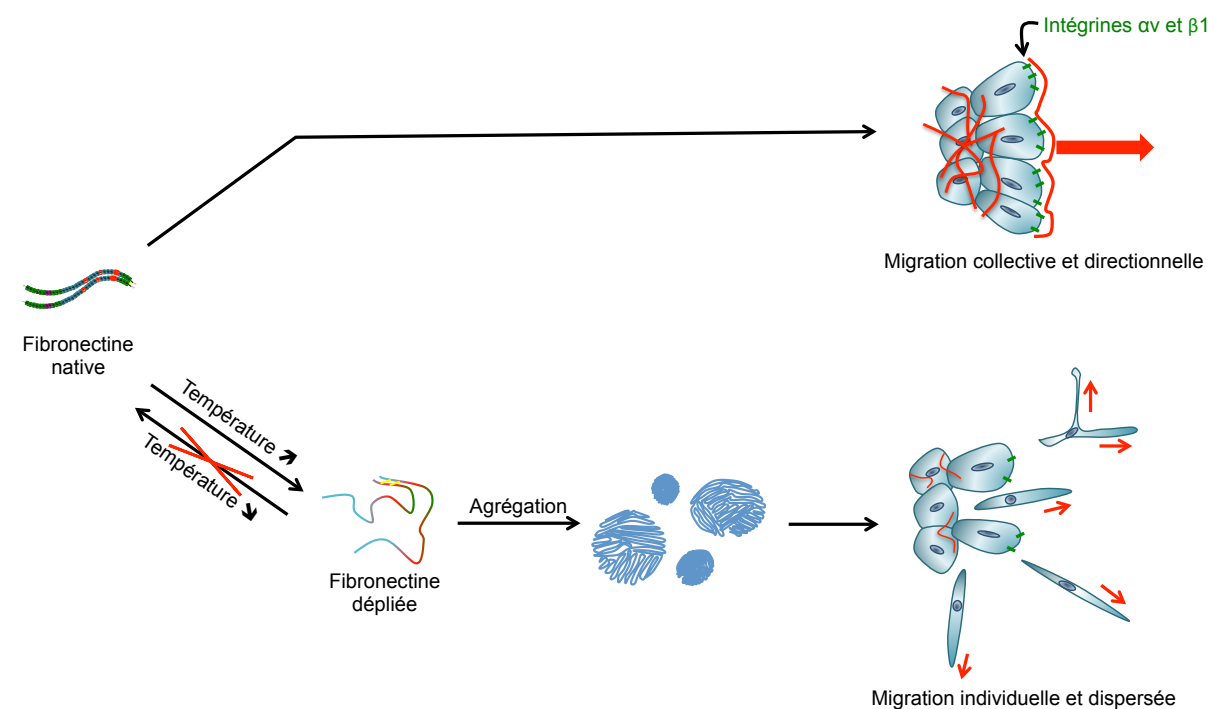
Des études antérieures ont montré que les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$ sont toutes les deux impliquées dans la migration collective alors que seules les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ sont impliquées dans la migration isolée (Ray et al. 2014). De plus, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ interviennent dans la migration aléatoire et/ou dans la suppression des capacités de dispersion et d'invasion des cellules (Sabari et al. 2011; Jia et al. 2012) alors que les intégrines $\alpha v \beta 3$ interviennent quant à elles dans la migration directionnelle (Danen et al. 2005). Ainsi, la migration dépend du trafic intracellulaire et de la localisation spatio-temporelle des intégrines à la surface membranaire. Suite à leur internalisation, les intégrines peuvent être dégradées dans les différents compartiments du système lysosomal ou peuvent être recyclées vers la surface membranaire (Petrie et al. 2009). Dans notre étude, en présence de fibronectine native, nous retrouvons une localisation membranaire des intégrines de la famille αv suggérant qu'elles sont stabilisées au niveau de la membrane plasmique, alors qu'en présence de la fibronectine agrégée, elles ont une localisation périnucléaire suggérant leur internalisation. En présence de fibronectine agrégée, les intégrines $\beta 1$ semblent quant à elles être internalisées et/ou relocalisés vers le front arrière des cellules où elles sont stabilisées. Ces résultats semblent aller dans le même sens que les études antérieures et montrent que les agrégats de fibronectine favoriseraient une migration moins directionnelle des cellules SKOV3.

Il a été montré que les syndécans-4 interviennent dans le contrôle du trafic des intégrines pour permettre une migration rapide et directionnelle des cellules (Bass et al. 2007; Morgan et al. 2007; Morgan et al. 2013). Sur un revêtement de fibronectine, la phosphorylation des syndécans-4 mène au recyclage des intégrines $\alpha v \beta 3$ vers la membrane plasmique au détriment des intégrines $\alpha 5 \beta 1$.

Cette stabilisation des complexes focaux constitués des intégrines $\alpha\beta 3$ favorise la migration directionnelle des cellules. Par contre, la déphosphorylation des syndécanes-4 mène à l'expression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ à la surface cellulaire et inhibe la migration cellulaire. Dans notre étude, les syndécanes-4 pourrait donc intervenir dans le contrôle du trafic des intégrines en présence de la fibronectine agrégée pour favoriser leur internalisation, et il serait intéressant d'étudier leur contribution.

En résumé :

La fibronectine native favorise la migration collective et directionnelle des cellules SKOV3 alors qu'en présence de fibronectine agrégée, les cellules se dispersent et migrent de façon plus isolée et moins directionnelle. En présence des agrégats, les cellules ont une distance parcourue moyenne et une vitesse de migration accrue. L'internalisation des intégrines de la famille $\alpha\nu$ et la relocalisation des intégrines de la famille $\beta 1$ au sein des cellules semblent associées à cette migration dispersée.



CONCLUSION - PERSPECTIVES

La fibronectine plasmatique humaine entière est une glycoprotéine structurale et fonctionnelle importante des matrices extracellulaires. Elle peut acquérir différentes conformations moléculaires/supramoléculaires impliquées dans des processus physiopathologiques variés. Si l'influence des fibres de fibronectine issue de la fibrillogenèse est connue, l'impact d'agrégats de cette protéine n'a commencé à être étudié que récemment avec leur découverte *in vivo* dans certaines pathologies (glomérulopathie et échec de la rémyélinisation). Dans le but de mieux appréhender le rôle de ces différentes structures de la fibronectine sur le comportement cellulaire, l'objectif de ce doctorat a été de répondre aux questions suivantes :

La fibronectine peut-elle s'agréger et sous quelle forme ? Quels sont les changements structuraux associés à l'agrégation de la fibronectine ? Quels sont les mécanismes d'agrégation de cette protéine ? Quelles sont les conséquences de cette agrégation sur les propriétés de la fibronectine ? Enfin, quels sont les effets de ces agrégats sur le comportement cellulaire ?

Ainsi, nous avons montré que, suite à sa **dénaturation thermique irréversible**, la **fibronectine plasmatique humaine entière** forme des **agrégats très stables compacts et sphériques de très haut poids moléculaire**. Même s'ils sont hétérogènes, ces agrégats forment deux populations de poids moléculaires moyens de 46 et 236 kDa qui coexistent *in vitro*. Ces agrégats possèdent des caractéristiques de type **amyloïde** : liaison de la thioflavine T et de l'ANS et maintien par des feuillettes β intermoléculaires et des interactions hydrophobes. Ces agrégats ne sont pas maintenus par des liaisons covalentes de type disulfure. Contrairement à beaucoup d'assemblages amyloïdes, la polymérisation des agrégats de fibronectine est **isodesmique** et ne présente pas de phase de latence. Cette polymérisation mène à la formation de deux populations d'agrégats : des agrégats de type amyloïde *on-pathway* et des agrégats *off-pathway*.

En dépit de leur caractère amyloïde, ces agrégats de fibronectine ne sont **pas cytotoxiques** pour les cellules cancéreuses ovariennes SKOV3. Néanmoins, l'agrégation de la fibronectine altère ses interactions avec les cellules. L'assemblage de la fibronectine **diminue l'accessibilité** de son site de liaison à la gélatine et de sa séquence RGD et **altère son incorporation** dans les réseaux matriciels formés par les cellules. Ces agrégats de fibronectine **altèrent l'adhérence** et favorisent l'apparition d'une **sous-population de cellules plus allongées**. Ces agrégats favorisent également la **migration individuelle** et la **dispersion** des cellules SKOV3 au détriment d'une migration collective et directionnelle. La migration aléatoire est accompagnée d'une augmentation de la vitesse et de la distance parcourue par les cellules. Au cours de cette migration aléatoire induite par la fibronectine agrégée, les intégrines de la famille $\beta 1$ semblent être **relocalisées** du front avant vers le front arrière des cellules alors que les intégrines de la famille αv semblent être **internalisées**.

Au cours de ces trois ans de thèse, nous avons donc montré que la fibronectine peut s'assembler en agrégats de type amyloïde et que ces derniers influencent différemment le comportement cellulaire par rapport à la fibronectine native. Néanmoins ces résultats concernant cet assemblage amyloïde de la fibronectine soulèvent de nouvelles questions.

Dans notre étude, la fibronectine forme deux populations d'agrégats. Quels sont les mécanismes de formation de ces deux populations indépendantes d'agrégats ?

Des expériences supplémentaires pourraient être réalisées afin d'isoler et caractériser ces deux populations d'assemblage de façon indépendante. Il est également nécessaire de déterminer l'influence respective de chacune des deux populations sur le comportement cellulaire. Pour cela, il pourra par exemple être possible de séparer ces deux populations par sédimentation en fonction de leur masse ou par chromatographie d'exclusion de taille.

D'autre part, les études antérieures *in vitro* ont montré que la fibronectine peut former des assemblages de structures supramoléculaires variés dont les mécanismes de polymérisation sont à mieux appréhender (cf. Synthèse bibliographique, Partie 3, III. C.). On peut alors se demander quels sont les effets de ces différents assemblages sur les comportements cellulaires.

Les agrégats de type amyloïde dans cette étude modifient le réseau matriciel de fibronectine formé par les cellules. Quelles sont alors les conséquences de ces agrégats sur les propriétés des matrices extracellulaires ?

Dans la littérature, l'inhibition de la fibrillogénèse de la fibronectine est associée à une déstabilisation des autres réseaux de protéines matricielles dont la fibrine et le collagène (Pereira et al. 2002; Sottile & Hocking 2002). La réorganisation des réseaux de protéines est associée à certaines pathologies. La restructuration des fibres de collagène en fibres alignées et rigides est observée dans les tumeurs mammaires (Levental et al. 2009). Dans notre étude, les agrégats de fibronectine altèrent d'une part leur incorporation dans la matrice et d'autre part, rendent le site d'affinité au collagène moins accessible. Une étude plus approfondie par des expériences d'immunomarquage et microscopie permettraient de déterminer l'influence de ces agrégats de fibronectine sur la formation et l'organisation du réseau des autres protéines matricielles. La formation du réseau de fibronectine est primordiale dans le processus de réparation tissulaire où il sert de support pour la migration cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de cette absence de fibrillogénèse en présence des agrégats sur la réparation tissulaire.

Le rôle de ces agrégats de fibronectine a principalement été étudié sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes SKOV3. Mais quels sont les effets de ces assemblages sur le comportement des autres types cellulaires ?

Entre autre, ces assemblages pourraient impacter le comportement d'autres types de cellules cancéreuses mais également des cellules saines. L'étude sur d'autres modèles cellulaires cancéreux et sains dont les fibroblastes ou les cellules endothéliales permettrait de mettre en évidence un phénomène général aux comportements cellulaires, ou au contraire spécifique aux cellules cancéreuses ou spécifiques à la lignée SKOV3.

La morphologie allongée et la migration isolée suggèrent la transition des cellules SKOV3 vers un phénotype mésenchymateux. La transition épithélio-mésenchymateuse est un événement important facilitant la dissémination des cellules cancéreuses. Ainsi, la caractérisation des marqueurs moléculaires N- et E-cadhérines des cellules cancéreuses SKOV3 permettrait de confirmer leur transition épithélio-mésenchymateuse. L'étude des capacités d'invasion et de dispersion dans des modèles de culture en trois dimensions ainsi que l'étude du profil des protéases sécrétées

apporteraient des éléments complémentaires quant aux mécanismes utilisés lors de la migration cellulaire en présence des agrégats de fibronectine.

Une des questions importantes à résoudre est de connaître le rôle de ces agrégats de type amyloïde de la fibronectine dans les matrice *in vivo* ? Où et quand sont-ils formés ? Ces assemblages correspondent-ils à des structures mal repliées/pathologiques de cette protéine ou ont-ils des fonctions physiologiques ?

La mise au point d'un protocole de marquage des réseaux fibrillaires de fibronectine formés par les cellules permettrait de déterminer si la mise en place de feuillettes β intermoléculaires est un processus physiologique. Pour cela, il serait intéressant de développer un anticorps conformationnel à partir des agrégats de notre étude afin de réaliser des études sur coupes.

D'autre part, il a été montré que la glomérulopathie et l'échec de la rémyélinisation sont associés à un dépôt de fibronectine de type agrégat (Castelletti et al. 2008; J. M. J. Stoffels et al. 2013). La mise au point d'un protocole d'extraction de ces agrégats pathologiques permettrait de faire une étude comparative afin de déterminer les caractéristiques structurales et les similarités entre eux et les agrégats formés dans notre étude.

Finalement, ce travail a permis de montrer que la fibronectine peut former des agrégats de type amyloïde dont l'influence sur le comportement cellulaire est différente de celui de la fibronectine native, puisqu'ils modifient le profil de migration des cellules. Ces résultats amènent à s'interroger sur la relation qui pourrait exister entre la dynamique supramoléculaire de la fibronectine dans le cas de processus pathologiques tels que le développement tumorale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**dams, J.C., 2002. Molecular organisation of cell-matrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(1), p.1-24.
- Anfinsen, C.B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096), p223-230
- Akimov, S.S. & Belkin, A.M., 2001. Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin a role in TGF β -dependent matrix deposition. *Journal of Cell Science*, 114(16), p.2989-3000.
- Alexander, S.S., Colonna, G. & Edelhofer, H., 1979. The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(5), p.1501-1505.
- Ali, I.U., 1984. Analysis of phosphorylation sites on fibronectin. *FEBS Letters*, 176(1), p.169-175.
- Ali, I.U., 1983. Phosphorylation of fibronectin in quiescent and growing cell cultures. *FEBS Letters*, 151(1), p.45-48.
- Alisson-Silva, F. et al., 2013. Increase of O-glycosylated oncofetal fibronectin in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human epithelial cells. *PloS One*, 8(4), p.e60471.
- Ambesi, A. et al., 2005. Anastellin, a fragment of the first type III repeat of fibronectin, inhibits extracellular signal-regulated kinase and causes G1 arrest in human microvessel endothelial cells. *Cancer research*, 65(1), p.148-156.
- Ambesi, A. & McKeown-Longo, P.J., 2009. Anastellin, the Angiostatic Fibronectin Peptide, Is a Selective Inhibitor of Lysophospholipid Signaling. *Molecular Cancer Research*, 7(2), p.255-265.
- Ambesi, A. & McKeown-Longo, P.J., 2014. Conformational remodeling of the fibronectin matrix selectively regulates VEGF signaling. *Journal of Cell Science*.
- Amm, I., Sommer, T. & Wolf, D.H., 2014. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(1), p.182-196.
- Arboleda-Estudillo, Y. et al., 2010. Movement directionality in collective migration of germ layer progenitors. *Current biology: CB*, 20(2), p.161-169.
- B**aldwin, A.K. et al., 2013. Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15, p.e8.
- Baneyx, G., Baugh, L. & Vogel, V., 2001. Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), p.14464-14468.
- Baneyx, G., Baugh, L. & Vogel, V., 2002. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), p.5139-5143.
- Baneyx, G. & Vogel, V., 1999. Self-assembly of fibronectin into fibrillar networks underneath dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers: Role of lipid matrix and tensile forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), p.12518-12523.

- Barry, E.L. & Mosher, D.F., 1988. Factor XIII cross-linking of fibronectin at cellular matrix assembly sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(21), p.10464-10469.
- Bartlett, A.I. & Radford, S.E., 2009. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), p.582-588.
- Bass, M.D. et al., 2007. Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 177(3), p.527-538.
- Baujard-Lamotte, L. et al., 2008. Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 63(1), p.129-137.
- Baumann, P. et al., 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiological reviews*, 55(3), p.425-436.
- Beardsley, A. et al., 2005. Loss of Caveolin-1 Polarity Impedes Endothelial Cell Polarization and Directional Movement. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), p.3541-3547.
- Benbrook, D.M. & Long, A., 2012. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Experimental oncology*, 34(3), p.286-297.
- Bernard, B.A., Yamada, K.M. & Olden, K., 1982. Carbohydrates selectively protect a specific domain of fibronectin against proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 257(14), p.8549-8554.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. et al., 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, 68, p.729-77.
- Berthelot, K., Cullin, C. & Lecomte, S., 2013. What does make an amyloid toxic: Morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie*, 95(1), p.12-19.
- Bhat, V. et al., 2013. Heat-induced fibrillation of BclXL apoptotic repressor. *Biophysical Chemistry*, 179, p.12-25.
- Biancalana, M. & Koide, S., 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(7), p.1405-1412.
- Biggs, M.J.P. & Dalby, M.J., 2010. Focal adhesions in osteoneogenesis. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224(12), p.1441-1453.
- Bignon, M. et al., 2011. Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood*, 118(14), p.3979-3989.
- Bolognesi, B. et al., 2010. ANS Binding Reveals Common Features of Cytotoxic Amyloid Species. *ACS Chemical Biology*, 5(8), p.735-740.
- Ano Bom, A.P.D. et al., 2012. Mutant p53 Aggregates into Prion-like Amyloid Oligomers and Fibrils: IMPLICATIONS FOR CANCER. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), p.28152-28162.
- Boregowda, R.K., Krovic, B.M. & Ritty, T.M., 2012. Selective integrin subunit reduction disrupts fibronectin extracellular matrix deposition and fibrillin 1 gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 369(1-2), p.205-216.
- Boucaut, J.-C. et al., 1990. Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation. *Int. J. Dev. Biol*, 34, p.139-147.
- Bowditch, R.D. et al., 1994. Identification of a Novel Integrin Binding Site in Fibronectin. Differential Utilization by Beta 3 Integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), p.10856-10863.
- Bradshaw, M.J. & Smith, M.L., 2014. Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomaterialia*, 10(4), p.1524-1531.
- Bravo-Cordero, J.J. et al., 2013. Spatial regulation of RhoC activity defines protrusion formation in

- migrating cells. *Journal of Cell Science*, 126(15), p.3356-3369.
- Briknarová, K. et al., 2003. Anastellin, an FN3 Fragment with Fibronectin Polymerization Activity, Resembles Amyloid Fibril Precursors. *Journal of Molecular Biology*, 332(1), p.205-215.
- Bruckert, F. et al., 2002. Dictyostelium discoideum adhesion and motility under shear flow: experimental and theoretical approaches. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(7-8), p.651-658.
- Bultmann, H., Santas, A.J. & Peters, D.M.P., 1998. Fibronectin Fibrillogenesis Involves the Heparin II Binding Domain of Fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), p.2601-2609.
- C**alamai, M. et al., 2005. Reversal of Protein Aggregation Provides Evidence for Multiple Aggregated States. *Journal of Molecular Biology*, 346(2), p.603-616.
- Campbell, I.D. & Humphries, M.J., 2011. Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), p.a004994.
- Carduner, L. et al., 2014. Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on α v integrins. *Clinical & Experimental Metastasis*, 31(6), p.675-688.
- Carr, P.A., Erickson, H.P. & Palmer, A.G., 3rd, 1997. Backbone dynamics of homologous fibronectin type III cell adhesion domains from fibronectin and tenascin. *Structure (London, England: 1993)*, 5(7), p.949-959.
- Castelletti, F. et al., 2008. Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), p.2538-2543.
- Chamaroux, F. et al., 2008. Physical model for membrane protrusions during spreading. *Physical Biology*, 5(3), p.036009.
- Chandler, E. M., Saunders, M. P., Yoon, C. J., Gourdon, D., & Fischbach, C., 2011. Adipose progenitor cells increase fibronectin matrix strain and unfolding in breast tumors. *Physical Biology*, 8(1), p.1-13
- Chang, S.S. et al., 2013. Guidance of Cell Migration by Substrate Dimension. *Biophysical Journal*, 104(2), p.313-321.
- Chaudhary, N., Singh, S. & Nagaraj, R., 2011. Aggregation properties of a short peptide that mediates amyloid fibril formation in model proteins unrelated to disease. *Journal of Biosciences*, 36(4), p.679-689.
- Chenal, A. et al., 2012. Amyloid fibrils formed by the programmed cell death regulator Bcl-xL. *Journal of Molecular Biology*, 415(3), p.584-599.
- Chen, H. & Mosher, D.F., 1996. Formation of sodium dodecyl sulfate-stable fibronectin multimers. Failure to detect products of thiol-disulfide exchange in cyanogen bromide or limited acid digests of stabilized matrix fibronectin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(15), p.9084-9089.
- Chen, Q.K. et al., 2013. Extracellular matrix proteins regulate epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Differentiation*, 86(3), p.126-132.
- Chèvremont, M., 1975. *Notions de cytologie et histologie Vol. 1 Vol. 1*, Liège: Éd. Desoer.
- Chiti, F. & Dobson, C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75, p.333-366.

- Chung, C.Y. & Erickson, H.P., 1997. Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 12), p.1413-1419.
- Ciechanover, A., 2012b. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1824(1), p.3-13.
- Ciechanover, A. & Stanhill, A., 2014. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(1), p.86-96.
- Comyn, S.A., Chan, G.T. & Mayor, T., 2014. False start: Cotranslational protein ubiquitination and cytosolic protein quality control. *Journal of Proteomics*, 100, p.92-101.
- Condeelis, J., 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends in Cell Biology*, 11(7), p.288-293.
- Corall, S. et al., 2014. $\alpha 5\beta 1$ -integrin and MT1-MMP promote tumor cell migration in 2D but not in 3D fibronectin microenvironments. *Computational Mechanics*, 53(3), p.499-510.
- Corrêa-Giannella, M.L. et al., 2012. Fibronectin glycation increases IGF-I induced proliferation of human aortic smooth muscle cells. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 4(1), p.19.
- Couppé, C. et al., 2009. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. *Journal of Applied Physiology*, 107(3), p.880-886.
- Cox, T.R. & Erler, J.T., 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 4(2), p.165-178.
- Cseh, B. et al., 2010. Autocrine fibronectin directs matrix assembly and crosstalk between cell-matrix and cell-cell adhesion in vascular endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 123(22), p.3989-3999.
- Cui, C. et al., 2014. Transglutaminase activity arising from Factor XIIIa is required for stabilization and conversion of plasma fibronectin into matrix in osteoblast cultures. *Bone*, 59, p.127-138.
- Cukierman, E. et al., 2001. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 294(5547), p.1708-1712.

Danen, E.H.J. et al., 2005. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), p.515-526.

- Darribère, T. & Schwarzbauer, J.E., 2000. Fibronectin matrix composition and organization can regulate cell migration during amphibian development. *Mechanisms of Development*, 92(2), p.239-250.
- Dobson, C.M., 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), p.884-890.
- Doussineau, T., Kerleroux, M., et al., 2011. Charging megadalton poly(ethylene oxide)s by electrospray ionization. A charge detection mass spectrometry study. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 25(5), p.617-623.
- Doussineau, T., Bao, C.Y., et al., 2011. Infrared multiphoton dissociation tandem charge detection-mass spectrometry of single megadalton electrosprayed ions. *Review of Scientific Instruments*, 82(8), p.084104.
- Dueholm, M.S. et al., 2010. Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*.
- Dutaud, D., Aubry, L. Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P., Ouali, A., 2002.

Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma, *Journal of Immunological Methods*, 260, p.183–193.

- E**losegui-Artola, A. et al., 2014. Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types. *Nature Materials*, 13(6), p.631–637.
- Erickson, H.P., Carrell, N. & McDonagh, J., 1981. Fibronectin molecule visualized in electron microscopy: a long, thin, flexible strand. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), p.673–678.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*, 106, p.489–498.
- Evgeny Makogonenko, K.C.I., 2007. Interaction of the fibronectin COOH-terminal Fib-2 regions with fibrin: further characterization and localization of the Fib-2-binding sites. *Biochemistry*, 46(18), p.5418–26.

- F**ang, M. et al., 2013. Quantum dots-based in situ molecular imaging of dynamic changes of collagen IV during cancer invasion. *Biomaterials*, 34(34), p.8708–8717.
- Feige, J.J. & Baird, A., 1992. La crinopexie: un modèle décrivant les mécanismes qui régissent la biodisponibilité des facteurs de croissance. *médecine/sciences*, 8(8), p.805.
- Fernandez de la Mora, J., 2000. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Analytica Chimica Acta*, 406(1), p.93–104.
- Fitzpatrick, A.W. et al., 2011. Inversion of the Balance between Hydrophobic and Hydrogen Bonding Interactions in Protein Folding and Aggregation V. S. Pande, éd. *PLoS Computational Biology*, 7(10), p.e1002169.
- Foderà, V. et al., 2008. Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 112(12), p.3853–3858.
- Forget, K.J., Tremblay, G. & Roucou, X., 2013. p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53. *PloS One*, 8(7), p.e69242.
- Fowler, D.M. et al., 2007. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), p.217–224.
- Freire-de-Lima, L. et al., 2011. Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43), p.17690–17695.
- Freire-de-Lima, L., 2014. Sweet and sour: the impact of differential glycosylation in cancer cells undergoing epithelial–mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Oncology*, 4, p.59.
- Friedl, P. & Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), p.362–374.
- Fukui, N. et al., 2002. Processing of Type II Procollagen Amino Propeptide by Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), p.2193–2201.

- G**andhi, N.S. & Mancera, R.L., 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions

- with proteins. *Chemical biology & drug design*, 72(6), p.455-482.
- Gao, M. et al., 2002. Identifying Unfolding Intermediates of FN-III10 by Steered Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Biology*, 323(5), p.939-950.
- Gao, M. et al., 2003. Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), p.14784-14789.
- Gee, E.P.S., Yüksel, D., et al., 2013. SLLISWD sequence in the 10FNIII domain initiates fibronectin fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(29), p.21329-21340.
- Gee, E.P.S., Ingber, D.E. & Stultz, C.M., 2008. Fibronectin Unfolding Revisited: Modeling Cell Traction-Mediated Unfolding of the Tenth Type-III Repeat. *PLoS ONE*, 3(6), p.e2373.
- Geiger, B. Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada K.M., 2001. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature*, 2(11), p.793-805.
- Geiger, T. & Zaidel-Bar, R., 2012. Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), p.562-568.
- Gibson, M.C. & Perrimon, N., 2003. Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), p.747-752.
- Goldman, L. & Ausiello, D.A., 2008. Cecil Medicine. Saunders Elsevier.
- Gosal, W.S. et al., 2005. Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *Journal of Molecular Biology*, 351(4), p.850-864.
- Graille, M. et al., 2010. Zinc induces structural reorganization of gelatin binding domain from human fibronectin and affects collagen binding. *Structure (London, England: 1993)*, 18(6), p.710-718.
- Grande-Garcia, A., Echarri, A., Rooij, J., Alderson N. B., Waterman-Storer, C., Vadivielso, José, M. & Pozo, M. A., 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *The Journal of Cell Biology*, 177, p683-694.
- Greciano, P.G. et al., 2012. Laminin 511 partners with laminin 332 to mediate directional migration of Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 23(1), p.121-136.
- Greiling, D. & Clark, R.A., 1997. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *Journal of cell science*, 110(7), p.861-870.
- Guiet, R. et al., 2012. Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by Filamin A. *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc.M111.307124.

Haeger, A. et al., 2014. Cell jamming: Collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), p.2386-2395.

Hakkinen, K.M. et al., 2011. Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices. *Tissue Engineering Part A*, 17(5-6), p.713-724.

Hamano, Y. et al., 2003. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer cell*, 3(6), p.589-601.

- Harada, T., Shinohara, M., Nakamura, S. & Oka, M., 1994. An immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential. *Virchows Archiv*, 424, p257-266.
- Haugstad, G., 2012. *Atomic Force Microscopy: Understanding Basic Modes and Advanced Applications*, John Wiley & Sons.
- Hay, E.D., 1981. Extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), p.205s-223s.
- Hedstrom, L., 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), p.4501-4524.
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E. B. & Friedl, P., 2002. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β 1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Research*, 62, p.2125-2130.
- Hendel, A. & Granville, D.J., 2013. Granzyme B cleavage of fibronectin disrupts endothelial cell adhesion, migration and capillary tube formation. *Matrix Biology*, 32(1), p.14-22.
- Homandberg, G.A. et al., 1985. Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *The American Journal of Pathology*, 120(3), p.327-332.
- Homandberg, G.A. et al., 1986. Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth: structure-function correlations. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 874(1), p.61-71.
- Hood, J.D. & Cheresch, D.A., 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), p.91-100.
- Huang, C.-Y. et al., 2010. A fibrillar form of fibronectin induces apoptosis by activating SHP-2 and stress fiber formation. *Apoptosis*, 15(8), p.915-926.
- Huang, C.-Y. et al., 2009. Albumin fibrillization induces apoptosis via integrin/FAK/Akt pathway. *BMC Biotechnology*, 9, p.2.
- Huang, H., Kamm, R.D. & Lee, R.T., 2004. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287(1), p.C1-11.
- Hunter, M.C. et al., 2014. Hsp90 binds directly to fibronectin (FN) and inhibition reduces the extracellular fibronectin matrix in breast cancer cells. *PloS one*, 9(1), p.e86842.
- Hurshman, A.R. et al., 2004. Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry*, 43(23), p.7365-7381.
- Hu, S. et al., 2011. Podosome rings generate forces that drive saltatory osteoclast migration. *Molecular Biology of the Cell*, 22(17), p.3120-3126.
- Huveneers, S. et al., 2008. Binding of soluble fibronectin to integrin α 5 β 1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *Journal of Cell Science*, 121(15), p.2452-2462.
- Hynes, R.O., 2009. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), p.1216-1219.
- Hynes, R.O. & Destree, A., 1977. Extensive disulfide bonding at the mammalian cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(7), p.2855-2859.
- Hynes, R.O. & Naba, A., 2012. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), p.a004903.
- Hynes, R.O. & Yamada, K.M., 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 95(2 Pt 1), p.369-377.

- Ichihara-Tanaka, K., Titani, K. & Sekiguchi, K., 1995. Role of the carboxyl-terminal Fib2 domain in fibronectin matrix assembly. *Journal of cell science*, 108(3), p.907–915.
- Imada, S., Sugiyama, Y. & Imada, M., 1988. Fibronectin phosphorylation by ecto-protein kinase. *Experimental cell research*, 179(2), p.554-564.
- Ingber, D.E., 2006. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *The FASEB Journal*, 20(7), p.811-827.
- Ingber, D.E., 2003. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of Medicine*, 35(8), p.564-577.
- Ingham, K.C. et al., 1997. Cryptic Self-association Sites in Type III Modules of Fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), p.1718-1724.
- Ingham, K.C., Brew, S.A. & Novokhatny, V.V., 1995. Influence of Carbohydrate on Structure, Stability, and Function of Gelatin-Binding Fragments of Fibronectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316(1), p.235-240.
- Inobe, T. & Matouschek, A., 2014. Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current opinion in structural biology*, 24C, p.156-164.
- Jia, D. et al., 2012. Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 12(1), p.94.
- Johansson, S. et al., 1997. Fibronectin-integrin interactions. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 2, p.d126-146.
- Johnson, K.J. et al., 1999. The Compact Conformation of Fibronectin Is Determined by Intramolecular Ionic Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), p.15473-15479.
- Jones, G.E., Arumugham, R.G. & Tanzer, M.L., 1986. Fibronectin glycosylation modulates fibroblast adhesion and spreading. *The Journal of Cell Biology*, 103(5), p.1663-1670.
- Kamarajan, P. et al., 2010. The CS1 segment of fibronectin is involved in human OSCC pathogenesis by mediating OSCC cell spreading, migration, and invasion. *BMC Cancer*, 10(1), p.330.
- Karplus, M., 1997. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Folding & design*, 2(4), p.S69-75.
- Kass, L. et al., 2007. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(11), p.1987-1994.
- Kato, R. et al., 2002. A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(7), p.2455-2462.
- Keaton, P.W. et al., 1990. A hypervelocity - microparticle - impacts laboratory with 100-km/s projectiles. *International Journal of Impact Engineering*, 10(1-4), p.295-308.
- Keller, G., 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development*, 19(10), p.1129-1155.

- Kellouche, S. et al., 2010. Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 31(2), p.129-139.
- Kenny, H.A. et al., 2008. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), p.1367-1379.
- Khan, Z.A. et al., 2005. EDB fibronectin and angiogenesis – a novel mechanistic pathway. *Angiogenesis*, 8(3), p.183-196.
- Kilian, O. et al., 2008. mRNA expression and protein distribution of fibronectin splice variants and high-molecular weight tenascin-C in different phases of human fracture healing. *Calcified tissue international*, 83(2), p.101-111.
- Kim, S.-H., Turnbull, J. & Guimond, S., 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology*, 209(2), p.139-151.
- Klass, C.M., Couchman, J.R. & Woods, A., 2000. Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *Journal of cell science*, 113 (Pt 3), p.493-506.
- Klein, R.M. et al., 2003. Stimulation of extracellular matrix remodeling by the first type III repeat in fibronectin. *Journal of Cell Science*, 116(22), p.4663-4674.
- Koda, J.E., Rapraeger, A. & Bernfield, M., 1985. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(13), p.8157-8162.
- Kostourou, V. & Papalazarou, V., 2014. Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(8), p.2403-2413.
- Kozaki, T. et al., 2003. Recombinant Expression and Characterization of a Novel Fibronectin Isoform Expressed in Cartilaginous Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), p.50546-50553.
- Kumar, S. & Udgaonkar, J.B., 2010. Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Curr. Sci*, 98, p.639-656.
- Kusumoto, Y. et al., 1998. Temperature dependence of amyloid beta-protein fibrillization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), p.12277-12282.
- Kwon, Y., Cukierman, E. & Godwin, A.K., 2011. Differential Expressions of Adhesive Molecules and Proteases Define Mechanisms of Ovarian Tumor Cell Matrix Penetration/Invasion S. Orsulic, éd. *PLoS ONE*, 6(4), p.e18872.
- L**abat-Robert, J., Bihari-Varga, M. & Robert, L., 1990. Extracellular matrix. *FEBS Letters*, 268(2), p.386-393.
- Labat-Robert, J. & Robert, L., 2005. Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function. *Pathologie-Biologie*, 53(7), p.369-371.
- Abu-Lail, N.I. et al., 2006. Understanding the elasticity of fibronectin fibrils: Unfolding strengths of FN-III and GFP domains measured by single molecule force spectroscopy. *Matrix Biology*, 25(3), p.175-184.

- Lamallice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J., 2007. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, 100(6), p.782-794.
- LAMBERT VIDMAR, S. et al., 1991. Latent fibronectin-degrading serine proteinase activity in N-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin. *European Journal of Biochemistry*, 201(1), p.71-77.
- Larsen, P. et al., 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environmental Microbiology*, 9(12), p.3077-3090.
- Laurine, E. et al., 2003. Lithostathine quadruple-helical filaments form proteinase K-resistant deposits in Creutzfeldt-Jakob disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(51), p.51770-51778.
- Lee, J.M., 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, 172(7), p.973-981.
- Legrand, C. et al., 2001. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Experimental Cell Research*, 264(2), p.326-336.
- Leiss, M. et al., 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5), p.502-507.
- Levental, K.R. et al., 2009. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*, 139(5), p.891-906.
- Levinthal, C., 1968. Are There Pathways for Protein Folding ? *Journal de Chimie Physique*, 65(1), p. 44-45
- Lim, H.C. & Couchman, J.R., 2014. Syndecan-2 regulation of morphology in breast carcinoma cells is dependent on RhoGTPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), p.2482-2490.
- Lim, J. & Thiery, J.P., 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from. *Development*, 139(19), p.3471-3486.
- Linder, S., 2009. Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(17), p.3009-3013.
- Litvinovich, S.V. et al., 1998. Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *Journal of Molecular Biology*, 280(2), p.245-258.
- Litvinovich, S.V. & Ingham, K.C., 1995. Interactions Between Type III Domains in the 110 kDa Cell-binding Fragment of Fibronectin. *Journal of Molecular Biology*, 248(3), p.611-626.
- Liu, B., Kim, T.-J. & Wang, Y., 2010. Live cell imaging of mechanotransduction. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl 3), p.S365-S375.
- Lobert, V.H. et al., 2010. Ubiquitination of $\alpha 5\beta 1$ Integrin Controls Fibroblast Migration through Lysosomal Degradation of Fibronectin-Integrin Complexes. *Developmental Cell*, 19(1), p.148-159.
- Lodish, H. et al., 2000a. Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. W. H. Freeman.
- Lodish, H. et al., 2000b. The Dynamics of Actin Assembly. W. H. Freeman.
- Lodish, M.H. et al., 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boeck Supérieur.
- Losino, N. et al., 2013. EDA-Containing Fibronectin Increases Proliferation of Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(11), p.e80681.
- Lu, P. et al., 2011. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), p.a005058-a005058.

- M**aisuradze, G.G. et al., 2012. Effects of mutation, truncation, and temperature on the folding kinetics of a WW domain. *Journal of molecular biology*, 420(4-5), p.350-365.
- Maji, S.K. et al., 2009. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5938), p.328-332.
- Makarava, N. et al., 2011. Genesis of Mammalian Prions: From Non-infectious Amyloid Fibrils to a Transmissible Prion Disease S. Supattapone, éd. *PLoS Pathogens*, 7(12), p.e1002419.
- Makin, O.S. & Serpell, L.C., 2005. Structures for amyloid fibrils: Structures for amyloid fibrils. *FEBS Journal*, 272(23), p.5950-5961.
- Mao, Y. & Schwarzbauer, J.E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology*, 24(6), p.389-399.
- Marshall, K.E. et al., 2014. The relationship between amyloid structure and cytotoxicity. *Prion*, 8(2).
- Martel, A. et al., 2008. Silk Fiber Assembly Studied by Synchrotron Radiation SAXS/WAXS and Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(50), p.17070-17074.
- Martinez, J. et al., 1994. Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers. *Biochemistry*, 33(9), p.2538-2545.
- Mayor, R. & Carmona-Fontaine, C., 2010. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends in Cell Biology*, 20(6), p.319-328.
- Mehta, K., 2005. *Transglutaminases: family of enzymes with diverse functions : 16 tables*, Basel [u.a.: Karger.
- Menon, S. & Beningo, K.A., 2011. Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS one*, 6(2), p.e17277.
- Midwood, K.S. et al., 2006. Modulation of Cell–Fibronectin Matrix Interactions during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 11(1), p.73-78.
- Milto, K., Michailova, K. & Smirnovas, V., 2014. Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils: Effect of Temperature and Denaturant Concentration I. V. Baskakov, éd. *PLoS ONE*, 9(4), p.e94469.
- Modler, A.J. et al., 2003. Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation. *Journal of Molecular Biology*, 325(1), p.135-148.
- Moll, R., Mitze, M., Frixen, U. H. & Birchmeier, W., 1993. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *American Journal of Pathology*. 143, p.1731-174.
- Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G. & Schachter, H, 1997. *Glycoproteins II*. Elsevier.
- Morgan, M.R. et al., 2013. Syndecan-4 Phosphorylation Is a Control Point for Integrin Recycling. *Developmental Cell*, 24(5), p.472-485.
- Morgan, M.R., Humphries, M.J. & Bass, M.D., 2007. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), p.957-969.
- Morla, A., Zhang, Z. & Ruoslahti, E., 1994. Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin. *Nature*, 367(6459), p.193-196.
- Morozova, O.A. et al., 2013. Conformational Features of Tau Fibrils from Alzheimer's Disease Brain Are Faithfully Propagated by Unmodified Recombinant Protein. *Biochemistry*, 52(40), p.6960-6967.
- Morrison, P.R., Edsall, J.T. & Miller, S.G., 1948. Preparation and properties of serum and plasma

- proteins; the separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *Journal of the American Chemical Society*, 70(9), p.3103-3108.
- Mosesson, M.W. & Umfleet, R.A., 1970. The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(21), p.5728-5736.
- Mosher, D.F. & Johnson, R.B., 1983. In vitro formation of disulfide-bonded fibronectin multimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(10), p.6595-6601.
- Mould, A.P. et al., 1994. Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIIc3 region of fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44), p.27224-27230.
- Munishkina, L. & Fink, A., 2007. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(8), p.1862-1885.
- Murphy, D.A. & Courtneidge, S.A., 2011. The « ins » and « outs » of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(7), p.413-426.

- N**aba, A., Hoersch, S. & Hynes, R.O., 2012. Towards definition of an ECM parts list: An advance on GO categories. *Matrix Biology*, 31(7-8), p.371-372.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), p.562-573.
- Nishimura, T. & Kaibuchi, K., 2007. Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev. Cell*, 13, p.15-28.
- Ben-Naim, A., 2012. Levinthal's Paradox Revisited, and Dismissed. *Open Journal of Biophysics*, 02(02), p.23-32.
- Nelea, V., Nakano, Y. & Kaartinen, M.T., 2008. Size distribution and molecular associations of plasma fibronectin and fibronectin crosslinked by transglutaminase 2. *The Protein Journal*, 27(4), p.223-233.
- Neskey, D.M. et al., 2008. Endostatin and anastellin inhibit distinct aspects of the angiogenic process. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 27(1), p.61.
- Niedzwiadek, W.E. et al., 1988. A calorimetric analysis of human plasma fibronectin: effects of heparin binding on domain structure. *Biochemistry*, 27(18), p.7116-7124.
- Nishida, Y. et al., 2008. Activation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase through an Artificial Receptor for ProMMP-2 Generates Active MMP-2. *Cancer Research*, 68(21), p.9096-9104.
- Niu, G. & Chen, X., 2011. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics*, 1, p.30.

- O**berhauser, A.F. et al., 2002. The Mechanical Hierarchies of Fibronectin Observed with Single-molecule AFM. *Journal of Molecular Biology*, 319(2), p.433-447.

- Ohashi, T., Augustus, A.M. & Erickson, H.P., 2009. Transient Opening of Fibronectin Type III (FNIII) Domains: The Interaction of the Third FNIII Domain of FN with Anastellin. *Biochemistry*, 48(19), p.4189-4197.
- Ohashi, T. & Erickson, H.P., 2005. Domain Unfolding Plays a Role in Superfibronectin Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), p.39143-39151.
- Ohashi, T. & Erickson, H.P., 2011. Fibronectin aggregation and assembly: the unfolding of the second fibronectin type III domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(45), p.39188-39199.
- Ohashi, T. & Erickson, H.P., 2009. Revisiting the mystery of fibronectin multimers: the fibronectin matrix is composed of fibronectin dimers cross-linked by non-covalent bonds. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 28(3), p.170-175.
- Ohashi, T., Kiehart, D.P. & Erickson, H.P., 2002. Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. *Journal of cell science*, 115(Pt 6), p.1221-1229.
- Ohashi, T., Kiehart, D.P. & Erickson, H.P., 1999. Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), p.2153-2158.
- Orr, A.W. et al., 2006. Mechanisms of Mechanotransduction. *Developmental Cell*, 10(1), p.11-20.
- Otsuka, Y. et al., 2012. A recurrent fibronectin glomerulopathy in a renal transplant patient: a case report. *Clinical Transplantation*, 26, p.58-63.
- Otzen, D. & Nielsen, P.H., 2008. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(6), p.910-927.
- Oyanagi, J. et al., 2012. Epithelial-Mesenchymal Transition Stimulates Human Cancer Cells to Extend Microtubule-based Invasive Protrusions and Suppresses Cell Growth in Collagen Gel O. de Wever, éd. *PLoS ONE*, 7(12), p.e53209.
- P**agano, M. & Reboud-Ravaux, M., 2011. Cryptic activities of fibronectin fragments, particularly cryptic proteases. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16, p.698-706.
- Pankov, R. & Yamada, K.M., 2002. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), p.3861-3863.
- Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P., 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(12), p.3481-3498.
- Patel, S. et al., 2006. In vitro denaturation-renaturation of fibronectin. Formation of multimers disulfide-linked and shuffling of intramolecular disulfide bonds. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), p.1547-1560.
- Patel, S. et al., 2004. Urea-Induced Sequential Unfolding of Fibronectin: A Fluorescence Spectroscopy and Circular Dichroism Study. *Biochemistry*, 43(6), p.1724-1735.
- Pauthe, E. et al., 2002. Temperature-induced β -aggregation of fibronectin in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597(1), p.12-21.
- Pellenc, D., Berry, H. & Gallet, O., 2006. Adsorption-induced fibronectin aggregation and fibrillogenesis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 298(1), p.132-144.
- Pellenc, D., Schmitt, E. & Gallet, O., 2004. Purification of a plant cell wall fibronectin-like adhesion

- protein involved in plant response to salt stress. *Protein Expression and Purification*, 34(2), p.208-214.
- Pelta, J. et al., 2000. Statistical Conformation of Human Plasma Fibronectin. *Biochemistry*, 39(17), p.5146-5154.
- Peng, J.-M. et al., 2012. Recombinant viral protein promotes apoptosis and suppresses invasion of ovarian adenocarcinoma cells by targeting $\alpha 5\beta 1$ integrin to down-regulate Akt and MMP-2. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), p.479-493.
- Pereira, M. et al., 2002. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *Journal of cell science*, 115(3), p.609-617.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D. & Yamada, K.M., 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), p.538-549.
- Pietrantonio, P.V. & Gill, S.S., 1992. The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. shandongensis: characterization and screening for insecticidal activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(3), p.295-302.
- Plotnikov, S. V., Pasapera, A. M., Sabass, B. & Waterman, C. M., 2012. Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell*, 151, p.1513-1527.
- Plotnikov, S.V. & Waterman, C.M., 2013. Guiding cell migration by tugging. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(5), p.619-626.
- Poon, S. et al., 2002. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Letters*, 513(2-3), p.259-266.
- Porter, S. et al., 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 1), p.15-27.
- Potts, J.R. & Campbell, I.D., 1994. Fibronectin structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(5), p.648-655.
- Poulouin, L. et al., 1999. Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. *Protein expression and purification*, 17(1), p.146-152.
- Prabhakaran, S. et al., 2009. A Novel Fibronectin Binding Motif in MSCRAMMs Targets F3 Modules. *PLoS ONE*, 4(4), p.e5412.
- Prigozhina, N. L. & Waterman-Storer, C. M., 2004. Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Current Biology*, 14, 88-98.

Qian, R.-Q. & Glanville, R.W., 1997. Alignment of Fibrillin Molecules in Elastic Microfibrils Is Defined by Transglutaminase-Derived Cross-Links. *Biochemistry*, 36(50), p.15841-15847.

Ramanathan, A. & Karuri, N., 2014. Fibronectin alters the rate of formation and structure of the fibrin matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), p.395-399.

Ramshini, H. et al., 2011. Large Proteins Have a Great Tendency to Aggregate but a Low Propensity to Form Amyloid Fibrils V. N. Uversky, éd. *PLoS ONE*, 6(1), p.e16075.

Ray, A.-M. et al., 2014. Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5\beta 1$ or $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochimica Et*

- Biophysica Acta*, 1840(9), p.2978-2987.
- Rees-Milton, K.J., Terry, D. & Anastassiades, T.P., 2004. Hyperglycosylation of fibronectin by TGF- β 1-stimulated chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(3), p.844-850.
- Ricard-Blum, S., 2011. The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), p.a004978.
- Rivers, R.C. et al., 2008. Molecular determinants of the aggregation behavior of alpha- and beta-synuclein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 17(5), p.887-898.
- Roberts, M., Barry, S., Woods, A., van der Sluijs, P. & Norman, J., 2001. PDGF-regulated rab4-dependent recycling of $\alpha\beta$ 3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. *Current Biology*, 11, p.1392-1402.
- Robinson, E.E. et al., 2003. Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 2), p.377-386.
- Da Rocha-Azevedo, B. & Grinnell, F., 2013. Fibroblast morphogenesis on 3D collagen matrices: The balance between cell clustering and cell migration. *Experimental Cell Research*, 319(16), p.2440-2446.
- Da Rocha-Azevedo, B., Ho, C.-H. & Grinnell, F., 2013. Fibroblast cluster formation on 3D collagen matrices requires cell contraction dependent fibronectin matrix organization. *Experimental Cell Research*, 319(4), p.546-555.
- Romberg, L., Simon, M. & Erickson, H.P., 2001. Polymerization of FtsZ, a Bacterial Homolog of Tubulin. IS ASSEMBLY COOPERATIVE? *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), p.11743-11753.
- Romero, D. et al., 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), p.2230-2234.
- Rørth, P., 2009. Collective Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), p.407-429.

Sabari, J. et al., 2011. Fibronectin Matrix Assembly Suppresses Dispersal of Glioblastoma Cells B. E.

Rich, éd. *PLoS ONE*, 6(9), p.e24810.

- Sabatier, L. et al., 2013. Complex contributions of fibronectin to initiation and maturation of microfibrils. *The Biochemical journal*, 456(2), p.283-295.
- Sacino, A.N. et al., 2013. Induction of CNS alpha-synuclein pathology by fibrillar and non-amyloidogenic recombinant alpha-synuclein. *Acta Neuropathol Commun*, 1(1), p.38.
- Sakai, K., Fujii, T. & Hayashi, T., 1994. Cell-free formation of disulfide-bonded multimer from isolated plasma fibronectin in the presence of a low concentration of SH reagent under a physiological condition. *Journal of Biochemistry*, 115(3), p.415-421.
- Sakai, K., Fujii, T. & Hayashi, T., 1996. Conformational change precedes the formation of multimeric fibronectin. *Journal of biochemistry*, 119(1), p.58-62.
- Salmenperä, P. et al., 2008. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction. *Experimental Cell Research*, 314(19), p.3444-3452.
- Salmivirta, M. et al., 1991. Syndecan from embryonic tooth mesenchyme binds tenascin. *The Journal*

- of *Biological Chemistry*, 266(12), p.7733-7739.
- Salo, T. et al., 2014. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Experimental Cell Research*, 325(2), p.58-64.
- Sanders, L.C. et al., 1991. A Homolog of the Substrate Adhesion Molecule Vitronectin Occurs in Four Species of Flowering Plants. *The Plant Cell Online*, 3(6), p.629-635.
- Sarroukh, R. et al., 2011. Transformation of amyloid β (1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), p.1429-1438.
- Scanlon, C.S. et al., 2013. Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Dental Research*, 92(2), p.114-121.
- Schiller, H.B. et al., 2013. β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nature Cell Biology*, 15(6), p.625-636.
- Schlie-Wolter, S., Ngezahayo, A. & Chichkov, B.N., 2013. The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro. *Experimental Cell Research*, 319(10), p.1553-1561.
- Schwartz, M.A., 2010. Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), p.a005066.
- Schwarzbauer, J.E., 1991. Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *The Journal of Cell Biology*, 113(6), p.1463-1473.
- Seals, D.F. & Courtneidge, S.A., 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 17(1), p.7-30.
- Sechler, J.L. et al., 2001. A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. *The Journal of Cell Biology*, 154(5), p.1081-1088.
- Sechler, J.L., Corbett, S.A. & Schwarzbauer, J.E., 1997. Modulatory Roles for Integrin Activation and the Synergy Site of Fibronectin During Matrix Assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 8(12), p.2563-2573.
- Serres, E. et al., 2014. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene*, 33(26), p.3451-3462.
- Sevilla, C.A., Dalecki, D. & Hocking, D.C., 2010. Extracellular Matrix Fibronectin Stimulates the Self-Assembly of Microtissues on Native Collagen Gels. *Tissue Engineering. Part A*, 16(12), p.3805-3819.
- Shabek, N. et al., 2012. The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation. *Molecular Cell*, 48(1), p.87-97.
- Shaw, L.M. & Olsen, B.R., 1991. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(5), p.191-194.
- Shi, F. et al., 2010. Collagen I matrix turnover is regulated by fibronectin polymerization. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 298(5), p.C1265-C1275.
- Shi, F. & Sottile, J., 2008. Caveolin-1-dependent β 1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *Journal of cell science*, 121(14), p.2360-2371.
- Shi, F. & Sottile, J., 2011. MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin. *Journal of Cell Science*, 124(23), p.4039-4050.
- Siddiqui, T.A. et al., 2012. Regulation of podosome formation, microglial migration and invasion by

- Ca²⁺-signaling molecules expressed in podosomes. *Journal of Neuroinflammation*, 9, p.250.
- Silva, J.L. et al., 2013. Expanding the prion concept to cancer biology: dominant-negative effect of aggregates of mutant p53 tumour suppressor. *Bioscience Reports*, 33(4).
- Singh, P., Carraher, C. & Schwarzbauer, J.E., 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, p.397-419.
- Sixt, S.U. & Dahlmann, B., 2008. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin — Incidence and relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(12), p.817-823.
- Smal, C. et al., 2012. Ordered Self-Assembly Mechanism of a Spherical Oncoprotein Oligomer Triggered by Zinc Removal and Stabilized by an Intrinsically Disordered Domain H. Rezaei, éd. *PLoS ONE*, 7(5), p.e36457.
- Smith, L.G., 2001. Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1), p.33-39.
- Socol, M. et al., 2010. Synchronization of Dictyostelium discoideum adhesion and spreading using electrostatic forces. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 79(2), p.198-210.
- Soldi, G. et al., 2005. Amyloid Formation of a Protein in the Absence of Initial Unfolding and Destabilization of the Native State. *Biophysical Journal*, 89(6), p.4234-4244.
- Sottile, J. & Hocking, D.C., 2002. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Molecular biology of the cell*, 13(10), p.3546-3559.
- Stepp, M.A. et al., 2010. Syndecan-1 regulates cell migration and fibronectin fibril assembly. *Experimental Cell Research*, 316(14), p.2322-2339.
- Stoffels, J.M.J. et al., 2013. Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination. *Brain*, 136(1), p.116-131.
- Stoffels, J.M.J., Zhao, C. & Baron, W., 2013. Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(22), p.4243-4253.
- Strom, E. H, Banfi, G., Krapf, R., Abt, A. B., Mazzucco, G., Monga, G., Gloor, F., Neuweiler, J., Riess, R., Stosiek, P. & al., 1995. Glomerulopathy associated with predominant fibronectin deposits: a newly recognized hereditary disease. *Kidney International*, 48(1), p.163-170.
- Sun, X., Mosher, D.F. & Rapraeger, A., 1989. Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(5), p.2885-2889.

- T**akino, T. et al., 2011. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility. *FEBS Letters*, 585(21), p.3378-3384.
- Takino, T. et al., 2013. MT1-MMP prevents growth inhibition by three dimensional fibronectin matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(3), p.503-508.
- Tamkun, J.W. & Hynes, R.O., 1983. Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(7), p.4641-4647.
- Tartaglia, G.G. et al., 2007. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), p.204-206.

- Thakar, R.G. et al., 2009. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophysical Journal*, 96(8), p.3423-3432.
- Tkachenko, E., 2005. Syndecans: New Kids on the Signaling Block. *Circulation Research*, 96(5), p.488-500.
- Tompa, P., 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in biochemical sciences*, 27(10), p.527-533.
- Tompa, P. & Rose, G.D., 2011. The Levinthal paradox of the interactome. *Protein Science*, 20(12), p.2074-2079.
- To, W.S. & Midwood, K.S., 2011a. Identification of novel and distinct binding sites within tenascin-C for soluble and fibrillar fibronectin. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), p.14881-14891.
- To, W.S. & Midwood, K.S., 2011b. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 4(1), p.21.
- Tran, K.T., Lamb, P. & Deng, J.-S., 2005. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *Journal of Dermatological Science*, 40(1), p.11-20.
- Tzvetkova-Chevolleau, T. et al., 2008. The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials*, 29(10), p.1541-1551.

- U**versky, V.N. & Fink, A.L., 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1698(2), p.131-153.
- Uversky, V.N., Oldfield, C.J. & Dunker, A.K., 2008. Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D² Concept. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), p.215-246.

- V**akonakis, I. et al., 2007. Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *The EMBO Journal*, 26(10), p.2575-2583.
- Vaz, R. et al., 2012. Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model. *Cell and Tissue Research*, 348(3), p.569-578.
- Vega, F.M. et al., 2011. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *The Journal of Cell Biology*, 193(4), p.655-665.
- Venyaminov SYu, null & Prendergast, F.G., 1997. Water (H₂O and D₂O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. *Analytical Biochemistry*, 248(2), p.234-245.
- Verderio, E. et al., 1999. Regulation of cell surface tissue transglutaminase: effects on matrix storage of latent transforming growth factor-beta binding protein-1. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 47(11), p.1417-1432.
- Vilasi, S. et al., 2011. Heparin Induces Harmless Fibril Formation in Amyloidogenic W7FW14F Apomyoglobin and Amyloid Aggregation in Wild-Type Protein In Vitro J. P. R. O. Orgel, éd. *PLoS ONE*, 6(7), p.e22076.

Volles, M.J. & Lansbury, P.T., 2003. Zeroing in on the Pathogenic Form of α -Synuclein and Its Mechanism of Neurotoxicity in Parkinson's Disease†. *Biochemistry*, 42(26), p.7871-7878.

Vuilleumier, S. et al., 1993. Circular dichroism studies of barnase and its mutants: characterization of the contribution of aromatic side chains. *Biochemistry*, 32(39), p.10303-10313.

Wada, M., Kosaka, M., Saito, S., Sano, T., Tanaka, K. & Ichihara, A., 1993. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 121, p.215-223.

Weiger, M.C. et al., 2013. Real-Time Motion Analysis Reveals Cell Directionality as an Indicator of Breast Cancer Progression A. Ahmad, éd. *PLoS ONE*, 8(3), p.e58859.

Welsh, E.J. et al., 1983. Tyrosine optical activity as a probe of the conformation and interactions of fibronectin. *Biopolymers*, 22(3), p.821-831.

White, D. P., Caswell, P. T. & Norman, J. C., 2007. α v β 3 and α 5 β 1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signalling to regulate persistent cell migration. *Journal of Cell Biology*, 177, p.515-525.

Wolf, K. & Friedl, P., 2011. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology*, 21(12), p.736-744.

Wood, J.A. et al., 2012. The modulation of canine mesenchymal stem cells by nano-topographic cues. *Experimental Cell Research*, 318(19), p.2438-2445.

Woods, A. J., White, D. P., Caswell, P. T. & Norman, J. C., 2004. PKD1/PKC μ promotes α v β 3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO Journal*, 23, p. 2531-2543.

Woskowicz, A.M. et al., 2013. MT-LOOP-dependent localization of membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), p.35126-35137.

Wyatt, A.R. et al., 2011. Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 68(23), p.3919-3931.

Wyatt, A.R. et al., 2012. Roles of Extracellular Chaperones in Amyloidosis. *Journal of Molecular Biology*, 421(4-5), p.499-516.

Xiang, L. et al., 2012. The Extra Domain A of Fibronectin Increases VEGF-C Expression in Colorectal Carcinoma Involving the PI3K/AKT Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 7(4), p.e35378.

Xu, B. et al., 2012. RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 227(6), p.2722-2729.

Xu, J. et al., 2011. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nature Chemical Biology*, 7(5), p.285-295.

Yagi, H. et al., 2005. Amyloid Fibril Formation of α -Synuclein Is Accelerated by Preformed Amyloid

- Seeds of Other Proteins: IMPLICATIONS FOR THE MECHANISM OF TRANSMISSIBLE CONFORMATIONAL DISEASES. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), p.38609-38616.
- Yang, N. et al., 2011. Syndecan-1 in Breast Cancer Stroma Fibroblasts Regulates Extracellular Matrix Fiber Organization and Carcinoma Cell Motility. *The American Journal of Pathology*, 178(1), p.325-335.
- Yerbury, J.J. et al., 2005. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO reports*, 6(12), p.1131-1136.
- Yi, M. & Ruoslahti, E., 2001. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), p.620-624.
- Yu, X. & Machesky, L.M., 2012. Cells Assemble Invadopodia-Like Structures and Invade into Matrigel in a Matrix Metalloprotease Dependent Manner in the Circular Invasion Assay M. Parsons, éd. *PLoS ONE*, 7(2), p.e30605.

- Z**aidel-Bar, R. et al., 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, 9(8), p.858-867.
- Zeiger, A.S. et al., 2012. Macromolecular Crowding Directs Extracellular Matrix Organization and Mesenchymal Stem Cell Behavior E. C. Tsilibary, éd. *PLoS ONE*, 7(5), p.e37904.
- Zent, R. & Pozzi, A., 2010a. *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, Springer Science & Business Media.
- Zent, R. & Pozzi, A. éd., 2010b. *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, New York, NY: Springer New York.
- Zhou, H.-X., 2013. Influence of crowded cellular environments on protein folding, binding, and oligomerization: biological consequences and potentials of atomistic modeling. *FEBS letters*, 587(8), p.1053-1061.
- Zhou, Z. et al., 2009. Crowded Cell-like Environment Accelerates the Nucleation Step of Amyloidogenic Protein Misfolding. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), p.30148-30158.
- Zhu, J.-K. et al., 1993. Enrichment of vitronectin- and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *The Plant Journal*, 3(5), p.637-646
- Zwanzig, R., Szabo, A. & Bagchi, B., 1992. Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), p.20-22.

ARTICLES SOUMIS

**ARTICLE 1 : UNFOLDING OF PLASMA FIBRONECTIN LEADS TO THE FORMATION OF
AMYLOID-LIKE AGGREGATES**

Unfolding of plasma Fibronectin leads to the formation of amyloid-like aggregates

Rümeysa Bascetin,¹ Khadija Admane,¹ Rémy Agniel,¹ Thomas Boudou,² Tristan Doussineau,³ Rodolphe Antoine,³ Olivier Gallet,^{1*} Johanne Leroy-Dudal,^{1*} Charlotte Vendrely^{1*}

¹ERRMECe, I-MAT FD4122, Université de Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France.

²Institut Technologique de Grenoble, CNRS, UMR 5628, LMGP, 3 Parvis Louis Néel, 38016 Grenoble, France.

³Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, UMR5306, Institut Lumière Matière, 69622 Villeurbanne, France.

*Corresponding authors. Email: olivier.gallet@u-cergy.fr; Email : johanne.leroy-dudal@u-cergy.fr; E-mail : charlotte.vendrely@u-cergy.fr.

Highlights

The multifunctionality of FN is modulated by its supramolecular state.

Irreversible unfolding of FN leads to the formation of amyloid-like aggregates.

The aggregation of plasma FN does not follow an isodesmic polymerization model.

Aggregates of FN are not cytotoxic but have impaired binding properties.

Aggregates of FN could be linked to pathological processes by disturbing the matrix.

Abstract

Fibronectin (FN) is a multifunctional glycoprotein of the extracellular matrix (ECM) that plays critical roles in physiological and pathological cell processes like adhesion, migration, growth, and differentiation. These various properties of FN are modulated by its supramolecular state. Indeed, FN can polymerize into different types of assemblies like fibrils and aggregates but the mechanism of polymerization and the effects of such assemblies on the cell behavior still remain to be defined. Here we show that upon irreversible thermal denaturation, fibronectin forms high molecular weight aggregates. These compact and globular aggregates present amyloid properties: they are stabilized by intermolecular β -sheet and hydrophobic contacts and they are resistant to reducing and denaturing conditions. FN aggregation shows concentration-dependent polymerization kinetics without lag phase and leads to the formation of two heterogeneous populations of aggregates as evidence by electrospray ionization charge detection mass spectrometry. Unlike other amyloids, plasma FN aggregates do not induce cell death but show decreased gelatin and RGD binding properties compared to native FN, suggesting a different role in ECM-cell interactions. Hence plasma FN seems to be able to form different types of multimers that could have various impacts on cell behavior.

Abbreviations: FN, fibronectin; ECM, extracellular matrix; ThT, thioflavin T; ANS, 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate.

Keywords: fibronectin self-assembly, aggregates, conformation, kinetics, cell behavior

Introduction

Fibronectin (FN) is a multifunctional glycoprotein that mediates cellular interactions and plays critical roles in cell adhesion, migration, growth, and differentiation in the extracellular matrix (ECM)[1]. FN is a dimeric protein composed of disulfide-linked subunits with a molecular weight of 220-250 kDa each [2]. It is a modular protein consisting in a repetition of three different independently folded domains named type I, type II, and type III [3,4]. On the basis of their solubility, FN can be subdivided into at least two forms, the soluble plasma FN and less soluble cellular FN [5]. Plasma FN is produced

predominantly by hepatocytes [6] and secreted into plasma as a soluble protein, while cellular FN is secreted by fibroblasts and endothelial cells and is mostly bound to the cell surface or deposited as insoluble multimers in the extracellular matrix.

Insoluble FN can be found under various forms in tissues, *i.e.* fibrils but also high molecular weight aggregates, which have been shown to be involved in different phenomena. Fibrils of FN have been shown to play important roles in the dynamic of the ECM, in the deposition of other ECM components like collagen and in cell adhesion and proliferation [7,8]. Beside fibrillation, FN aggregation may be required during initial stages of wound healing and tissue regeneration [9]. However, in pathological context, excessive FN deposition and incorrect remodeling contribute to scarring and fibrosis, and prevent complete tissue regeneration [9]. Inappropriate remodeling, rather than continuous FN deposition, could promote FN aggregation in multiple sclerosis lesions leading to remyelination failure [10]. In kidney, hereditary disease glomerulopathy has been linked to mutations in FN forming non-fibrillar aggregates that could cause defects in matrix assembly [11].

Hence, supramolecular states of FN seem to have important roles in different physio-pathological processes but the mechanism of FN oligomerisation remains to be elucidated. Concerning FN fibrillogenesis, it has been shown that the stretching of FN by cells is necessary for FN polymerization [12]. Fibril formation is initiated by the binding of integrins that results in a conformational change in the FN molecule exposing self-association sites. Mechanical stress will unfold the FNIII domains and may expose some of the internal β -strands in a conformation suitable for hydrogen bonding to a similarly unfolded intermediate of another domain, thus forming stable polymeric structure [13–16]. Receptors clustering and increased concentration of localized FN allow fibril formation, propagation and ultimately, the generation of detergent-insoluble FN matrix composed of high-molecular weight FN multimers [17,18]. FN structure in such FN self-assemblies, as defined by deoxycholate (DOC)-insolubility, is likely the result of strong, non-covalent protein-protein interactions [19,20].

To gain insight into the different molecular steps of FN self-assembly, experimental systems *in vitro* without living cells were developed. In that case, multimerization can be studied with the help of FN fragments like anastellin [21–23]. Such studies confirmed the involvement of the unfolding of ¹⁰FNIII domain and β -strand exchange as potential mechanism for FN multimerization [21,22]. To gain information on the various modifications experienced by the entire FN molecule during the assembly, aggregating experiments consisting in the incubation of plasma FN in different physico-chemical conditions can be undertaken. Assembly without living cells could be induced with high salt concentration by weakening the electrostatic interactions that maintain the compact structure of FN, and thus converting the structure to an extended form suitable for self-assembly. The change of the overall structure of FN was reflected in the conformational change detected by spectroscopic methods such as circular dichroism [24,25], fluorescence [26], and magnetic resonance [27,28].

It has been reported that purified plasma FN formed a disulfide-bonded aggregates without cells under simple but physiologically possible conditions in the presence of a low concentration of reducing agent such as glutathione [29]. Disulfide-bonded aggregates can also be formed after denaturation in guanidine [30], in urea [26] or by temperature [31] whereas a fibrillar form of FN not stabilized by covalent bonds is formed using SDS and sonication [32]. These studies have provided some cues about the different conformations of entire FN, and suggest that this protein can self-assemble into different types of supramolecular assemblies, other than fibrils. However, the mechanisms of FN self-assembly and the role of FN assemblies on cell behavior still remain to be elucidated.

Hence, in this work, we studied entire plasma FN self-assembly without required living cells in order to monitor spectroscopically the kinetics of aggregation and the associated conformational changes. Thermal unfolding was used to trigger FN multimerization. Morphological information on FN assemblies has been obtained by atomic force microscopy (AFM) and molecular weight of intact FN aggregates has been measured using an innovative charge-detection mass spectrometry method. Using Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate (ANS) binding assays and reducing SDS-PAGE, we investigated the conformational changes occurring

during the process by analyzing the molecular contacts that stabilize the aggregated state. By kinetics analysis followed by thioflavin T (ThT) fluorescence, we elucidated steps of FN self-assembly. Affinity chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been used to study the accessibility of FN binding sites like RGD and gelatin binding site, in the aggregated state. As some functionalities of FN are decreased in multimers, we assessed the cytotoxicity of aggregated FN. As the exact roles of different aggregated FN detected *in vivo* still remain to debate, we discussed the putative link between FN aggregates obtained in our study and the cell behavior.

Results

Thermal unfolding of FN

As protein multimerization could be triggered by the unfolding of the protein, we initially studied the thermal unfolding of plasma FN using circular dichroism (CD) (figure 1). The far-UV CD signal of FN is typical of a β -sheet protein, with a minimum at 213 nm (figure 1 inset). There is also a maximum at 227 nm which is characteristic of asymmetric aromatic residues [33]. The human plasmatic FN CD spectrum we obtained is similar to those previously published [24,25,34]. The thermal denaturation was monitored by following the changes in the intensity at 227 nm. FN remained stable between 20°C and 50°C and unfolding transition occurred between 50°C and 70°C to reach maximum unfolding at 80°C (figure 1). Decreasing the temperature back to 20°C did not allow recovering initial CD signal, arguing in favor of the irreversibility of FN thermal unfolding, even at the low protein concentration used (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As thermal denaturation is an irreversible process, no precise T_m but only apparent T_m can be determined at around 65°C. According to the denaturation curve of FN, the protein was unfolded at 70°C, allowing triggering its aggregation by incubation at 70°C and cooled down at 20°C. Aggregates have been analyzed by different methods.

Characterization of aggregates of entire human FN

First, electrospray ionization charge detection mass spectrometry (ESI-CDMS) was used to measure the absolute molecular weight of the aggregates (figure 2a). ESI-CDMS measures both the mass-to-charge ratio (m/z) and the charge (z) for each ion, by image charge detection [35]. This single ion mass spectrometry enables to construct a histogram representative of the mass distribution of the sample [36]. However, while this technique is suitable for highly charged ions (in the megadalton to gigadalton range of molecular weight), electrical noise limits the charge measurements in CDMS. A root mean square (rms) noise of ± 250 e is usually obtained, hence no signal could be detected for sub-megadalton ions [37], thus dimeric form of FN cannot be detected by this technique. The different types of ions detected with FN aggregates are shown in function of their molecular weight and their charge. The color code from blue to red is representative of the density of data points at a given (molecular weight, number of charge) coordinate, the red color highlighting the most highly dense regions. Thus the resulting map shows a relatively tight distribution in mass and in charge. Ions are detected from 15 MDa to about 1250 MDa. Charge repartition overlays a gap from about 300 e to 4000 e. The distributions in mass and in charge of the counted ions are shown on the top and on the left sides of the map respectively. Such projections help in identifying the main population of the ions obtained from aggregated FN. The majority of the ions detected in the sample has a molecular weight below 100 MDa with total number of charges centered about 500 e. However, larger ions with a larger number of charges can also be seen. Hence log normal fitting (in green) shows that FN aggregates are distributed into two main populations: one composed of small aggregates and one of larger ions. Both are observed in the distribution in molecular weight as well as in the distribution in number of charges. The maxima of the deconvolution curve gave a first population with an average molecular weight of 46 MDa and a second one with a molecular weight centered at 236 MDa. Moreover, the first population centered on 46 MDa appears relatively narrow in comparison to the second one which covers a broad spectrum of molecular weight up to 1000 MDa. This analysis shows that the aggregates of FN are quite heterogeneous. Multimers could

contain from less than 30 dimers of FN to a maximum of about 2200 FN molecules. However, two main populations can be distinguished. The main multimeric protein population corresponds to the assembly of about 102 units of dimeric plasmatic FN, whereas the second population of aggregates consists in 521 units of FN in average. Thus ESI-CDMS enables the quantification of the units constituting FN aggregates. On the charge distribution, the repartition of the populations of ions is similar with a narrow population centered at 543 e and a broader population with a maximal charge of 1391 e. Hence the larger aggregates contain 521 units of FN with a charge of 1391 e in average, corresponding to 2.7 charges per dimer. In comparison, the smaller aggregates have 5.3 charges per dimer, as they contain 102 units of FN for a charge of 543 e. The two populations thus present different charging capacities, the larger aggregates having less charges per unit of mass in comparison with the smaller ones. It suggests that FN assemblies could have different supramolecular structures.

Fernandez de la Mora [38] found an interesting empirical correlation between the molecular weight and the average charge of ions formed from non-denatured proteins. Assuming a molecular weight of 450 kDa for dimeric plasmatic FN, the average charge of electrosprayed ions should be about 50 e. For a non-interacting assembly of 102 units of dimeric plasmatic FN, this would lead to a total average charge of $102 \times 50 = 5100$ e. The average charge observed for assembly of dimeric plasmatic FN is much lower (the main multimeric protein population corresponded to the assembly of about 102 units of dimeric plasmatic FN with a charge of 543 e). This unambiguously means that dimeric plasmatic FN proteins are compacted and strongly interacting, hence limiting the surface access for charging. Assuming that non-denatured proteins have the same density as water, *i.e.* 1 g.cm^{-3} , the maximum charge that a charged droplet can hold is given by the Rayleigh limit [39]. A charge of 543 e would correspond to a droplet with a diameter of about 50 nm.

In order to gain information on the morphology of the aggregates, images have been taken by AFM in liquid to avoid a drying effect that could modify the form and the density of the multimers (figure 2b). According to these images, self-assembled FN had a relative compact, ellipsoidal shape. A particle analysis showed that they had an average diameter of 25.5 ± 2.5 nm with a height of 7.5 ± 1.8 nm. Interestingly, this diameter is in a qualitative agreement with the diameter found by CDMS. However these two populations detected by CDMS could not be distinguished by AFM, probably due to the deformation of the soft protein aggregates by the AFM tip. As a control, almost no particle could be imaged on the dimeric FN sample (data not shown).

Amyloid-like FN conformation in the aggregated state

Structural changes of plasma FN during aggregation have been monitored using FTIR spectroscopy. Figure 3 displays FTIR spectra of FN before and after incubation at 70°C. In accordance with data from plasmatic FN, different secondary structures were assigned to peaks of the spectrum of dimeric FN[31]: intermolecular β sheet at 1610 cm^{-1} and 1679 cm^{-1} , intramolecular β -sheet at 1628 cm^{-1} , random coil at 1644 cm^{-1} , and turn at 1663 cm^{-1} (figure 3a). The band at 1568 cm^{-1} corresponded to the side-chain carbonyl of acidic amino acids. Upon aggregation at 70°C, the most obvious change in the spectrum was a shift of the band assigned to intramolecular β -sheet from 1628 cm^{-1} to 1634 cm^{-1} , a wavenumber corresponding to intermolecular β -sheet (figure 3b). The band assigned to turns disappeared in the benefit of the band at 1679 cm^{-1} which increased. As the areas of the bands are proportional to the amounts of corresponding secondary structures, we were able to quantify the relative amounts of each secondary structures for dimeric FN: 19% of turns, 18% of intermolecular β -sheet, 27% of random coil, and 38% of intramolecular β -sheet. After aggregation, we measured 14% of turns, 46% of intermolecular β -sheet, 18% of random coil and 22% of intramolecular β -sheet. The amount of intermolecular β -sheet was thus significantly increased at the expense of all other secondary structures. The most obvious changes can be identified on the difference spectrum between the aggregated and dimeric FN. We can note the increase of the intermolecular β -sheet with the appearance of a new band at 1618 cm^{-1} at the expense of the band at 1628 cm^{-1} (figure 3c). There are also very small changes in the bands of the region around 1675 cm^{-1} . Hence we can

conclude that, upon aggregation, plasma FN undergoes conformational changes from a conformation rich in intramolecular β -sheet and disordered structures to a conformation rich in intermolecular β -sheet.

Beside intermolecular hydrogen bonds, other bonds like disulfide could stabilize FN aggregates. In order to know if disulfide bonds could stabilize FN aggregates, the protein has been analyzed by SDS-PAGE with or without reductant (figure 4). Incubating FN at 70°C modified the migration of the protein (figure 4a). Bands of high molecular weight could be seen after heating 24h at 70°C indicating the formation of aggregates. No modification seemed to occur after 2 hours, showing that the formation of high molecular weight multimers occurs in few minutes and that the aggregates remain stable during 168h of incubation (data not shown). Under reducing conditions, dimeric FN migrated as one band of 250 kDa (figure 4b). The aggregated FN showed a band at the interface between the stacking gel and the running gel (figure 4b). Similar migration profile was obtained for the multimeric FN under non-reducing conditions whereas dimeric FN migrated as a band of about 450 kDa in such conditions (figure 4a). During all electrophoresis experiments, no protein remained trapped at the top of the stacking gel or digested in fragments. These results suggest that no disulfide bridge is involved in FN aggregates formation whereas these multimers are not solubilized by SDS and high concentration of reductant.

To learn more about the molecular interactions that could stabilize FN multimers, we performed ANS binding experiments. The quantum yield and the wavelength of maximum fluorescence emission of ANS depend upon the polarity of the environment. In aqueous solution, ANS displays a low quantum yield that upon binding to assessable hydrophobic patches on protein surfaces increases dramatically, accompanied by a blue-shift on the peak wavelength (λ_{\max}) [40]. At identical protein concentrations, the fluorescence intensity of the ANS in presence of FN aggregates was considerably higher than with the dimer (figure 5). Furthermore, the λ_{\max} of ANS in presence of multimeric FN was blue shifted to 470 nm as compared with 490 nm for dimeric FN. This indicated that ANS bound to hydrophobic patches on aggregated FN, not present on dimeric FN, suggesting that the protein has been unfolded and that its hydrophobic core was solvent exposed in the aggregated state.

The combination of FTIR spectroscopy, SDS-PAGE and ANS binding thus showed that FN aggregates were mainly composed of intermolecular β -sheet and that these aggregates were very stable, rich in hydrophobic patches and resistant to SDS denaturation. The presence of such structures into a self-assembled protein is one of the signatures of amyloids.

Protein concentration dependence of the formation of human FN aggregates

Kinetics analysis could give information on the different steps of aggregates assembly mechanism. Like for amyloids, the time course of the FN aggregation can be monitored using thioflavin T (ThT), thus confirming the amyloid-like feature of FN multimers. ThT is a fluorescent dye that interacts with amyloid assemblies, *i.e.* with the individual β -strands, leading to a rotational immobilization of ThT molecules and resulting in an increase in the fluorescent intensity around 480 nm [41]. ThT is not stable at the temperature used here for the experiments. Indeed a hydroxylation process occurs at high temperatures ($T > 35^\circ\text{C}$), which hinder the possibility to follow *in situ* the kinetics of ThT emission band. Aggregation kinetics of identical samples were performed at 70°C and samples were cooled down at 25°C at different time points, in order to stop the aggregation process. Aliquots of ThT were then added at final equimolar concentration and fluorescence emission was measured upon excitation at 442 nm at 20°C.

The kinetics of aggregation were studied over a range of protein concentrations in order to further characterize the mechanisms of multimers formation. Figure 6a shows dependence of the kinetics on the protein concentration monitored by ThT fluorescence. No lag time was detected at the beginning of the reaction regardless of FN concentration. Therefore, the time dependence curves were fitted with exponentials. Two exponentials were necessary to correctly match the experimental data (Eq. 1). The kinetics were biphasic at each protein concentration. The amplitude and the rate of

the ThT fluorescence enhancement were obtained for the various FN concentrations. The observed rate decreased with an increase in protein concentration in the range of 0.55 to 2.8 μM (figure 6b). The amplitude of ThT fluorescence change increased linearly with FN concentration (figure 6c) but the ratio between the amplitudes of the fast and the slow phases remained globally stable and equal to two, suggesting that two types of states of FN are involved in the process.

Modification of FN functions

As a component of the ECM, FN is known for critically impacting cell processes [1]. These functions are mediated by various binding domains for different ligands such as heparin, fibrin, gelatin, or integrins. To investigate whether the multimeric FN retains these binding activities, affinity chromatography for gelatin has been performed. The affinity of multimeric FN for gelatin was reduced by 60% in comparison to dimeric plasma FN (table 1). The accessibility of the RGD in the aggregates has been tested using ELISA. The results showed that, for the three quantities of FN tested, the RGD domain was not accessible in the multimeric state (table 2).

Regarding these results, we hypothesized that the impairment of FN function could disturb cell viability. Moreover, some amyloid aggregates have been shown to induce cell death. To assess the cytotoxicity of aggregated FN, we performed a cell viability assay on SKOV3 cells. FN has been shown to support tumor cells survival while a fibrillar form of FN obtained *in vitro* lead to cancer cells death [32]. Our result showed that the viability of SKOV3 cells was not affected when cultured for 48h on multimeric FN at concentrations ranging from 25 to 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figure 7). Hence, the impairment of some FN functions cannot be linked to a cytotoxic effect.

Discussion

In the present study, the aggregation of entire plasma fibronectin has been studied at physiological pH. The conformation of the aggregates has been investigated and we showed that, upon incubation at 70°C, dimeric FN assembled into two main populations of multimers that have amyloid features. The kinetic of formation of the amyloid-like aggregates monitored by thioflavin T fluorescence was found to depend on the protein concentration. Remarkably, the process was slower at higher FN concentrations. We showed that aggregated FN lost some binding properties, known to be crucial for its function in the ECM. However the amyloid-like multimers of FN did not appear to be toxic for the cells. This work allows discussing some steps in FN structural dynamics and the putative involvement of FN aggregates in physiological and pathological processes.

Irreversible thermal unfolding of plasma FN lead to the formation of amyloid-like aggregates

Using far-UV CD, we showed in this study that human plasma FN started to unfold at temperatures above 55°C, with an apparent mid-point temperature at 65°C (figure 1). Unfolding occurred over a broad range of temperature from 55°C to 80°C, which suggests that plasma FN can undergo a complex unfolding process due to its modular structure. Indeed the different FN modules, although having similar structural β -sandwich fold, [42] could be more or less thermostable [43] and have slightly different folding pathways [44]. Thus all FN domains assembled together in the entire FN could lead to a complex folding process of the protein.

In this study, we show that FN thermal denaturation is irreversible as it has been demonstrated for other proteins. Protein unfolding is often non reversible due to aggregation induced by the high protein concentrations used for specific experiments. Hence, FTIR and isothermal calorimetry measurements showed also the irreversibility of FN denaturation at high concentrations (above 5 mg.mL^{-1}) [31,45]. Our results show that human plasma FN thermal unfolding is irreversible even at the low concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, lower than physiological concentration found in plasma (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), suggesting that the irreversibility of the process is not due to molecular crowding. However, it seems to be an intrinsic property of the protein that could be important for its dynamic *in vivo*. It could also be considered that modules of the long molecule of plasma FN could interact together and contribute to the irreversibility of FN unfolding.

Our results show that different intermolecular interactions stabilize the aggregated state. According to the FTIR experiments, FN undergoes large conformational changes during multimerization, with an increased number of intermolecular β -sheet and a decreased number of intramolecular β -sheet and turns (figure 3). Hence, aggregates of human entire plasma FN are stabilized by intermolecular hydrogen bonds formed by β -strand exchange as it has been suggested for FN fragments like a recombinant ⁹FNIII module [14], and the ¹⁰FNIII [21]. We also questioned if disulfide bonds could link FN aggregates besides hydrogen bonds, as the presence of FN aggregates stabilized by disulfide bonds in FN matrix of cells is still matter of debate [2,46,47]. FN sequence contains many cysteines and 58 disulfide bonds. Here we demonstrated that intermolecular disulfide bonds were stable even after 72 hours of incubation at 70°C (figure 4), probably because thermal denaturation induced neither complete FN unfolding nor covalent bonds breakage in these conditions. These results indicate that multimers of FN are not stabilized by disulfide bonds, thus correlating the studies of Chen & Mosher and of Ohashi & Erickson who both concluded that there is no evidence of disulfide-bonds aggregates in FN matrix by using two different strategies [19,20]. By using SDS-PAGE (figure 4b), we also observed that FN aggregates formed at 70°C were resistant to SDS denaturation and remained trapped at the top of the stacking gel, similarly to FN multimers extracted from fibroblasts matrix by Ohashi and Erickson [20]. In addition to intermolecular hydrogen bonds, the good stability of aggregated plasma FN could be explained by the formation of hydrophobic interactions according to the ANS binding experiments (figure 5). Here we show that *in vitro* unfolding of full-length plasma FN lead to the formation of compact multimers stabilized by non-covalent bonds, *i.e.* intermolecular hydrogen bonds in intermolecular β -sheet and hydrophobic interactions, such properties being identified into FN multimers extracted from ECM matrix. Interestingly, these features are also known to characterize amyloids. Amyloids have been first associated with proteins involved in pathologies like Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob diseases. They are highly ordered protein aggregates with a filamentous morphology that is generally unbranched with an indefinite length and diameters from 2 to 20 nm.

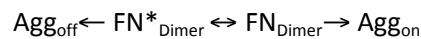
To confront plasma FN self-assemblies with classical amyloids, we performed AFM experiments to characterize their morphology, *i.e.* filamentous or globular. Until now, few morphological data were available on plasma FN aggregates formed *in vitro*. Ellipsoidal particles of about 25 nm of diameter and 7.5 nm of height were observed by AFM (figure 2b), arguing in favor of a very compact conformation of the aggregates. In comparison, dimeric plasma FN in solution has been shown to have a globular shape with a hydrodynamic radius of 8.7 nm according to dynamic light scattering experiments [48]. This radius increases to about 22 nm when the protein is unfolded in 5 or 8M urea, suggesting a more extended conformation of the protein [48,49]. This size is consistent with the 25 nm particles of aggregated FN observed in our AFM experiments. Hence these aggregates could be made of multimerized elongated FN units.

Here, we demonstrate that, beside fibrils, unfolding of FN can trigger its self-assembly into aggregates with amyloid properties. Our results suggest the importance of FN modules in the dynamic of the entire protein. Some amyloid features have been revealed in FN fragments like FNIII domains [14] and anastellin [16]. The complex irreversible unfolding of plasma FN could be due to inter-domain contacts, leading to non-native interactions and the formation of compact amyloid-like aggregates.

Aggregation of plasma FN does not follow the nucleation-dependent polymerization model

The kinetics of plasma FN aggregation is different than what has been described for typical amyloid formation, which comprises classically three phases: lag, exponential growth and stationary phases [50]. In the amyloid case, the assembly occurs on a complex energy landscape, involving multiple and competing paths that lead to aggregates of different morphological types. The reaction accelerates as the protein concentration increases: the lag phase, which reflects the time required to form the nucleus, is shortened, and the growing phase, a diffusion-controlled process, is faster. However, not all amyloids are formed by nucleation and growth, such as transthyretin [51],

phosphoglycerate kinase [52], β 2-microglobulin [53]. Amyloid oligomers and precursors are more likely to be generated along a non-nucleated pathway than by nucleation and growth. Some observations suggest that FN aggregation does not follow the nucleation-dependent polymerization model: absence of lag phase and absence of critical concentration limiting the initiation of the assembly (figure 6a). Hence, these remarks argue in favor of an isodesmic polymerization model [54,55]. Plasma FN aggregation kinetics does not follow a double exponential growth and the ratio of the amplitudes is close to two (figure 6c), which suggests that two types of aggregates could be formed from two FN states. The reaction scheme allowing the explanation of our data could be as follows:



In solution, are present concomitantly two forms of FN dimers that are in a slow equilibrium. The equilibrium is not modified during the assembly process. One FN state (FN_{Dimer}) polymerizes into aggregates on-pathway (Agg_{on}), forming intermolecular β -sheet and binding thioflavin T, whereas the other FN state ($\text{FN}^*_{\text{Dimer}}$) self-assemble into aggregates off-pathway (Agg_{off}) with a slightly different structure that binds ThT less efficiently. Upon increased protein concentration, the formation of off-pathway aggregates is favored, at the expense of the on-pathway aggregates, decreasing the overall aggregation rate.

One FN state could polymerize into on-pathway aggregates, forming the main aggregates population at low concentrations. However, at high protein concentrations, the main kinetic reaction corresponds to the formation of off-pathway aggregates from another FN state. These two states could originate from the complex thermal unfolding process of plasma modular FN and due non-native contacts between FN domains.

Interestingly, two populations of aggregates can also be detected using CDMS (figure 2a): heavy aggregates which have less charge per unit of mass than smaller ones. Hence, in one side, FN could assemble into heavy, compact aggregates, with a few charges or into smaller multimers less compact or more extended and forming more charged ions. With the help of the reaction scheme, we could hypothesize that $\text{FN}^*_{\text{Dimer}}$ could be more compact, being able to form high molecular weight aggregates off-pathway. The supramolecular form of these assemblies could also be relatively compact, thus preventing optimal binding of ThT. In contrast, FN_{Dimer} could be able to unfold and form smaller aggregates on-pathway with a more extended shape that allows better binding of ThT molecules on the intermolecular β -sheet.

Further experiments will be necessary to isolate and characterize these two states as well as to establish their assembly mechanism unambiguously. The putative involvement of these states and FN aggregates into FN fibrillation process should also be investigated.

Amyloid-like aggregates of FN are not cytotoxic but have impaired binding properties

A large set of data implies small amyloid oligomers as the species responsible for cellular toxicity in diseases [56]. Our results suggest that amyloid-like aggregates of plasma FN are not toxic for SKOV3 cells (figure 7). However, FN aggregation is correlated with decreased functions *i.e.* gelatin binding and cell interaction through RGD accessibility (table 1 and 2). The gelatin binding domain is in the amino-terminal region of the protein and consists of ^6FNI , $^{1-2}\text{FNII}$ and $^{7-9}\text{FNIII}$. FN interactions with cells are mediated mainly by the $\alpha_5\beta_1$ integrin, which binds the RGD sequence in the tenth FN type III domain ($^{10}\text{FNIII}$) [57,58]. FN conformational changes occurring during the self-assembly process seem to form multimers whose gelatin binding domain and RGD sequence should be buried within the aggregates and/or involved in tight intermolecular contacts. The decreased accessibility of these functional domains and the amyloid feature of FN aggregates suggest their potential effect on the cell behavior. We can wonder if FN could belong to the family of the functional amyloids that are involved in various physiological functions including bacterial biofilm composition [59,60], hormonal regulation [61], melanin synthesis [62] and apoptosis regulation [63]. The formation and the role of fibrillar FN have been a topic of interest since a long time whereas only few studies discussed the potential roles of aggregated FN. After tissue injury, FN aggregates seem to persist and prevent

correct tissue regeneration [9], whereas in central nervous system, FN aggregates contribute to remyelination impairment in a sclerosis context [10]. Here, aggregates of plasma FN did not exhibit any cytotoxic effect on cells as observed for other amyloid oligomers and another fibrillar form of FN obtained *in vitro* [32]. However, the impairment of their gelatin binding function could prevent the correct interaction with collagen fibrils, thus disturbing the formation and the stability of the ECM. Such abnormal ECM could lead to incorrect tissue regeneration and remyelination. The inaccessibility of the RGD in FN aggregate state could also participate to this impaired tissue homeostasis. In our study, we investigated FN aggregation induced by temperatures higher than physiological ones. In the skin, burn injury occurs for temperatures higher than 50°C and regarding our results we can wonder the effects of such temperatures on the proteins of skin ECM. Burn could lead to the unfolding and the aggregation of FN and disturb the stability of the ECM. In that specific case, it could be interesting to investigate the role of multimers of FN to know if they could help or in contrast, disturb wound healing. In another context, some studies established a link between aggregates of FN and cancer. Indeed, clotted plasma consisting predominantly of cross-linked fibrin and FN has been shown to support tumor cell survival, invasion and proliferation [64]. Preliminary results in our lab show that aggregates of plasma FN could impact ovarian cancer cell migration. Further experiments will be necessary to know the involvement in cancerous processes of the amyloid-like aggregates formed in our study.

In conclusion, we have shown that plasma FN have a complex irreversible thermal unfolding process that could trigger its multimerization. Unfolded FN can spontaneously undergo conformational changes and self-assemble into heterogeneous high molecular weight multimers of compact shape. These aggregates show amyloid features, binding ThT and being stabilized by intermolecular β -sheet and hydrophobic contacts but not by covalent disulfide bonds. Our work points out for the first time several steps in FN multimerization process by kinetics studies. Two states of plasma FN could coexist and aggregate, without any lag phase, into two different populations of multimers: one through an amyloid-like aggregates pathway and the other off-pathway. Although having amyloid features, these multimers do not induce cell death. However, in the aggregated conformation, the gelatin binding domain and the RGD sequence are much less accessible than in the native dimeric state of FN, suggesting a different role in ECM-cell interactions. Hence plasma FN seems to be able to form different types of multimers and have various impacts on cell behavior. Our results suggest also that dimeric FN in plasma could exist in different states. The characterization of such soluble states as well as aggregates and their involvement in different physio-pathological processes is very important to understand the multifunctionality of FN.

Materials and Methods

Purification of plasma fibronectin

Fibronectin has been purified from human plasma as described by Poulouin *et al.* [65]. Briefly, a gelatin-sepharose column (gelatin-sepharose 4B, GE-Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) was equilibrated with Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, 500 mM NaCl at pH 7.4. Plasma was then loaded onto the column and the bound fibronectin was eluted using Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, 250 mM NaCl, 3 M urea. Fibronectin solution was then loaded onto a heparin-sepharose column (Heparin-spharose™ 6 fast flow, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) previously equilibrated with Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, 75 mM NaCl at pH 7.4. After the elution from the heparin column with Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, 500 mM NaCl, fibronectin was loaded and eluted from a new gelatin-sepharose column as described above. Fibronectin was filtered through a 0.22 μ m filter and stored at +8°C, in 10mM HEPES buffer, pH 7.4. The degree of purity was checked by SDS-PAGE electrophoresis and western blotting; it was found to be around 98%. Protein concentration was determined from the absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of 1.28 L. g⁻¹. cm⁻¹. The molecular weight of plasma FN was estimated at 450 kDa.

Aggregation studies

For aggregation studies, fibronectin was incubated at 70°C under orbital rotation at 600 rpm for different durations. Different concentrations, from 0.25 mg.mL⁻¹ to 1.25 mg.mL⁻¹ were tested. The absence of proteolysis was verified by SDS-PAGE.

Circular dichroism measurements

Measurements were performed using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with a Pelletier temperature controller.

CD spectra were measured in 1 mm quartz cuvette with an accumulation of 10 scans at a scanning speed of 200 nm.min⁻¹, and a bandwidth of 4 nm. Far-UV CD spectra were measured at a protein concentration of 50 µg.mL⁻¹ in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4.

Thermal denaturation of fibronectin was monitored by far-UV CD spectroscopy at a wavelength of 227 nm in 1 cm quartz cuvette and at a concentration of 50 µg.mL⁻¹ in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4. The unfolding was followed from 20 to 80°C and from 80°C to 20°C with 1°C.min⁻¹ steps.

Electrospray ionization charge detection mass spectrometry (ESI-CDMS)

Experiments were performed on a custom-built charge detection mass spectrometer with an electrospray source, as described previously[36]. Briefly, aqueous solutions of fibronectin aggregates at around 1 mg.mL⁻¹ were injected at flow rates of typically 150 µL.h⁻¹, and entered the electrospray chamber through a 0.1 mm internal diameter stainless steel capillary tube located inside the needle tip. Nitrogen drying gas was injected between the end cap and the transfer glass capillary and flew through a heater typically set at 200°C. The vacuum interface was composed of a glass transfer capillary that passes the ions into the first stage of the vacuum system, an end cap, a skimmer between the first and second vacuum stages, a hexapole ion guide and an exit lens. The charge detection device was used in a single pass mode, and was built after Keaton and Stradling pattern [66]. The signal induced on the tube was picked up by a JFET transistor and was amplified by a low-noise, charge-sensitive preamplifier and then shaped and differentiated by a home-built amplifier. The signal was recorded with a waveform digitizer card that recorded the entire waveform for each ion passing through the detector tube at a sampling rate of 10 MHz. The data were analyzed to compute the charge and mass of each ion. Internal calibration in charge was performed using a test capacitor that allowed a known amount of charge to be pulsed onto the pick-up tube. And an external calibration was performed using NIST traceable size standards (70, 100, 150, 200, 250 and 300 nm polystyrene nanospheres supplied by Polysciences Europe GmbH).

Mass histograms are built from the collection of a statistically relevant number *N* of single mass measurements for each sample (*N*>5000 typically).

Atomic force microscopy

Multimerized and dimeric fibronectin at 1 mg.mL⁻¹ in 10 mM HEPES buffer were adsorbed onto cleaned glass coverslips over night at 4°C. The AFM images were obtained in liquid in peak force tapping mode using an AFM BioCatalyst instrument (Bruker AXS,SAS, Palaiseau, France) Pyramidal silicon nitride cantilevers (MSNL probes, Bruker) with a spring constant of 0.07 N.m⁻¹ were used. The analysis of the images was performed using Nanoscope analysis (Bruker).

Fourier Transformed Infra-red (FTIR) spectroscopy

Aggregates of fibronectin were formed at a concentration of 20 mg.mL⁻¹ in 10 mM HEPES buffer in D₂O (Euriso-top, St Aubin, France). The protein solution was placed between CaF₂ windows separated by a 50 µm Teflon spacer. Transmission spectra were measured using a Vertex 70 spectrophotometer over the range 1500-1725 cm⁻¹ with an accumulation of 1024 scans and a resolution of 2 cm⁻¹ (Bruker Optic GmbH, Ettlingen, Germany). The spectra were treated and fitted with the JASCO software (Japan).

SDS-PAGE electrophoresis

Aggregated state of fibronectin was checked on 7% bis-acrylamide electrophoresis gel. 10 µg of protein were separated in non-reducing or in reducing conditions with 10%β-2-mercaptoethanol (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Gels were colored with Coomassie Blue.

Thioflavin T and ANS assays

At different time points of aggregation, aliquots of proteins were withdrawn for analysis by thioflavin T (ThT) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) or 8-anilino-1-naphthalene-sulfonate (ANS) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) fluorescence. Filtered ThT or ANS were added to fibronectin at equal molar concentration. The spectra were measured using a Perkin Elmer LS50B spectrophotometer (Waltham, USA). Each spectrum was an average of 3 scans.

The fluorescence emission spectra of thioflavin T were recorded between 460 and 560 nm after excitation at 442 nm. The values of the fluorescence at 482 nm were reported in the figure. The fluorescence emission spectra of ANS were recorded between 400 and 600 nm after excitation at 335 nm.

Kinetics monitored by ThT fluorescence were fitted with the following equation using the software Origin 7.0.

Equation 1:

$$y = A + A_1(1 - e^{-k_1x}) + A_2(1 - e^{-k_2x})$$

where A is the fluorescence intensity at t=0, A₁ and A₂ are the amplitudes of the two exponentials, k₁ and k₂ are the rate constant in h⁻¹.

Gelatin-binding assay

Gelatin binding capacity of FN aggregates was compared to the dimeric fibronectin by affinity chromatography using gelatin-sepharose beads (GE-Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Beads were equilibrated with 10mM HEPES buffer at pH 7.4 and then incubated with 400 µg of fibronectin. After the sedimentation of the beads, the supernatant was collected. The remaining non-binding fraction of fibronectin was retrieved by washing the beads with 10 mM HEPES buffer at pH 7.4. The non-bound fibronectin was determined by absorbance measurement at 280 nm ($\epsilon_{280} = 1.28 \text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). The fraction of bound fibronectin was calculated by subtracting the quantity of not bound fibronectin to the amount of fibronectin initially used (400 µg). Results are given as a percentage of bound fibronectin over the initial amount +/- SEM. Assays were performed in three independent experiments. The statistical significance of differences was evaluated with student's t-test. * p < 0,05 compared to native fibronectin.

Enzyme-linked immunosorbent assay

The cell binding domain accessibility of fibronectin aggregates was compared to the dimeric fibronectin by ELISA assay.

96 well plates were coated overnight with polyclonal anti-fibronectin antibody at a concentration of 5 µg.mL⁻¹ (F3648 Rabbit IgG, Sigma, St Quentin Fallavier, France). After 1 hour of blocking with PBS-BSA 1% at room temperature, 0.675, 1.25 and 2.5 ng of fibronectin were incubated for 2 hours with the capture antibody, washed and then detected with a monoclonal anti-cell binding domain antibody diluted at 1:1000 in PBS-BSA 1% at room temperature (MAB1926 Mouse IgG, Millipore, Darmstadt, Germany). Alkaline phosphatase -coupled anti-mouse antibody diluted at 1:2500 in PBS-BSA 1% was then incubated for 1 hour at room temperature (Sheep IgG, Sigma, St Quentin Fallavier, France). The accessibility of cell binding domain was determined by absorbance at 405nm using an ELx800 microplate reader (Biotek, Colmar, France) after 30 minutes of incubation with 100 µl of 4-Nitrophenyl phosphate Disodium Salt Hexahydrate at 1 mg.mL⁻¹ (Fluka). Results are given as a percentage of accessibility compared to the native fibronectin +/- SEM. Assays were performed in

triplicates in three independent experiments. The statistical significance of differences was evaluated with student's t-test. * $p < 0,05$ compared to native fibronectin.

Cell viability assay

SKOV3 cells were kindly supplied by Dr. L. Poulain from the BioTICLA unit (Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs, Caen, France) and were cultivated at 37°C and 5% CO₂ in RPMI medium (Invitrogen, Cergy, France) supplemented with 1% sodium bicarbonate (Invitrogen, Cergy, France) and 10% of fetal bovine serum (Invitrogen, Cergy, France). 1x10⁴ SKOV3 cells were seeded in 96 wells plate and were allowed to adhere. After 24 hours, cells were incubated for 16 or 48 hours in medium containing 0.5% serum supplemented with 25-100 µg.mL⁻¹ of dimeric fibronectin or aggregated fibronectin. After treatment, the XTT reagents (cell proliferation Kit II, Roche, Meylan, France) were added and incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Cell viability was determined by absorbance at 595 nm and given as a percentage versus control. The result is the average triplicates of at least three independent experiments. The statistical significance of differences was evaluated with student's t-test. * $p < 0,05$ compared to native fibronectin.

Acknowledgements

We thank Catherine Picart (LMGP, Grenoble) and Alexandre Chenal (Institut Pasteur, Paris) for the FTIR measurements and Vincent Forge (CEA, Grenoble) for CD experiments. We are grateful to all members of the MecUp team for helpful discussions. We thank Salima Patel and Emmanuel Pauthe for preliminary studies. Rodolphe Antoine and Tristan Doussinneau are grateful to the Agence Nationale pour la Recherche for financial support of this work (ANR-08-BLAN-0110-01 and ANR-11-PDOC-032-01). Rümeyza Bascetin and this work is support by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-2010-BLAN 1530).

References

1. Hynes, R. O. *Fibronectins*. (2011). (Springer London, Limited).
2. Keski-Oja, J., Mosher, D. F. & Vaheri, A. (1977). Dimeric character of fibronectin, a major cell surface-associated glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 699–706.
3. Petersen, T. E., Thøgersen, H. C., Skorstengaard, K., Vibe-Pedersen, K., Sahl, P., Sottrup-Jensen, L. & Magnusson, S. (1983). Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 137–141.
4. Potts, J. R. & Campbell, I. D. (1996). Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol.* 15, 313–320.
5. Peters, D. M., Portz, L. M., Fullenwider, J. & Mosher, D. F. (1990). Co-assembly of plasma and cellular fibronectins into fibrils in human fibroblast cultures. *J. Cell Biol.* 111, 249–256.
6. Tamkun, J. W. & Hynes, R. O. (1983). Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 4641–4647.
7. Sottile, J. & Hocking, D. C. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* 13, 3546–3559.
8. Sottile, J., Hocking, D. C. & Swiatek, P. J. (1998). Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J. Cell Sci.* 111, 2933–2943.
9. To, W. S. & Midwood, K. S. (2011). Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 21.
10. Stoffels, J. M. J., de Jonge, J. C., Stancic, M., Nomden, A., van Strien, M. E., Ma, D., Siskova, Z., Maier, O., French-Constant, C., Franklin, R. J. M., Hoekstra, D., Zhao, C. & Baron, W. (2013). Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination. *Brain* 136, 116–131.

11. Castelletti, F., Donadelli, R., Banterla, F., Hildebrandt, F., Zipfel, P. F., Bresin, E., Otto, E., Skerka, C., Renieri, A., Todeschini, M., Caprioli, J., Caruso, M. R., Artuso, R., Remuzzi, G. & Noris, M. (2008). Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proc. Natl. Acad. Sci.*105, 2538–2543.
12. Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A. M. & Burridge, K. (1998). Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J. Cell Biol.*141, 539–551.
13. Paci, E. & Karplus, M. (1999). Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: an analysis by biased molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.*288, 441–459.
14. Litvinovich, S. V., Brew, S. A., Aota, S., Akiyama, S. K., Haudenschild, C. & Ingham, K. C. (1998). Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *J. Mol. Biol.*280, 245–258.
15. Ohashi, T. & Erickson, H. P. (2005). Domain Unfolding Plays a Role in Superfibronectin Formation. *J. Biol. Chem.*280, 39143–39151.
16. Briknarová, K., Åkerman, M. E., Hoyt, D. W., Ruoslahti, E. & Ely, K. R. (2003). Anastellin, an FN3 Fragment with Fibronectin Polymerization Activity, Resembles Amyloid Fibril Precursors. *J. Mol. Biol.*332, 205–215.
17. Hocking, D. C., Sottile, J. & McKeown-Longo, P. J. (1994). Fibronectin's III-1 module contains a conformation-dependent binding site for the amino-terminal region of fibronectin. *J. Biol. Chem.*269, 19183–19187.
18. Wierzbicka-Patynowski, I. & Schwarzbauer, J. E. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci.*116, 3269–3276.
19. Chen, H. & Mosher, D. F. (1996). Formation of sodium dodecyl sulfate-stable fibronectin multimers. Failure to detect products of thiol-disulfide exchange in cyanogen bromide or limited acid digests of stabilized matrix fibronectin. *J. Biol. Chem.*271, 9084–9089.
20. Ohashi, T. & Erickson, H. P. (2009). Revisiting the mystery of fibronectin multimers: the fibronectin matrix is composed of fibronectin dimers cross-linked by non-covalent bonds. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*28, 170–175.
21. Gee, E. P. S., Yuksel, D., Stultz, C. M. & Ingber, D. E. (2013). SLLISWD Sequence in the 10FNIII Domain Initiates Fibronectin Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 21329–21340.
22. Ohashi, T. & Erickson, H. P. (2011). Fibronectin aggregation and assembly: the unfolding of the second fibronectin type III domain. *J. Biol. Chem.*286, 39188–39199.
23. Morla, A., Zhang, Z. & Ruoslahti, E. (1994). Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin. *Nature*367, 193–196.
24. Alexander, S. S., Colonna, G. & Edelhoch, H. (1979). The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin. *J. Biol. Chem.*254, 1501–1505.
25. Koteliansky, V. E., Glukhova, M. A., Bejanian, M. V., Smirnov, V. N., Filimonov, V. V., Zalite, O. M. & Venyaminov SYu. (1981). A study of the structure of fibronectin. *Eur. J. Biochem. FEBS*119, 619–624.
26. Patel, S., Chaffotte, A. F., Amana, B., Goubard, F. & Pauthe, E. (2006). In vitro denaturation–renaturation of fibronectin. Formation of multimers disulfide-linked and shuffling of intramolecular disulfide bonds. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*38, 1547–1560.
27. Baron, M., Norman, D., Willis, A. & Campbell, I. D. (1990). Structure of the fibronectin type 1 module. *Nature*345, 642–646.
28. Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. & Campbell, I. D. (1992). The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell*71, 671–678.
29. Sakai, K., Fujii, T. & Hayashi, T. (1994). Cell-free formation of disulfide-bonded multimer from isolated plasma fibronectin in the presence of a low concentration of SH reagent under a physiological condition. *J. Biochem.* 115, 415–421.

30. Mosher, D. F. & Johnson, R. B. (1983). In vitro formation of disulfide-bonded fibronectin multimers. *J. Biol. Chem.* 258, 6595–6601.
31. Pauthe, E., Pelta, J., Patel, S., Lairez, D. & Goubard, F. (2002). Temperature-induced β -aggregation of fibronectin in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1597, 12–21.
32. Huang, C.-Y., Liang, C.-M., Chu, C.-L., Peng, J.-M. & Liang, S.-M. (2010). A fibrillar form of fibronectin induces apoptosis by activating SHP-2 and stress fiber formation. *Apoptosis* 15, 915–926.
33. Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. & Fersht, A. R. (1993). Circular dichroism studies of barnase and its mutants: characterization of the contribution of aromatic side chains. *Biochemistry* 32, 10303–10313.
34. Patel, S., Chaffotte, A. F., Goubard, F. & Pauthe, E. (2004). Urea-Induced Sequential Unfolding of Fibronectin: A Fluorescence Spectroscopy and Circular Dichroism Study. *Biochemistry* 43, 1724–1735.
35. Fuerstenau, S. D. & Benner, W. H. (1995). Molecular weight determination of megadalton DNA electrospray ions using charge detection time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1528–1538.
36. Doussineau, T., Bao, C. Y., Antoine, R., Dugourd, P., Zhang, W., D'Agosto, F. & Charleux, B. (2012). Direct Molar Mass Determination of Self-Assembled Amphiphilic Block Copolymer Nanoobjects Using Electrospray-Charge Detection Mass Spectrometry. *ACS Macro Lett.* 1, 414–417.
37. Doussineau, T., Kerleroux, M., Dagany, X., Clavier, C., Barbaire, M., Maurelli, J., Antoine, R. & Dugourd, P. (2011). Charging megadalton poly(ethylene oxide)s by electrospray ionization. A charge detection mass spectrometry study. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 617–623.
38. Fernandez de la Mora, J. (2000). Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal. Chim. Acta.* 406, 93–104.
39. Doussineau, T., Santacreu, M., Antoine, R., Dugourd, P., Zhang, W., Chaduc, I., Lansalot, M., D'Agosto, F. & Charleux, B. (2013). The charging of micellar nanoparticles in electrospray ionization. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 14, 603–609.
40. Stryer, L. (1968). Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science* 162, 526–533.
41. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. & Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 177, 244–249.
42. Potts, J. R. & Campbell, I. D. (1994). Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 648–655.
43. Ingham, K. C., Brew, S. A., Broekelmann, T. J. & McDonald, J. A. (1984). Thermal stability of human plasma fibronectin and its constituent domains. *J. Biol. Chem.* 259, 11901–11907.
44. Plaxco, K. W., Spitzfaden, C., Campbell, I. D. & Dobson, C. M. (1997). A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules. *J. Mol. Biol.* 270, 763–770.
45. Niedzwiadek, W. E., O'Bryan, G. T., Blumenstock, F. A., Saba, T. M. & Andersen, T. T. (1988). A calorimetric analysis of human plasma fibronectin: effects of heparin binding on domain structure. *Biochemistry* 27, 7116–7124.
46. Hynes, R. O. & Destree, A. (1977). Extensive disulfide bonding at the mammalian cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 2855–2859.
47. McConnell, M. R., Blumberg, P. M. & Rossow, P. W. (1978). Dimeric and high molecular weight forms of the large external transformation-sensitive protein on the surface of chick embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 253, 7522–7530.
48. Nelea, V., Nakano, Y. & Kaartinen, M. T. (2008). Size distribution and molecular associations of plasma fibronectin and fibronectin crosslinked by transglutaminase 2. *Protein J.* 27, 223–233

49. Pelta, J., Berry, H., Fadda, G. C., Pauthe, E. & Lairez, D. (2000). Statistical Conformation of Human Plasma Fibronectin. *Biochemistry* 39, 5146–5154.
50. Naiki, H. & Gejyo, F. (1999). Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* 309, 305–318.
51. Hurshman, A. R., White, J. T., Powers, E. T. & Kelly, J. W. (2004). Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry* 43, 7365–7381.
52. Modler, A. J., Gast, K., Lutsch, G. & Damaschun, G. (2003). Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers—a novel pathway of amyloid formation. *J. Mol. Biol.* 325, 135–148.
53. Gosal, W. S., Morten, I. J., Hewitt, E. W., Smith, D. A., Thomson, N. H. & Radford, S. E. (2005). Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J. Mol. Biol.* 351, 850–864.
54. Kumar, S. & Udgaonkar, J. B. (2010). Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Curr. Sci.* 98, 639–656.
55. Frieden, C. (2007). Protein aggregation processes: In search of the mechanism. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 16, 2334–2344.
56. Caughey, B. & Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298.
57. Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30–33.
58. Dedhar, S. & Ingham, K. C. (1995). Isolation of a novel integrin receptor mediating Arg-Gly-Asp-directed cell adhesion to fibronectin and type I collagen from human neuroblastoma cells. Association of a novel beta 1-related subunit with alpha v. *J. Cell Biol.* 110, 2185–2193.
59. Dueholm, M. S., Petersen, S. V., Sønderkær, M., Larsen, P., Christiansen, G., Hein, K. L., Enghild, J. J., Nielsen, J. L., Nielsen, K. L., Nielsen, P. H. & Otzen, D. E. (2010). Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 77, 1009–1020.
60. Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. & Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2230–2234.
61. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P. R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W. & Riek, R. (2009). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325, 328–332.
62. Berson, J. F. et al. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* 161, 521–533.
63. Chenal, A., Vendrely, C., Vitrac, H., Karst, J. C., Gonneaud, A., Blanchet, C. E., Pichard, S., Garcia, E., Salin, B., Catty, P., Gillet, D., Hussy, N., Marquette, C., Almunia, C. & Forge, V. (2012). Amyloid fibrils formed by the programmed cell death regulator Bcl-xL. *J. Mol. Biol.* 415, 584–599.
64. Malik, G., Knowles, M., Dhir, R., Xu, S., Yang, S., Ruoslahti, E., & Pilch, J. (2010). Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Res.* 70, 4327–4334.
65. Poulouin, L., Gallet, O., Rouahi, M. & Imhoff, J. M. (1999). Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. *Protein Expr. Purif.* 17, 146–152.
66. Keaton, P. W., Idzorek, G. C., Rowton Sr., L. J., Seagrave, J. D., Stradling, G. L., Bergeson, S. D., Collopy, M. T., Curling Jr., H. L., McColl, D. B. & Smith, J. D. (1990). A hypervelocity - microparticle - impacts laboratory with 100-km/s projectiles. *Int. J. Impact Eng.* 10, 295–308.

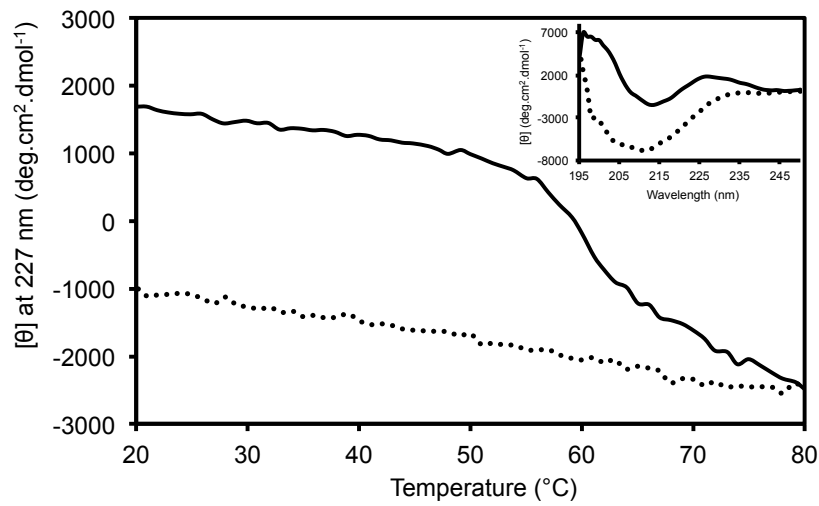


Figure 1. Fibronectin thermal denaturation. The ellipticity of fibronectin at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ was monitored at 227nm from 20 to 80°C . Solid and dot lines respectively represent thermal denaturation and renaturation curve of fibronectin. Inset figure represents far UV circular dichroism spectra of fibronectin before (solid line) and after (dotted line) denaturation followed at a concentration of $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ at pH 7.4.

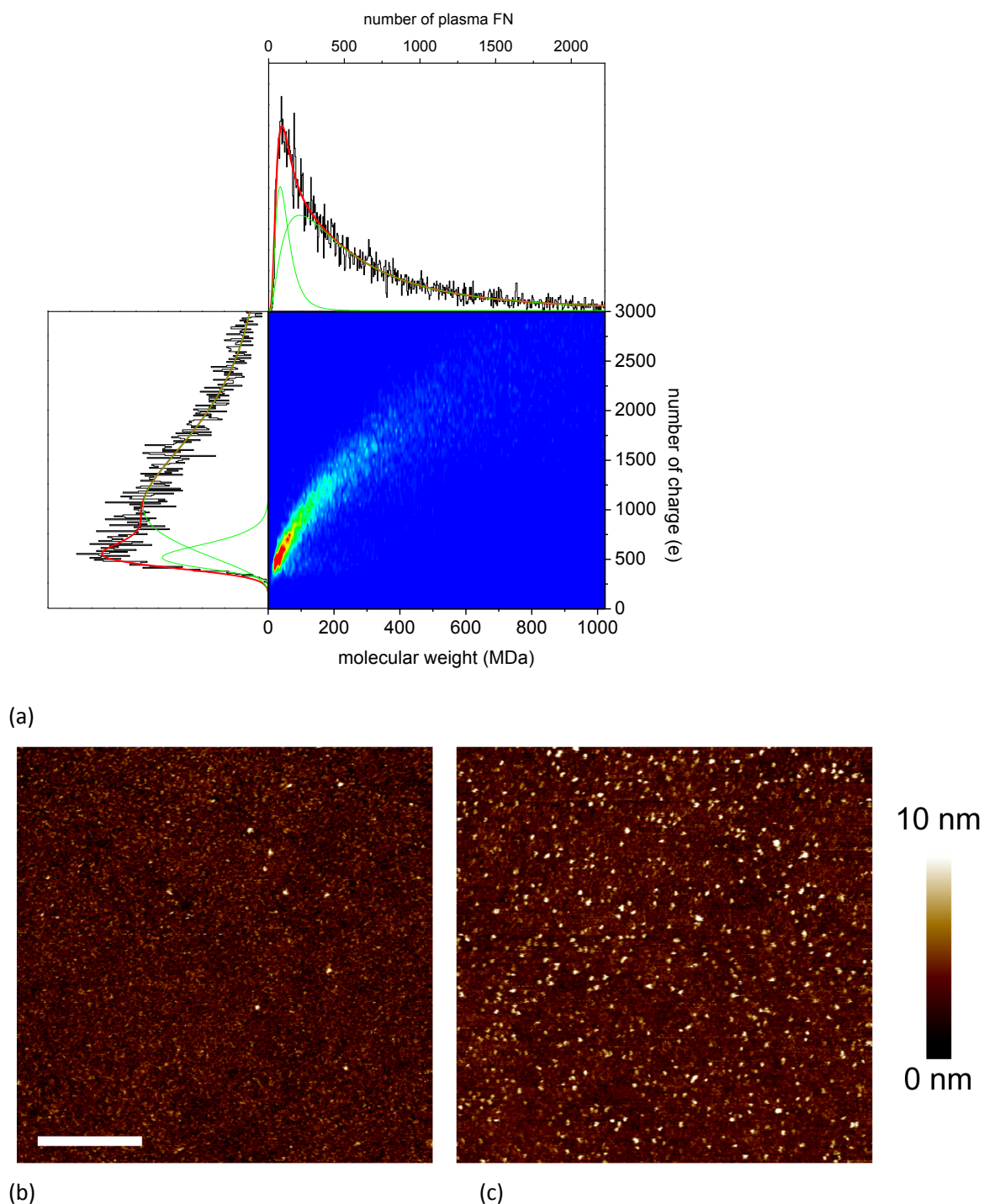


Figure 2. Size and morphological analysis of aggregated FN. (a) Mass spectrometry measurement by CDMS. The number of counted ions is depicted by different color: the red corresponding to the highest amount of ions and the blue, the lowest. On the top and left side of the map are shown the distributions of the ions in charge and in mass respectively. (b) AFM image in liquid of native fibronectin. (c) AFM image in liquid of aggregated fibronectin at 1 mg.mL^{-1} at 70°C during 24h. The scale bar corresponds to 500 nm.

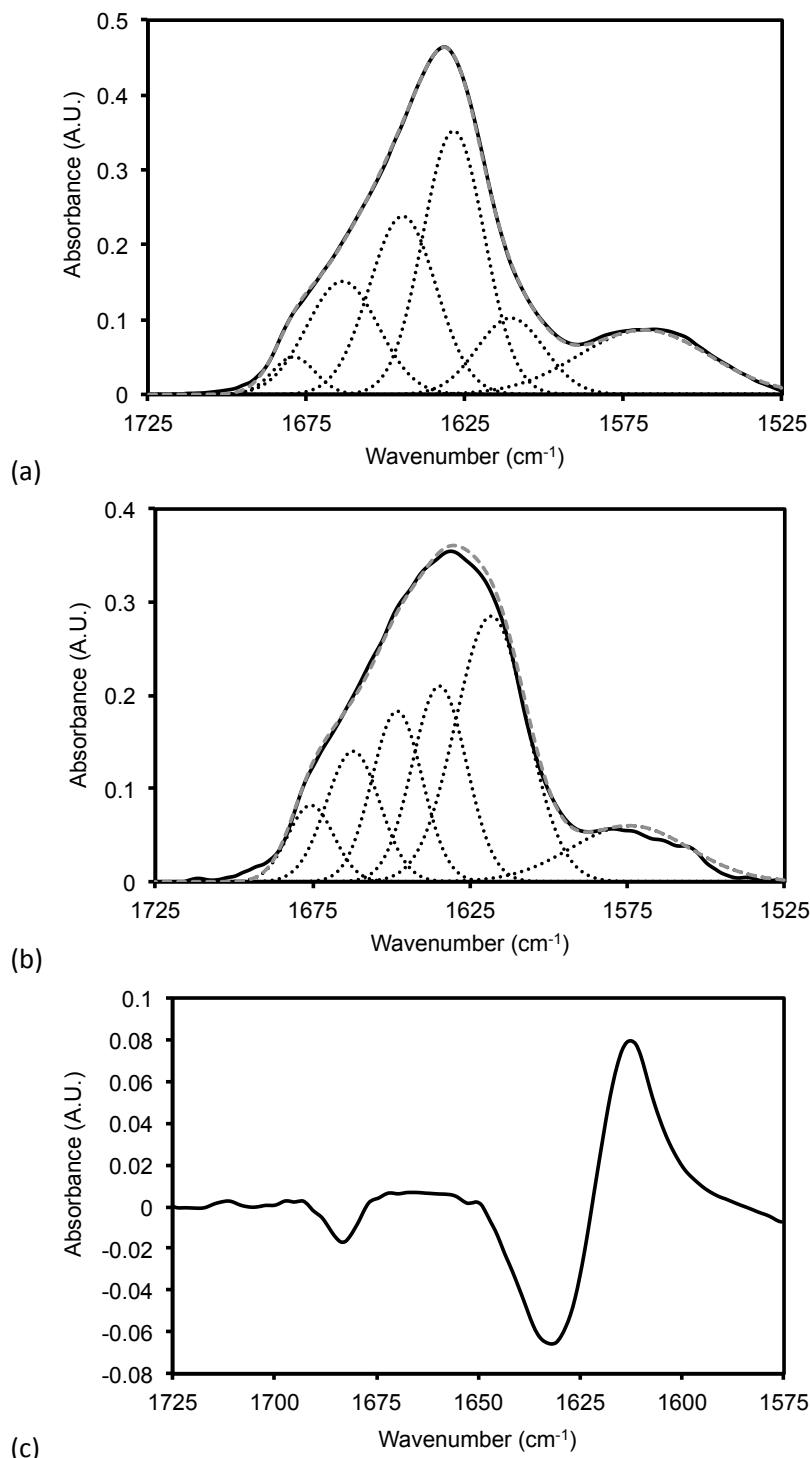


Figure 3. FTIR spectra of dimeric and multimerized fibronectin. Fibronectin was aggregated at a concentration of 20 mg.mL⁻¹ at 70°C under stirring of 600rpm in 10mM HEPES-D₂O buffer. (a) Spectrum of dimeric FN. (b) Spectrum of aggregated FN. (c) Difference spectrum between aggregated FN and dimeric FN. The spectra were deconvoluted into principal components representing the different elements of secondary structure (dotted lines). Their sum (dashed line) overlaps the experimental data (solidline). Measurements were performed at 20°C.

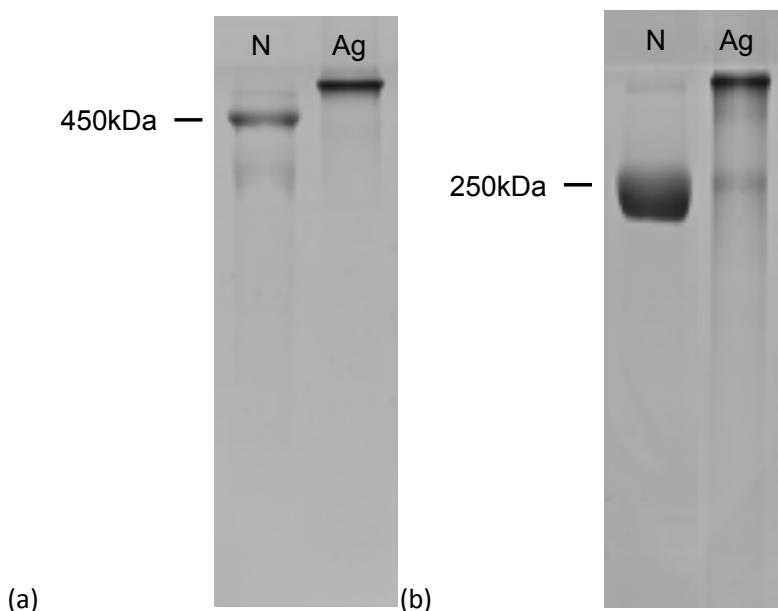


Figure 4 a,b. Electrophoretic analysis of dimeric (N) and Aggregated (Ag) fibronectin. Aggregated FN was incubated 24h at 70°C. 10µg of fibronectin were separated onto a 7% SDS-PAGE gel in non-reducing (a) and reducing (b) conditions.

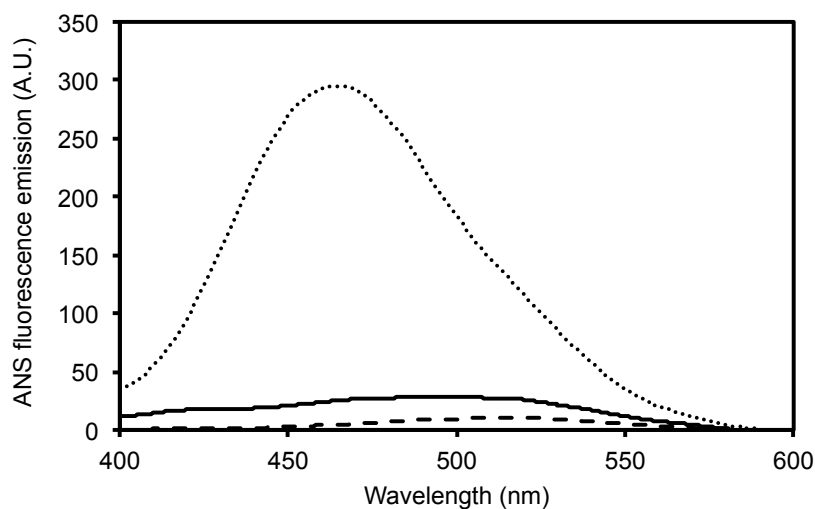


Figure 5. ANS fluorescence measurement in presence of fibronectin. Fibronectin at 1mg.mL⁻¹ was multimerized at 70°C for 24hours under stirring at 600rpm. ANS was added at equal molar concentration with fibronectin before the fluorescence measurement at 20°C using an excitation wavelength of 350 nm. Spectra of aggregated FN (dotted line), dimeric FN (solid line) and ANS (dashed line) are compared.

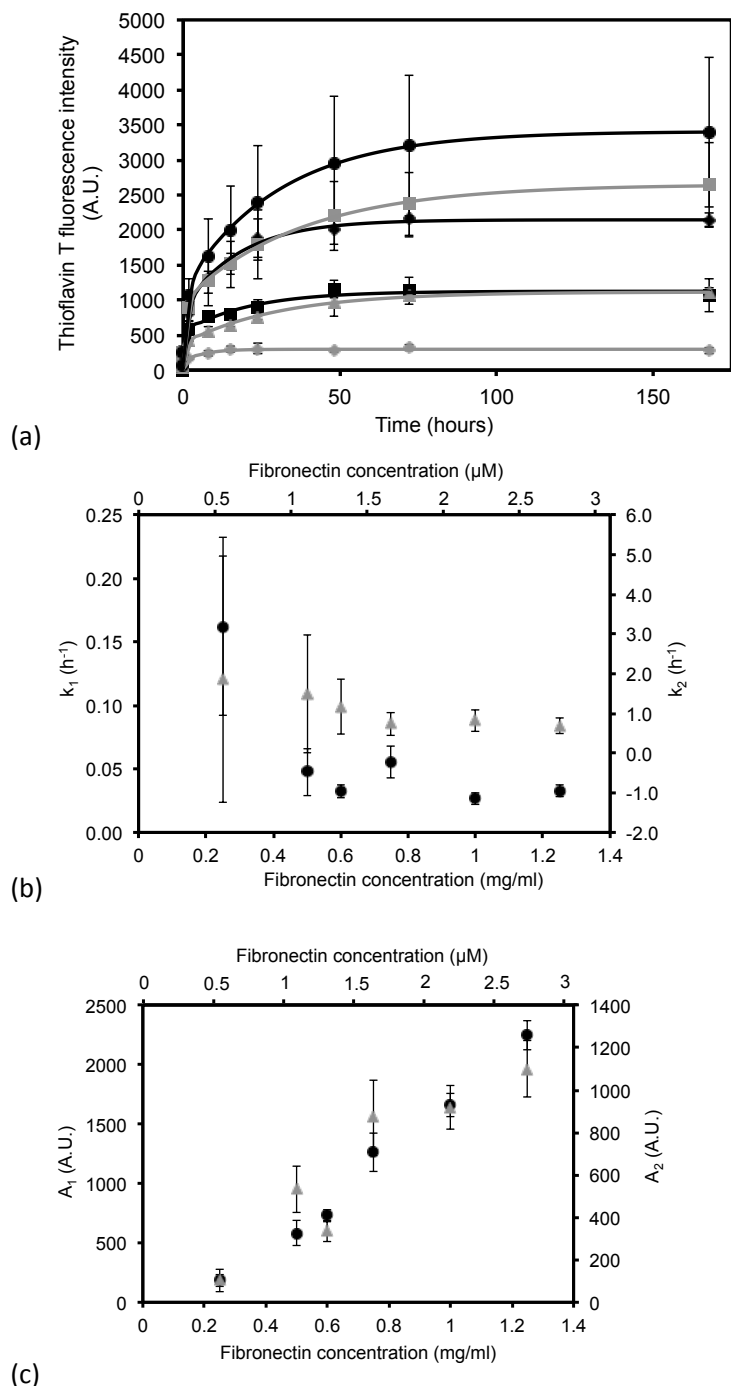


Figure 6. Protein concentration dependence of formation of aggregated fibronectin. ThT-fluorescence-monitored aggregation kinetics at 482nm of FN at 1.25 mg.mL⁻¹ (black circles), 1 mg.mL⁻¹ (gray squares), 0.75 mg.mL⁻¹ (black diamonds), 0.6 mg.mL⁻¹ (black squares), 0.5 mg.mL⁻¹ (gray triangles) and 0.25 mg.mL⁻¹ (gray diamonds). Molar concentrations were calculated with an estimated molecular weight of 450 kDa. (a) Aggregation was performed at 70°C and for each time point, an aliquot of protein was collected and incubated with ThT at equal molar concentration at 20°C before the fluorescence measurement. The solid lines represent the least-squares fits to the double exponential equation (Eq. 1). (b) The two apparent rate constants k_1 (black circles) and k_2 (grey triangles) and (c) the two amplitudes A_1 (black circles) and for A_2 (grey triangles) of the double exponential of FN aggregation obtained from ThT kinetics are plotted against protein concentrations. The errors bars represent the standard deviations calculated from three separated experiments.

Bound fibronectin (%)	
Native	48 ± 7.9
Aggregated	15.6 ± 7 *

Table 1. Gelatin binding assay. The fraction of fibronectin bound to gelatin was tested by affinity chromatography. Dimeric fibronectin and aggregated FN at 70°C during 24h were mixed with gelatin-sepharose beads and after sedimentation of the beads, the supernatant was collected. The binding fraction of fibronectin was then determined by measuring the protein concentration at 280 nm. The results represent the average of three independent experiments +/- SEM. * $p < 0,05$ compared to dimeric fibronectin.

Accessible RGD (%)				
	0.675 ng	1.25 ng	2.5 ng	5ng
Aggregated	-	-	1.2***	1.2***

Table 2. ELISA to determine the accessibility of the RGD cell-binding domain of fibronectin. Aggregated FN was incubated at 70°C during 24h. Percentage was determined compared to the same amount of native dimeric fibronectin. There is no detection of RGD sequence under 2.5 ng. *** $p < 0,005$ compared to dimeric fibronectin. The results represent the average of three independent experiments +/- SEM.

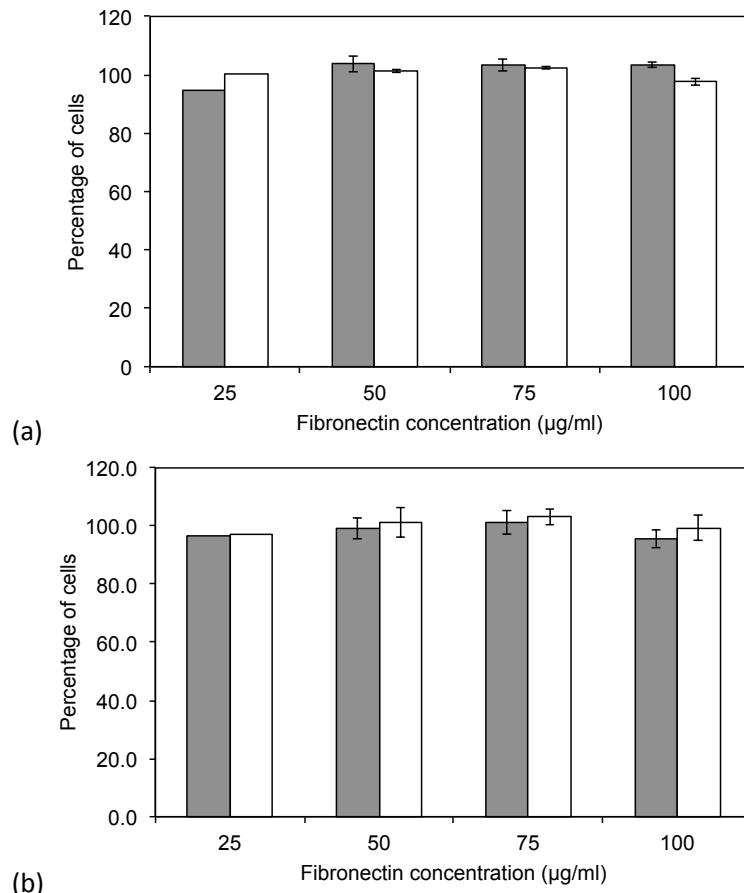


Figure 7. Cytotoxicity assay of fibronectin on SKOV3 cancer cells. After adhesion, SKOV3 cells were incubated for 16 (a) or 48 hours (b) with various concentrations of dimeric (gray bar) or aggregated (white bar) fibronectin in medium supplemented with 0.5% serum. The viability of the cells was then checked by XTT assay. The results represent the average of three independent experiments \pm SEM.

**ARTICLE 2 : LECTINS AS PROBES TO ASSESS GLYCOSYLATION ACCESSIBILITY OF
FIBRONECTIN RELATED TO ITS FOLDING DYNAMIC**

Lectins as probes to assess glycosylation accessibility of FN related to its folding dynamic

Rémy Agniel¹, Charlotte Vendrely¹, Laurent Poulouin^{1, 2}, Rumezha Bascetin¹, Hamanou Benachour¹, Olivier Gallet^{1,*, +}, Johanne Leroy-Dudal^{1, +}

¹Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules, ERRMECe (EA1391), Institut des matériaux, I-MAT (FD4122), Université de Cergy-Pontoise, F-95000 Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France.

*Corresponding author:

E-mail address: olivier.gallet@u-cergy.fr

Tel: + 33 1 34 25 65 99

Fax: + 33 1 34 25 66 94

+ equal contribution

Abstract

Using lectins as probes, we propose to assess the accessibility of glycosylation harbored by a high molecular weight protein, Fibronectin, during its folding dynamic. Fibronectin is a \approx 450 kDa dimeric protein comprising 4 to 9% of glycosylations. It is a key actor within extracellular matrices surrounding cells and displays a great conformational lability related to its functions. Among 15 lectins tested, we showed here that Fibronectin mainly reacted with mannose-binding lectins, specifically with Concanavalin A. When subjected to temperature increase, especially from 25°C to 50°C, Fibronectin underwent a progressive unfolding while Concanavalin A conformation was not affected. The combination of dynamic light scattering and turbidimetry assays with isothermal titration calorimetry analyses, along a protocol we implement here, reveal an increasing binding of Concanavalin A to Fibronectin during the progressive thermal-induced unfolding of the protein core. These data suggest the progressive exposure of its mannosylations during modification of Fibronectin folded state. Fibronectin dynamic could modify the presentation of glycosylations to cell surface lectins and subsequently the cell responses in physiological or pathological ways.

Introduction

Glycosylation represents the most pronounced and most complex form of protein post-translational modifications. In mammalian, the two main types of protein glycosylations are N- and O-glycosylations, in which the glycan is β -glycosidically attached either *via* N-acetylglucosamine to an asparagin or α -glycosidically linked *via* N-acetylgalactosamine to serine or threonine residue, respectively.¹ Such carbohydrate insertions have been found to contribute in a great variety of cellular processes such as signaling, adhesion and molecular recognition.² In the way of sensitive detection and characterization glycoproteins, the use of lectin-based tools has appeared as a strategy of choice.^{1, 3-5} Lectins are naturally occurring non-enzymatic proteins that selectively and reversibly bind to specific glycans.³ Plant lectins are well known to function as cell recognition molecules and trigger reversible agglutination of cells.⁶⁻⁸ Specifically, Concanavalin A (ConA) is a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependent, mannose-binding and homotetrameric legume lectin (25 kDa per monomer), which was first extracted from the Fabaceae jack-bean, *Canavalia ensiformis*. ConA belongs to the calcium-dependent lectin family that is usually named C-type lectin. The latest includes both animal⁹ and plant lectins that share structural and functional homology.¹⁰ ConA is the long-studied representative plant lectin especially owing to its far-ranging biological function such as anti-neoplastic properties^{8, 11} or biotechnological applications like to map glycosylation patterns of clinical interest.¹²

Within the extracellular matrices (ECM) surrounding cells, the most relevant proteins in the organization and function of matrix scaffold are substituted with glycans. More specifically, Fibronectin (Fn) appears as an inescapable component in ECM owing to its pre-assembly along a fibrillar network is required for the deposition of others matrix proteins.¹³⁻¹⁵ Fn interaction with cells through integrin cell surface receptors triggers signaling pathways that lead to the control of cell adhesion, spreading, differentiation and proliferation. It also contributes as a structural framework to cell migration.^{14, 16} First described in 1948 as a “cold insoluble globulin” prior to be recognized as new protein in 1973¹⁷, Fn is a ≈450 kDa dimeric glycoprotein, which presents a modular structure composed of successive binding domains for a great variety of partners such as collagen, fibrin, heparinoids or cells.¹⁶

Not only integrated in ECM of soft and hard tissues, Fn is recovered in several biological fluids such as urines, milk, amniotic fluids, saliva¹⁸ and blood plasma at a concentration around 300 µg.mL⁻¹.¹⁶ Fn harbors 4-9% of O- and N-linked carbohydrates, depending on its localization in the different tissues or biological fluids¹⁶, the N-glycosylations being predominant. The type and the extent of glycosylations confer to the Fn a protection against proteolytic cleavages in specific sites inside the collagen-binding domain.^{19, 20} while changes in Fn glycosylation inside this domain pattern modify the affinity of the protein for gelatin.^{21, 22} Its glycosylations also participate in Fn incorporation and arrangement within the ECM along carbohydrate-carbohydrate interactions²³ Thus, glycan chains, additionally to offer a higher degree of structural complexity could modulate functional binding sites or activity of a protein.^{1, 24, 25} Subsequently, it appears pertinent to target the modification of protein glycosylation pattern in the aim to evaluate physiopathological events as it was reported for blood plasma Fn during liver regeneration after partial hepatectomy.²⁶

Remarkably, Fn is found as a dimeric and compact soluble form within biological fluids, while its ECM-incorporated form is mainly multimerized and fibrillar.^{15, 16, 27, 28} Such structural conversions seem to be essential for Fn biological functions in ECM.^{13, 28} This fibrillogenesis is a complex cell-driven process that mechanically stretches Fn onto cell surface by using integrins- and cytoskeletally-generated forces.^{27, 29} To get a better understanding of Fn folding state under mechanical stress in its biological function, forced unfolding *in vitro* approaches like mechanical manipulations, use of chemical denaturants or modification of physico-chemical parameters have been implemented³⁰⁻³⁴, thus providing insights onto the core protein dynamic. Next to the core protein that could remain stable under defined physico-chemical conditions, glycan residues present great mobility than the protein to which there are linked.³⁵ However, to date, Fn glycosylations fate during the conformational changes that accompany Fn folding response to stresses remains to be determined.

Using ConA lectin as a probe, the current study proposes to monitor the accessibility of Fn glycosylations during its temperature-induced unfolding by different combinatorial approaches.

Results and Discussion

Considering that the glycoprotein Fibronectin is a key player within the extracellular matrices that displays a conformational lability and due to oligosaccharides could modulate the properties of proteins and subsequently the cell responses, we wondered about glycosylation fate in relation to the structural dynamic of the core protein.

Presently, the characterization of specific glycans harbored by proteins is commonly carried through chemistry approaches that rarely take into account their dynamic. Reciprocally, the studies of protein folding ensue from biochemistry and biophysics analyses that generally evade the glycosylations. Here, we propose to combine glycochemistry and structural biology concerns, using lectins as molecular probes, to raise the issue of the dynamic of oligosaccharides accessibility accompanying conformational changes of Fibronectin.

Glycosylation pattern of Fibronectin

Fn molecule presents from 6 to 8 N-glycosylation sites mainly located in gelatin and cell binding domains^{16, 36} and from 1 to 2 O-glycosylations sites^{16, 37} in the IIICS variable domain and in the connecting segment between module I₅ of the fibrin-heparin domain and the module I₆ of the collagen binding domain (Figure 1). The main sequences of anchored saccharides have been listed according to bibliographic data (Figure 1).³⁸ The different glycosylation patterns harbored by human plasma Fn were investigated using a panel of 15 plant lectins, which specifically map different oligosaccharides structures (table 1). As shown in a representative dot-blot analysis (figure 2A), no or faint Fn reactivity with sWGA, WGA, UEA, SBA, SJA, DBA, PNA, GSL-1 and PHA-L lectins was observed. An intermediate signal was detected afterward PSA, LCA, and PHAE lectins hybridized with Fn. A more marked signal increasing with Fn quantity was revealed with ConA, SNA and RCA₁₂₀ lectins. These data were in accordance with ELISA assessment of biotinylated lectins hybridization with plasma Fn, excepted for PSA, LCA, WGA, RCA₁₂₀, whose signal was weaker under ELISA assay in comparison to dot-blot (figure 2B). Such discrepancy between dot-blot and ELISA results observed for 4 out 15 lectins could be related to the influence that exerts the support of assay (*e.g* nitrocellulose or polystyrene for dot blot and ELISA, respectively) onto Fn conformation after adsorption^{39, 40} and subsequently onto glycosylation accessibility. It suggests that working in liquid phase will be a preferential way to probe Fn glycosylations accessibility dynamic.

On the basis of the recognizing pattern of tested lectins (table 1), the dot-blot and ELISA results highlighted that Fn presents mainly accessible biantennary mannosylations and terminal sialic acid. Thus, the major N-glycans harbored by plasma Fn also appear the most accessible. SNA and WGA lectins, which both recognize NeuA terminal sialic acids should equally recognize FN glycosylations. However if SNA mapping is evident, WGA present a weaker signal. Terminal sialic acid is classically described as a mammalian terminal sequence glycosylation that play a key role in blood plasma protein turnover.⁴¹ Because these both lectins could be related to hallmarks of the turnover of proteins within plasma they could not be useful when blood plasma neuraminidase occurred it's why they were not selected. Among the tested lectin, ConA, which has a high affinity for the monovalent trisaccharide 3,6-di-O- α -D-mannopyranosyl- α -D-mannopyranoside⁴², presents the best reactivity both in dot blot and ELISA assays. Owing to lectins are described as inexpensive, readily accessible and versatile binding partners for selection and detection of glycosylated molecules³, it underlines the opportunity to consider ConA as a probe of Fn mannosylations dynamic.

Thermal effects on fibronectin and concanavalin A conformation:

Due to Fn in solution does not form fibrils, even at extremely high concentrations¹⁵, micromanipulation of Fibronectin fragments or modifications of physico-chemical parameters were proposed to reproduced *in vitro* the conformational changes that undergoes Fn *in vivo*.^{27, 30-34, 43} Here, Fn secondary and tertiary structures were studied at 25, 37 and 60°C by circular dichroism (CD, Figure 2A, upper panel), intrinsic tryptophan fluorescence (TRP, Figure 2A, middle panel) and dynamic light scattering (DLS, Figure 2A, bottom panel). Far-UV CD spectra of plasma Fn incubated at 25 and 37°C presented a typical negative ellipticity around $-17.5 \times 10^5 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ at 217 nm confirming its β -sheet composition. At 60°C, a drastic decrease of ellipticity value to $-32.5 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ was observed, indicating an increase of β -sheet structures. At 25 and 37°C, tryptophan fluorescence spectra presented a maximum emission centered at 330 nm, a typical value for buried aromatic residues.³² At 60°C, a slight shift toward increased emission wavelength was observed. Such a red shift is known to come along the exposure of tryptophan residues suggesting a modification in tryptophan local microenvironment within folded Fn. DLS analysis showed no R_H modifications of Fn for temperatures of 25 and 37°C while a marked increase of Fn R_H occurred at

60°C. ConA structure at the same temperatures was also analyzed. As shown in figure 2B, no significant modifications of CD spectra (upper panel), tryptophan fluorescence emission spectra (middle panel) or R_H of ConA (bottom panel) appeared at the tested temperatures excepted a marked R_H increase at 60°C.

When Fn and ConA were subjected a temperature range varying from 25 to 65°C, data collectively illustrate that increasing temperatures induce a progressive unfolding of plasma Fn, which is first accompanied by an alteration of its global conformation seen through an increasing R_H from 40°C and modification of TRP local environment between 40 and 55°C prior a drastic loss of secondary structures after 55°C observed in CD (figure 3, left panel). At higher temperature, a marked increase of R_H was observed with a clear cut-off at 55°C. These observations highlight a fine-tuned conformational transition above 40°C suggesting a structural lability of the protein in a physiopathological range of temperature that remains to be further investigated in regard with the immune function of fibronectin. They also corroborate a previous IFTR study describing that β -aggregation of Fn occurred at 55°C.³⁴ Such aggregation would prevented the refolding of the protein and may allow the exposition of neoepitopes like immunogenic sites in comparison to the native structures.¹⁵ Con A is an all β -protein without disulphide bonds. These two elements would enhance protein flexibility and favor conformational changes at the tertiary structure level.⁴⁴ In the range of temperature varying from 25 to 65°C, ConA structure appears to remain stable under 50°C, from where an increase of R_H is observed (Figure 3, right panel). Such loss of stability since 50°C was also reported during the ConA formation of amyloid aggregates.⁴⁴

Taken together these data illustrate that temperature between 25 and 50°C induces conformational modifications of Fn without affecting ConA. In this temperature range, ConA appears as a useful probe to monitor mannose residues fate during Fn progressive unfolding and justify to carry out further experiments from 25 to 50°C.

Characterization of Fn mannosylations-ConA interaction along Isothermal Titration Calorimetry (ITC) analysis at 25 and 50°C:

For 20 years, ultrasensitive microcalorimeters have been regularly improved and hence appear as a method of choice to study molecular interactions.⁴⁵ They provide in just a single experiment a complete thermodynamic characterization of the binding event. An ITC protocol was designed to monitor for the first time the fate of glycosylations during protein unfolding. Its implementation was carried out at 25 and 50°C that correspond to the milestones of the thermal-induced Fn unfolding without alteration of the lectin probe conformation.

One of the challenges of this procedure was to take into account that Fn is a high molecular weight matrix glycoprotein. ITC analyses commonly require large quantities of protein, thus the lower as possible Fn concentration was assessed. Then, the Fn/ConA ratio that ensured acceptable signal/noise ratio was determined. During the specific ConA/mannose recognition a Ca^{2+} ion assists in organization of the binding site of ConA, which accounts for the metal ion requirement of activity of this lectin²⁵. In addition, the choice of the buffer for interaction is critical during ITC analysis owing to a minimal enthalpy of ionization is researched. Sodium phosphate is often recommended⁴⁶ but not suitable with ConA due to the requirement of divalent cations (Ca^{2+} , Mn^{2+}) for carbohydrate binding²⁵. Here, it was determined that 2.2 μ M of Fn with a ratio of 20:1 ConA per Fn in HEPES (ΔH of 20 kcal.mol⁻¹) were suitable experimental conditions for each assay. Hepes was preferred to Tris according to its low ionization enthalpy comparing to quaternary ammonium buffer, respectively 20 and 47.45 kJ.mol⁻¹.⁴⁷ When experiments were carried out at physiological pH (pH 7.4) with or without 150 mM NaCl (data not shown), typical thermograms at 25 and 50°C showed reduced background noises irrespective to the tested ionic strength and baseline drifts indicate aggregation due to ConA

multivalency effect (figure 4). Experimental conditions for lectins-carbohydrate binding assessed by ITC were previously described.⁴⁸ Soluble Fn-ConA complexes are required to ensure good titration. Thus, ITC experiments with different Fn or ConA concentrations were carried out with the constant will to minimize this effect and ensure good sensitivity and accuracy in stoichiometry and binding constant measurement. The set up protocol we developed has optimal conditions to further study Fn glycosylation in near-physiological conditions.

ConA –mannosylation interactions during Fn unfolding.

Considering the numerous binding domains in Fn with affinity for a great variety of physiological ligand like glycosaminoglycans, collagen, fibrin, etc, artefactual interactions between non C-type mannan-binding domains of ConA with Fn were excluded performing controls experiments of binding in the absence of divalent cations (Ca^{2+} , Mn^{2+}). Under these conditions, no interaction occurs neither under DLS nor ITC analyses (data not shown).

Sensitivity of DLS is particularly high especially with large particles, which scatter more light than small ones. A low Fn concentration (0.22 μM) was used to assess binding dynamic of ConA and measure the evolution of Fn-ConA complex size (330 nm to 2500 nm) before precipitation. In the presence of 1mM Ca^{2+} and 1mM Mn^{2+} , DLS analysis showed that plasma Fn or ConA population solely present a R_H of 11 and 8 nm, respectively (data not shown). An increase of temperature between 25 and 50°C lead to the formation of Fn-ConA complexes with increasing R_H (Figure 5A). Depending on temperature, the latest are present under two populations according to the R_H values, with a cut-off after 37°C. From 25 to 37°C, the R_H of Fn-ConA complexes was stabilized around 400 nm whereas it increases when plasma Fn was incubated at a temperature higher than 37°C and reaches up to 2500 nm at 50°C (Figure 5A). Whatever the temperature, the R_H values are one or two magnitude order higher than R_H of isolated protein reflecting the multivalence effect of tetrameric ConA in binding to Fn.

The complexation of ConA with thermal-unfolded Fn was then followed using turbidimetry. Controls Fn and ConA alone didn't present any absorption at 400 nm irrespective to the range of temperature (data not shown). The Fn-ConA interaction showed a kinetic and thermal-dependent increase of maximal turbidity at 400 nm. The atypical profiles observed at 45 and 50°C from 10 minutes reflect the precipitation of multi-Fn-ConA aggregates (Figure 5B). As shown in figure 5C, the binding velocity of complex formation significantly increases within a range of temperature from 25 to 50°C. The temperature-dependent increase of both maximal turbidimetry and binding velocity suggest enhanced Fn mannosylation moieties accessibility to ConA during Fn unfolding.

On the basis of implemented ITC procedure, ConA binding to plasma Fn at different temperatures was followed using ITC analyses. The c parameter, which is the product of the macromolecular concentration, of the binding constant and of the stoichiometry determines the shape of the binding isotherm. The c values ranged from 5 to 500 represents the best fitting conditions to ensure precise measurements, especially for the binding constant.⁴⁹ As shown in table 2, here the c calculated value form experimental acquisition ranged from 59 to 195. The binding constant (K_b) was calculated as described in material and methods section and the results of at least three independent ITC measures are consigned in Table 2. An increase of K_b from around $2.80 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$ to $5.99 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$ occurred with temperature from 37 to 45°C, with a cut-off between 37 and 40°C. At 50°C, the slight decrease of K_b to $4.01 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$ could be related to agglutination initiation. Unexpectedly, number of binding site per Fn is low (1.3 to 2.13) comparing to potential binding N-glycosylations (6-8). As previously described⁵⁰, these low values could be explained by multivalent cross-linking between ConA tetramer and Fn mannosylations. The stoichiometry of the binding increases only after 45°C (table 2). Under 45°C, the ratio ConA/Fn remains stable at around 1.36 and progressively increases up to 2.13 at 50°C. It suggests that the K_b increases with the relaxation of the Fn structure while the stoichiometry is modified afterward the drastic loss of Fn structure.

Since the presentation of the glycans affects the recognition of glycoprotein by lectins³⁵, the current study reported for the first time that an increasing accessibility of the mannosyl-moieties of Fibronectin occurs during the progressive unfolding of the protein. Heterogeneous glycoforms of the same protein may have different properties or biological activities.³ Besides, modifications of Fn glycosylations pattern were described with aging³⁶ or after partial hepatectomy²⁶ while O-glycosylation of Fn was reported to disrupt mammary acinar morphogenesis and to favor subsequent cancer development.⁵¹ Additionally, the presentation of the glycans on glycoproteins may play a role in modulating protein organization.³⁵ Even if the relationship between the exposure of mannose moieties during Fn unfolding and cell behavior remains to be explored, it could represent a way to regulate the Fn functions without genetic alteration like solubility, serum half-life, immunogenicity and biological activity of secreted proteins.³ It was recently estimated that ECM is enriched in intrinsically disordered proteins lacking a stable 3-D structure under physiological conditions.^{52, 53} Some of the functions attributed to intrinsically disordered proteins include building of molecular and supramolecular assemblies, or displaying different molecular interaction properties.⁵² As N- and O- glycosylations of human Fn affects its interaction with biological receptors expressed at the cell surface^{23, 26}, monitor the fate of Fn glycosylations accompanying the conformational lability of the protein appears complementary of their characterization. Indeed, the dynamic of the protein glycosylation could reflect changes both in its peptide and/or glycans parts³⁵. Taken all together these results suggest that lectins could be useful and powerful probes to fine-tune physicochemical approaches of ECM glycoproteins conformational dynamic and show how biochemical combinatorial approaches could give further insights in comparison to the recent immobilized method like lectin assay⁵⁴ or surface plasmon resonance⁵⁵ to detect such faint structural modifications. *In vivo*, changes of cells glycosylation were associated with physiopathological processes, for example with the ability of cancer cells to metastasize, and subsequently with a poor prognosis.³ Thus, getting insight the glycosylation and protein core dynamics during such processes would have growing interest in biological and biomedical research.

Methods

Reagents

Concanavalin A (ConA) isolated from Jack Bean seeds (*Canavalia ensiformis*) was purchased from Sigma-Aldrich. ConA was prepared freshly in Hepes 10 mM pH 7.4 CaCl₂ 1 mM MnCl₂ 1 mM. Such cations-completed buffer is important to maintain tetrameric functional form of ConA (Kaushik, 2009), hence its concentration was expressed in term of this multimeric form (Mr = 106, 000).

Hepes, Manganese Chloride, Calcium Chloride were extra pure analytical reagents grade and were obtained from Sigma-Aldrich. All buffer solutions were prepared from double deionized water purified through a Direct-Q system (Millipore, St Quentin Fallavier) to 18.2 Megohms resistance. All solutions were filtered (0.22 μm) prior to use.

Fibronectin purification

Human Fn was purified from blood plasma (under an agreement with EFS : French establishment for blood products supplying) by a three steps protocol according to Poulouin et al. (1999). This purification process, based on the affinity of Fn for both gelatin and heparin, is shown to provide a high purification rate >98% (verified on SDS PAGE) combined with a high recovery. The chromatography media were purchased from GE Healthcare and the reagents are analytical grade. After purification, Fn was dialysed against Hepes 10 mM pH 7.4 CaCl₂ 1mM MnCl₂ 1 mM and stored at +10°C to minimize eventual trace of metalloproteolytic degradation but not less in the aim to prevent cold insoluble aggregation The concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm using $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.28$

Lectins Dot Blot

Lectins dot blot was carried out at 37°C. Drops (0.5 µL) of Fn (50, 100, 250 ng) were deposited on a nitrocellulose membrane (Biorad). The membrane was dried prior to revelation. Membrane was blocked with blocking buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, gelatin 0.5%) supplemented with Tween-20 0.25% for 1 hour. Membrane was then incubated in each biotinylated lectins (Vector Laboratories) diluted in blocking buffer at saturating concentration of 0.5 µg.mL⁻¹ for 1 hour. After washing 3x15 min in Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 500 mM, Tween-20 0.25%, Avidin (0.3 µg.mL⁻¹) and Alcalin Phosphatase (0.3 µg.mL⁻¹) were added for 30 min in the same buffer. Membrane was finally washed and revealed with AP color kit from Biorad.

FN glycosylation map by ELISA

Experimentations were carried out in microtiter wells (Maxisorp Nunc) according to the previous Dot Blot protocol. Wells were coated with 250 ng of Fn. After blocking steps and incubation with biotinylated lectins, finally the plates were incubated with the substrate buffer (diethanolamine 10% v/v) and the substrate (*p*-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma). Optical density were obtained using a microplate reader at λ= 420 nm.

Tryptophan Intrinsic fluorescence

Fluorescence spectra were obtained with a Perkin Elmer LS 50B spectrofluorimeter equipped with a temperature control cell holder. Intrinsic fluorescence was monitored in a 110 nm bandpass between 290 and 400 nm with 280 nm excitation at 100 nm.min⁻¹. Emission and excitation slits were set at 5 nm. Fn and ConA concentrations were 0.12 µM and 0.28 µM respectively. At least three replicates spectra were averaged and blanked against a buffer-only control.

Circular Dichroism

CD spectra were recorded on an Aviv circular dichroism spectrometer model 215, equipped with a water-cooled Peltier unit. Measurements were carried out in a 1 mm path length cell at a scan rate of 1 nm.sec⁻¹ with a time constant of 4 s and a bandwidth of 1 nm. An average of three wavelength scans was acquired for Fn and ConA at concentrations of 0.89 µM and 0.38 µM respectively from 205 to 260 nm at 25, 37 and 60°C. The spectrum of dialysis buffer was subtracted to all spectra. The CD units used are the mean residue ellipticity (MRE), expressed in degrees square centimeter per decimol of residue and calculated from the relationship: $\theta_{MRW} = \frac{MRW \times \theta_m}{10 \times d \times c}$ where MRW is the mean residue weight, θ_m is the measured ellipticity in degrees, *c* is the concentration in gram per milliliter, *d* is the path length of the cell in centimeter. Maximum ellipticities for Fn and ConA, respectively 217 and 225 nm, were plotted as a function of temperature.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Hydrodynamic radii (*R_H*) of Fn, ConA and the complex size formed by both proteins binding were measured with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) containing a 633 nm laser (He-Ne) and an avalanche photodiode detector. The scattered light was detected at an angle of 173° (backscattering) at constant temperatures controlled by Pelletier. Experiments were carried out by adding ConA solution in a semi-micro polystyrene cuvette containing Fn at 0.22 µM after 10 minutes incubation at chosen temperature. ConA volume was calculated to reach a molar ratio of 2 Fn for 1 ConA. All incubations were carried out with gentle magnetic stirring, and the measures by DLS were determined after the values had been stable for at least 30 min. Acquisition time was 10 sec, and 12 to 15 acquisitions were averaged per sample. Size distributions were derived by deconvolution of the measured intensity autocorrelation function of the sample, using the general purpose fitting algorithm provided in the Zetasizer software.

Turbidity measurement

Fn solution was diluted with dialysis buffer (Hepes 10 mM pH 7.4) to 1.1 μ M and incubated for 30 min into a peltier device at chosen temperature (25-55°C). Kinetics of Fn-ConA complex formation were carried out by the addition of ConA to Fn solution in a cuvette (4 mL) in order to reach 1:3 Fn/ConA molar ratio. The turbidity increase was recorded by a double beam spectrometer (Uvikon XS – Secomam) with a temperature control cell holder at 400 nm for 30 min (30 measures per minute) under continuous stirring. Fn solution was used as reference. Experiments were repeated three times and averaged.

Isothermal Titration Calorimetry

ITC experiments were performed using a microcalorimeter VP-ITC from Microcal (GE Healthcare, Saclay). All FN-ConA binding experiments were carried out in Hepes buffer (10mM pH 7.4) containing CaCl_2 (1mM) and MnCl_2 (1mM). Samples were filtered (0.2 μ m), dialysed against the same buffer and thoroughly degassed under a vacuum pump. The temperature range is from 20°C to 50°C. For each binding experiment, the reaction cell (1.44mL) was filled with a 2.2 μ M Fn solution. The computer-controlled microsyringe (300 μ L) was filled with a 45 μ M ConA solution and titrated at intervals of 4 min into the reaction cell using 25 injections of 10 μ L after an initial delay of 60 sec. Control experiments were performed for each temperature by injecting the ConA solution into a cell containing Hepes buffer; the heats of dilution were subtracted from those measured in the presence of Fn. Data obtained were fitted to a “one set of sites” model via non-linear least squares method to determine binding constant (K_b), stoichiometry of the reaction (n) using Origin software (Origin Lab) provided with VP-ITC. Each experiment was carried out in triplicate to ensure reproducibility; the data from replicate experiments differed by less than 10%.

Acknowledgments:

This work was funded by the Agence National de la Recherche as the ANR-2010-BLAN 1530 project and supported by the University of Cergy-Pontoise. We thank the Etablissement Français du Sang for providing human blood plasma.

We thank Bruno Baron (PFBMI, Institut Pasteur Paris) for CD analysis, Cédric Vancaeyzeele (LPPI, Cergy-Pontoise University) for DLS measurement and our colleagues: S. Kellouche, C. Picot, F. Carreiras, and E.Pauthe for their advice and helpful discussions.

R. Bascetin is a recipient of a PhD fellowship co funded by the Agence National de la Recherche (ANR-2010-BLAN 1530 project) and s by the University of Cergy-Pontoise.

Legends

Figure 1: The modular structure of Fn with its glycosylations. Fn is a 450 kDa dimer glycoprotein composed of a series of repeated modules: type I (red cylinder), type II (purple ellipse) and type III (blue cube) and 3 alternatively spliced segments: EDA/EDB (green cube) and V-region (orange circle). Fn harbors 6 to 7 N linked carbohydrate moieties (orange) located on II-2, I-8, III-3, III-5, III-7 modules and V-region. Oligosaccharide structures of Fn (A, B, C) proposed by Takasaki et al³⁸, with lectins pattern recognition. Fn N-glycosylations are bi- or tri-antennary structure composed of N-Acetylglucosamine (GlcNAc), Mannose (Man), Galactose (Gal) and N-Acetylneuraminic acid (NeuNAc).

Figure 2: Fn harbored-glycosylation pattern. (A) Fn recognition by biotinylated lectins. Fn dots (50 to 250 ng) were deposited on a nitrocellulose membrane. After blocking with gelatin 0.5%, dots were incubated with biotinylated lectins and revealed by alkaline phosphatase. (B) Fn glycosylation-lectin recognition map by ELISA. Fn (250 ng) was coated on microplate wells (dotted line) and incubated with biotinylated lectins. Optical densities were read at 420nm.

Figure 3- Differential thermal unfolding of Fibronectin and Concanavalin A. Far UV Circular Dichroism (upper panel), Fluorescence emission spectra (middle panel) and Dynamic Light Scattering (lower panel) of Fn 0.11 μM (A) and ConA 0.29 μM (B) in Hepes 10 mM pH 7.4, CaCl_2 1mM, MnCl_2 1 mM, at 25°C (black squares), 37°C (white circles) and 60°C (cross).

Figure 4 : Fn (A) and ConA (B) thermal denaturation monitored by Circular Dichroism (black squares), Intrinsic Fluorescence (white squares) and Dynamic Light Scattering (crosses). Inset figure on B represents ConA hydrodynamic radius with a log10 scale.

Figure 5: Isothermal Titration Calorimetry (ITC) profile of Fibronectin (2.2 μM) interaction with Concanavalin A (45 μM). Interactions of Fn with conA at 298K (A) and 323 K (B) in 10mM Hepes buffer with 1 mM CaCl_2 and 1mM MnCl_2 . Top: Raw titration data obtained from 20x10 μL injections of ConA in the cell containing FN. Bottom: integrated heat with experimental data (dot) and best least-squares fit (line).

Figure 6: Concanavalin A increasingly binds to progressive thermal-unfolded Fn. (A) Binding study of Fn with ConA by DLS at different temperatures. ConA was mixed with Fn 0.22 μM to reach a 1:2 molar ratio. Each Fn-ConA solution was incubated at chosen temperature for 30 min prior to measure the average particle size. (B) Binding study by Turbidimetry of Fn with ConA at 25 (dark blue), 30 (blue), 37 (purple), 45 (orange) and 50°C (red). ConA was mixed with Fn 1.1 μM to reach a 1:3 molar ratio. (C) Binding Velocity of Fn-ConA interaction at different temperatures. Initial rate was calculated from the slope of turbidimetry plot at $t=0$.

Table 1: Glycan ligand specificities of plant lectins

Table 2: Stoichiometry (n) and Binding constant (Kb) with respective standard deviation for FN-ConA interactions from 25°C (298K) to 50°C (323K)

References

1. Geyer, H., and Geyer, R. (2006) Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764, 1853-1869.
2. Lis, H., and Sharon, N. (1993) PROTEIN GLYCOSYLATION - STRUCTURAL AND FUNCTIONAL-ASPECTS, *European Journal of Biochemistry* 218, 1-27.
3. Brooks, S. A. (2009) Strategies for Analysis of the Glycosylation of Proteins: Current Status and Future Perspectives, *Molecular Biotechnology* 43, 76-88.
4. Cunningham, S., Gerlach, J. Q., Kane, M., and Joshi, L. (2010) Glyco-biosensors: Recent advances and applications for the detection of free and bound carbohydrates, *Analyst* 135, 2471-2480.
5. Gemeiner, P., Mislovicova, D., Tkac, J., Svitel, J., Patoprsty, V., Hrabarova, E., Kogan, G., and Kozar, T. (2009) Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics, *Biotechnology Advances* 27, 1-15.

6. Sharon, N., and Lis, H. (1989) Lectins as cell recognition molecules, *Science* 246, 227-234.
7. Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., Liu, B., and Bao, J. K. (2011) Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 1442-1449.
8. Li, Y., Tao, S. C., Bova, G. S., Liu, A. Y., Chan, D. W., Zhu, H., and Zhang, H. (2011) Detection and Verification of Glycosylation Patterns of Glycoproteins from Clinical Specimens Using Lectin Microarrays and Lectin-Based Immunosorbent Assays, *Analytical Chemistry* 83, 8509-8516.
9. Drickamer, K. (1993) CA²⁺-DEPENDENT CARBOHYDRATE-RECOGNITION DOMAINS IN ANIMAL PROTEINS, *Current Opinion in Structural Biology* 3, 393-400.
10. Loris, R. (2002) Principles of structures of animal and plant lectins, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1572, 198-208.
11. Overall, C. M., and Sodek, J. (1990) Concanavalin A produces a matrix-degradative phenotype in human fibroblasts. Induction and endogenous activation of collagenase, 72-kDa gelatinase, and Pump-1 is accompanied by the suppression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, *J Biol Chem* 265, 21141-21151.
12. Ryden, I., Skude, G., Lundblad, A., and Pahlsson, P. (1997) Glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in inflammatory disease: analysis by high-pH anion-exchange chromatography and concanavalin A crossed affinity immunoelectrophoresis, *Glycoconj J* 14, 481-488.
13. Sottile, J., and Hocking, D. C. (2002) Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions, *Molecular Biology of the Cell* 13, 3546-3559.
14. Leiss, M., Beckmann, K., Giros, A., Costell, M., and Fassler, R. (2008) The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo, *Current Opinion in Cell Biology* 20, 502-507.
15. Singh, P., Carraher, C., and Schwarzbauer, J. E. (2010) Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix, In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 26 (Schekman, R., Goldstein, L., and Lehmann, R., Eds.), pp 397-419, Annual Reviews, Palo Alto.
16. Pankov, R., and Yamada, K. M. (2002) Fibronectin at a glance, *Journal of Cell Science* 115, 3861-3863.
17. Hynes, R. O. (1973) Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3170-3174.
18. Poulouin, L., Gallet, O., and Imhoff, J. (1997) La fibronectine : propriétés et fonctions de la molécule native et de ses fragments, *Med Sci* 13, 657-661.
19. Bernard, B. A., Yamada, K. M., and Olden, K. (1982) Carbohydrates selectively protect a specific domain of fibronectin against proteases, *J Biol Chem* 257, 8549-8554.
20. Zhu, B. C., Fisher, S. F., Pande, H., Calaycay, J., Shively, J. E., and Laine, R. A. (1984) Human placental (fetal) fibronectin: increased glycosylation and higher protease resistance than plasma fibronectin. Presence of poly-lactosamine glycopeptides and properties of a 44-kilodalton chymotryptic collagen-binding domain: difference from human plasma fibronectin, *J Biol Chem* 259, 3962-3970.
21. Zhu, B. C., and Laine, R. A. (1985) Poly-lactosamine glycosylation on human fetal placental fibronectin weakens the binding affinity of fibronectin to gelatin, *J Biol Chem* 260, 4041-4045.
22. Ingham, K. C., Brew, S. A., and Novokhatny, V. V. (1995) INFLUENCE OF CARBOHYDRATE ON STRUCTURE, STABILITY, AND FUNCTION OF GELATIN-BINDING FRAGMENTS OF FIBRONECTIN, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316, 235-240.
23. Zheng, M. Z., and Hakomori, S. (2000) Soluble fibronectin interaction with cell surface and extracellular matrix is mediated by carbohydrate-to-carbohydrate interaction, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374, 93-99.

24. Gu, J. G., Isaji, T., Xu, Q. S., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T., and Du, Y. G. (2012) Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion, *Glycoconjugate Journal* 29, 599-607.
25. Gabius, H. J., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., and Solis, D. (2011) From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code, *Trends in Biochemical Sciences* 36, 298-313.
26. Sano, K., Asahi, M., Yanagibashi, M., Hashii, N., Itoh, S., Kawasaki, N., and Ogawa, H. (2008) Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy, *Carbohydrate Research* 343, 2329-2335.
27. Gee, E. P. S., Ingber, D. E., and Stultz, C. M. (2008) Fibronectin Unfolding Revisited: Modeling Cell Traction-Mediated Unfolding of the Tenth Type-III Repeat, *Plos One* 3, 10.
28. Maurer, L. M., Ma, W. J., Eickstaedt, N. L., Johnson, I. A., Tomasini-Johansson, B. R., Annis, D. S., and Mosher, D. F. (2012) Ligation of the Fibrin-binding Domain by beta-Strand Addition Is Sufficient for Expansion of Soluble Fibronectin, *Journal of Biological Chemistry* 287, 13303-13312.
29. Wierzbicka-Patynowski, I., and Schwarzbauer, J. E. (2003) The ins and outs of fibronectin matrix assembly, *Journal of Cell Science* 116, 3269-3276.
30. Paci, E., and Karplus, M. (2000) Unfolding proteins by external forces and temperature: The importance of topology and energetics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6521-6526.
31. Abu-Lail, N. I., Ohashi, T., Clark, R. L., Erickson, H. P., and Zauscher, S. (2006) Understanding the elasticity of fibronectin fibrils: Unfolding strengths of FN-III and GFP domains measured by single molecule force spectroscopy, *Matrix Biology* 25, 175-184.
32. Patel, S., Chaffotte, A. F., Goubard, F., and Pauthe, E. (2004) Urea-induced sequential unfolding of fibronectin: A fluorescence spectroscopy and circular dichroism study, *Biochemistry* 43, 1724-1735.
33. Patel, S., Chaffotte, A. F., Amana, B., Goubard, F., and Pauthe, E. (2006) In vitro denaturation-renaturation of fibronectin. Formation of multimers disulfide-linked and shuffling of intramolecular disulfide bonds, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 1547-1560.
34. Pauthe, E., Pelta, J., Patel, S., Lairez, D., and Goubard, F. (2002) Temperature-induced beta-aggregation of fibronectin in aqueous solution, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1597, 12-21.
35. Wormald, M. R., and Dwek, R. A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability, *Structure with Folding & Design* 7, R155-R160.
36. Lemanska-Perek, A., Pupek, M., Polanska, B., Leszek, J., and Katnik-Prastowska, I. (2013) Alterations in molecular status of plasma fibronectin associated with aging of normal human individuals, *Clinical Biochemistry* 46, 787-794.
37. Tajiri, M., Yoshida, S., and Wada, Y. (2005) Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment, *Glycobiology* 15, 1332-1340.
38. Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K., Iwanaga, S., and Kobata, A. (1979) The sugar chains of cold-insoluble globulin. A protein related to fibronectin, *J Biol Chem* 254, 8548-8553.
39. Pellenc, D., Berry, H., and Gallet, O. (2006) Adsorption-induced fibronectin aggregation and fibrillogenesis, *Journal of Colloid and Interface Science* 298, 132-144.
40. Baujard-Lamotte, L., Noinville, S., Goubard, F., Marque, P., and Pauthe, E. (2008) Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 63, 129-137.
41. Gregoriadis, G. (1976) The Role of Sialic Acid in the Catabolism of Plasma Glycoproteins, In *Structure and Function of Plasma Proteins* (Springer, Ed.), pp 145-162, Springer US.
42. Dam, T. K., and Brewer, C. F. (2004) Multivalent protein-carbohydrate interactions: Isothermal titration microcalorimetry studies, In *Energetics of Biological Macromolecules, Pt D*, pp 107-128, Academic Press Inc, San Diego.

43. Pelta, J., Berry, H., Fadda, G. C., Pauthe, E., and Lairez, D. (2000) Statistical conformation of human plasma fibronectin, *Biochemistry* 39, 5146-5154.
44. Vetri, V., Leone, M., Morozova-Roche, L. A., Vestergaard, B., and Fodera, V. (2013) Unlocked Concanavalin A Forms Amyloid-like Fibrils from Coagulation of Long-lived "Crinkled" Intermediates, *Plos One* 8, 11.
45. Liang, Y. (2008) Applications of isothermal titration calorimetry in protein science, *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 40, 565-576.
46. Pierce, M. M., Raman, C. S., and Nall, B. T. (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods-a Companion to Methods in Enzymology* 19, 213-221.
47. Goldberg, R. N., Kishore, N., and Lennen, R. M. (2002) Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 31, 231-370.
48. Dam, T. K., Roy, R., Das, S. K., Oscarson, S., and Brewer, C. F. (2000) Binding of multivalent carbohydrates to concanavalin A and Dioclea grandiflora lectin - Thermodynamic analysis of the "multivalency effect", *Journal of Biological Chemistry* 275, 14223-14230.
49. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal Biochem* 179, 131-137.
50. Dam, T. K., and Brewer, C. F. (2002) Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry, *Chemical Reviews* 102, 387-429.
51. Park, J. H., Katagiri, T., Chung, S., Kijima, K., and Nakamura, Y. (2011) Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 Disrupts Mammary Acinar Morphogenesis through O-glycosylation of Fibronectin, *Neoplasia* 13, 320-U151.
52. Peysselon, F., Xue, B., Uversky, V. N., and Ricard-Blum, S. (2011) Intrinsic disorder of the extracellular matrix, *Molecular Biosystems* 7, 3353-3365.
53. Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2010) Understanding protein non-folding, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1804, 1231-1264.
54. Etxebarria, J., Calvo, J., Martin-Lomas, M., and Reichardt, N. C. (2012) Lectin-array blotting: profiling protein glycosylation in complex mixtures, *ACS Chem Biol* 7, 1729-1737.
55. Sanchez-Pomales, G., Morris, T. A., Falabella, J. B., Tarlov, M. J., and Zangmeister, R. A. (2012) A lectin-based gold nanoparticle assay for probing glycosylation of glycoproteins, *Biotechnol Bioeng* 109, 2240-2249.

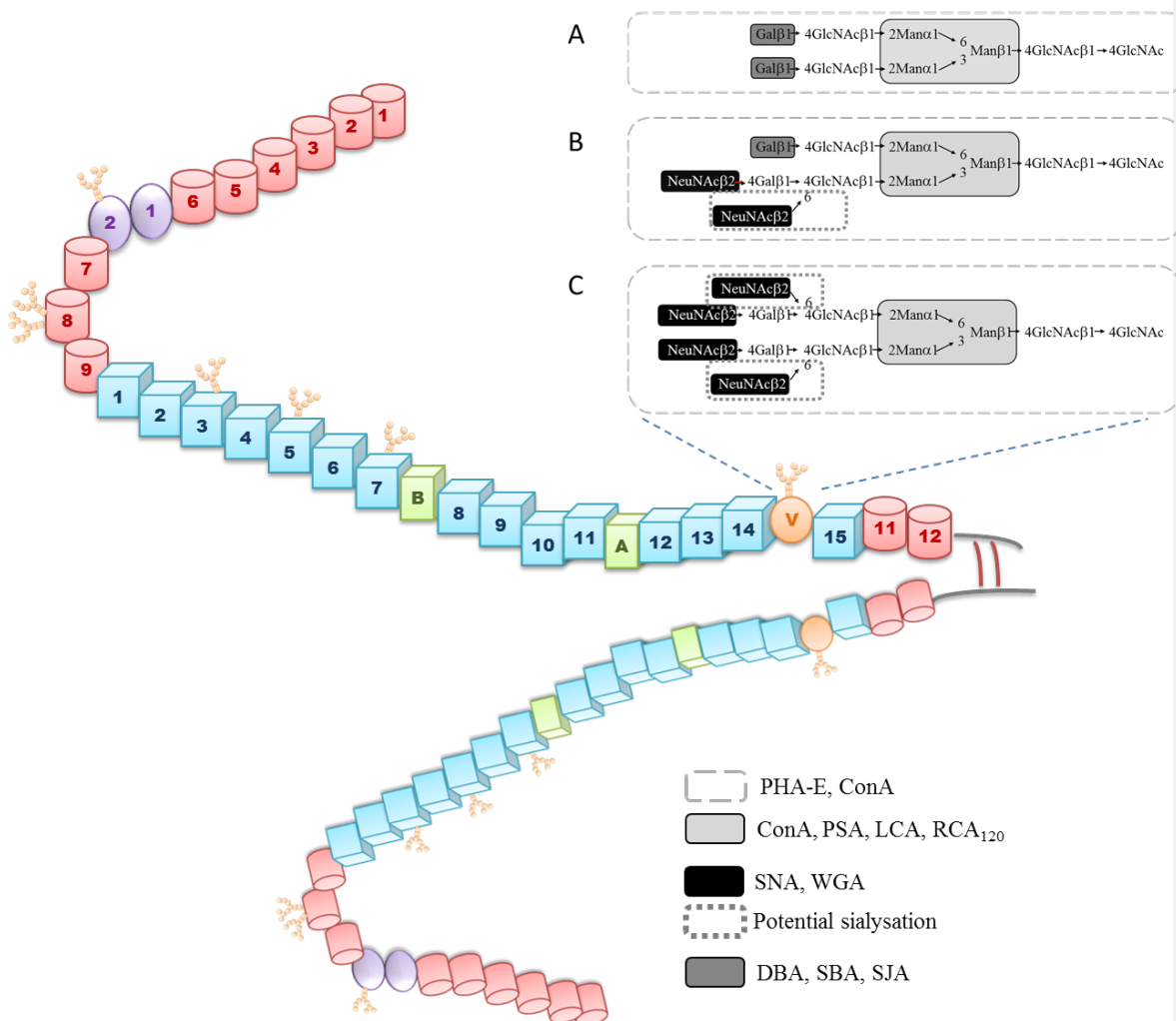


Figure 1. The modular structure of Fn with its N-glycosylations. Fn is a 450 kDa dimer glycoprotein composed of a series of repeated modules: type I (red cylinder), type II (purple ellipse) and type III (blue cube) and 3 alternatively spliced segments: EDA/EDB (green cube) and V-region (orange circle). Fn harbors 6 to 7 N linked carbohydrate moieties (orange) located on II-2, I-8, III-3, III-5, III-7 modules and V-region.

Oligosaccharide structures of Fn (A, B, C) proposed by Takasaki and al with lectin pattern recognition. Fn N-glycosylations are bi or tri antennary structure composed of N-Acetylglucosamine (GlcNAc), Mannose (Man), Galactose (Gal) and N-Acetylneuraminic acid (NeuNAc).

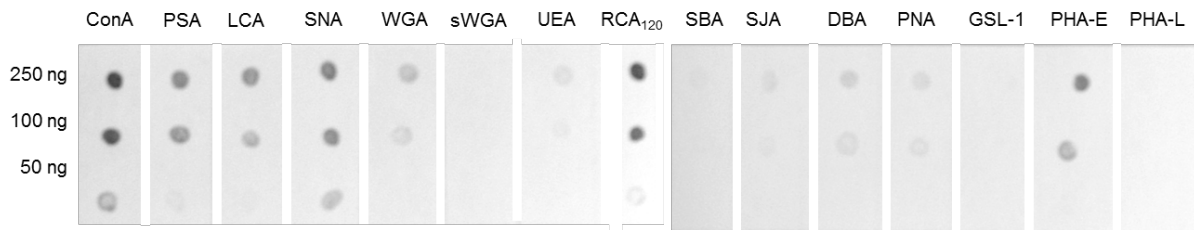


Figure 2A. FN recognition by biotinylated lectins. FN dots (50 to 250 ng) were deposited on a nitrocellulose membrane. After blocking with gelatin 0.5%, dots were incubated with biotinylated lectins and revealed by alkaline phosphatase.

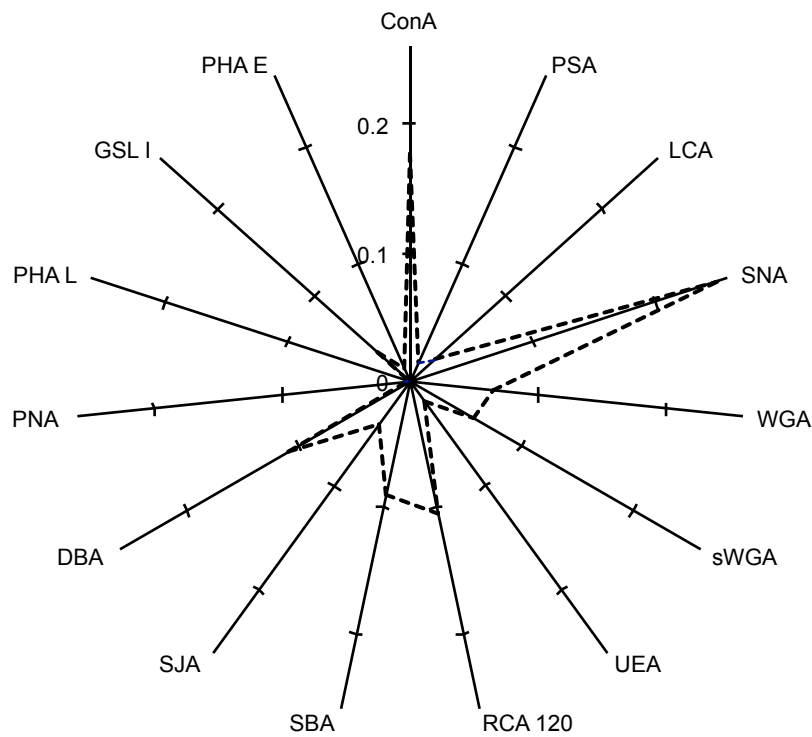


Figure 2B. FN glycosylation-lectin recognition map by ELISA. FN (250 ng) was coated on microplate wells (dotted line). Optical densities were read at 420nm.

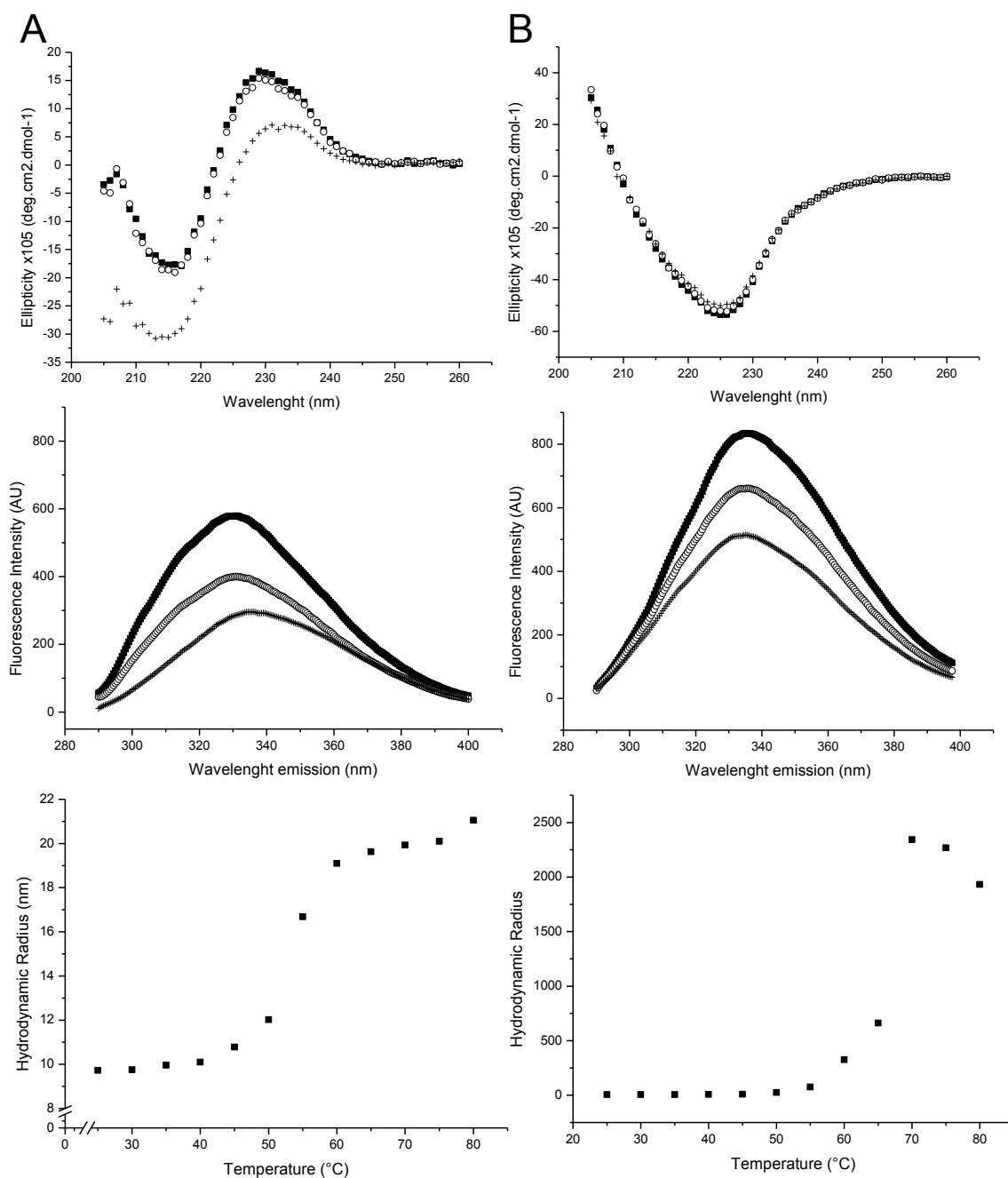


Figure 3. Far UV Circular Dichroism (upper), Fluorescence emission spectra (middle) and Dynamic Light Scattering (lower) of Fn 0.11 μM (A) and ConA 0.29 μM (B) in HEPES 10 mM pH 7.4, CaCl₂ 1mM, MnCl₂ 1 mM at 25°C (black squares), 37°C (white circles) and 60°C (cross)

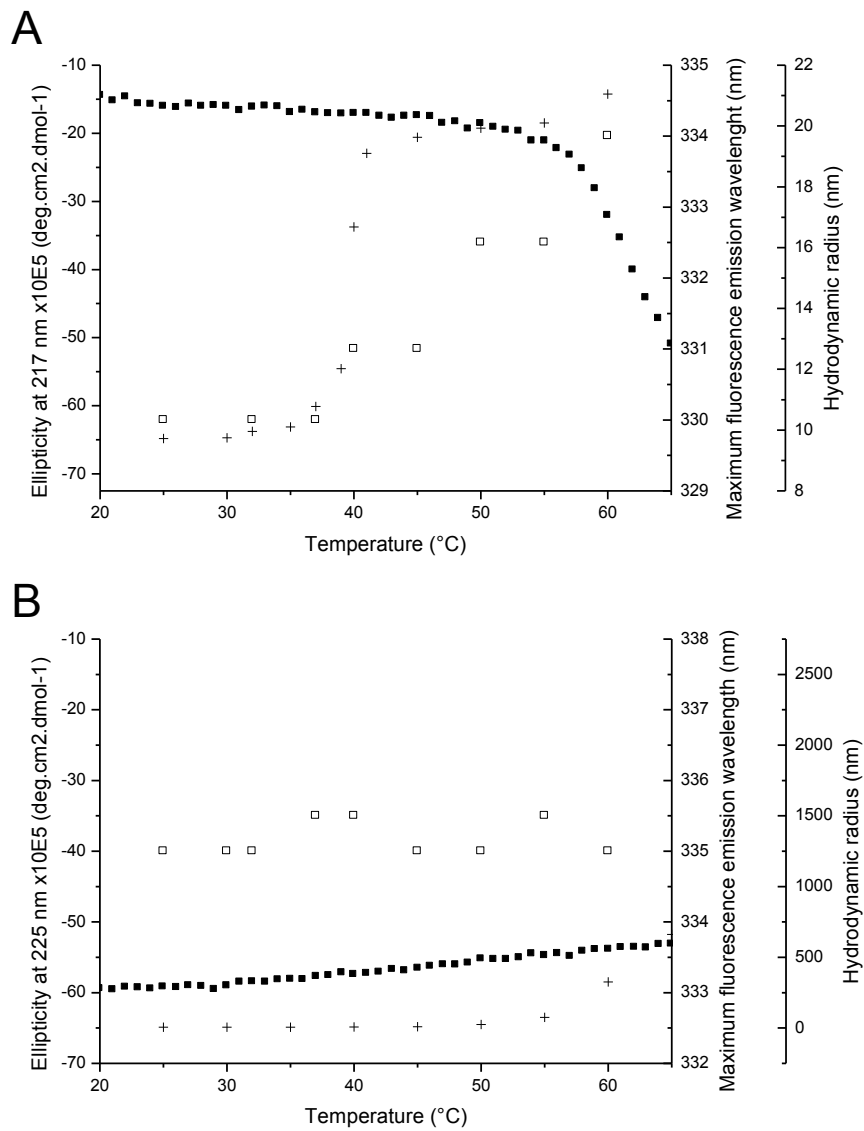


Figure 4. Fn (A) and ConA (B) thermal denaturation monitored by Circular Dichroism (black squares), Intrinsic Fluorescence (white squares) and Dynamic Light Scattering (crosses). Inset figure on B represents ConA hydrodynamic radius with a log10 scale.

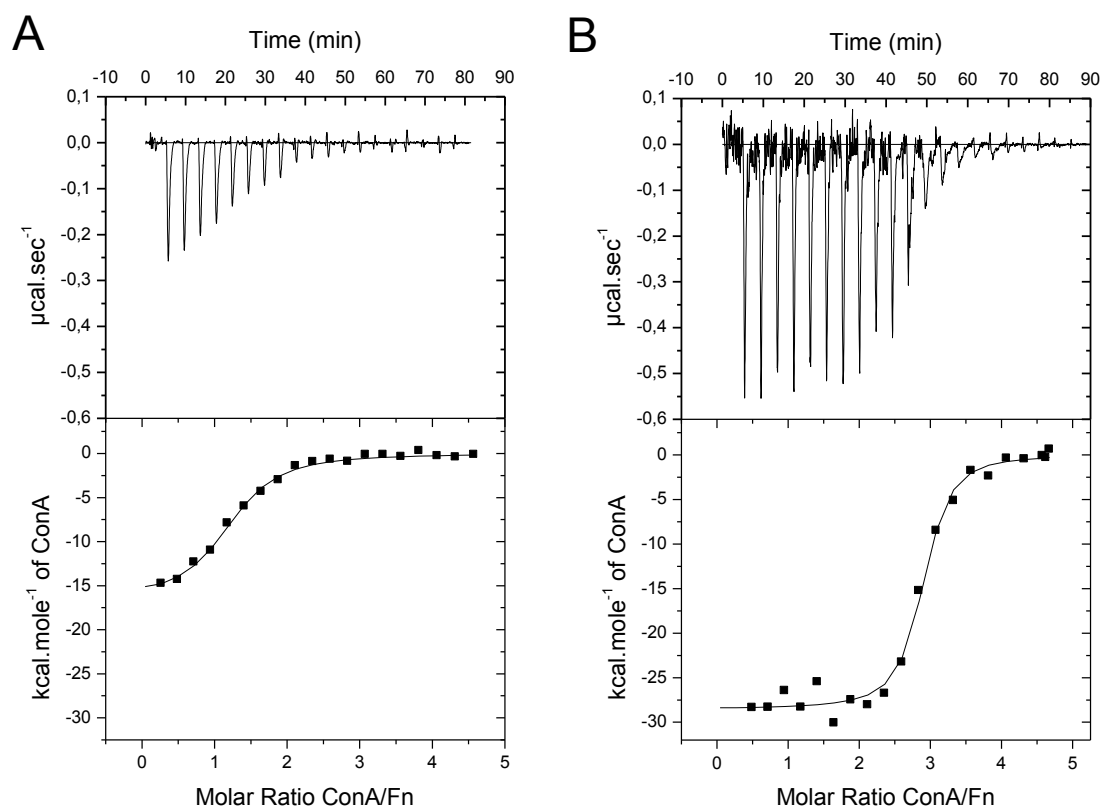


Figure 5. ITC profile of FN (2.2 μM) with ConA (45 μM) at 25°C (A) and 50°C (B) in 10mM HEPES buffer with 1 mM CaCl_2 and 1mM MnCl_2 . Top: Raw titration data obtained from 20x10 μL injections of ConA in the cell containing FN. Bottom: integrated heat with experimental data (dot) and best least-squares fit (line).

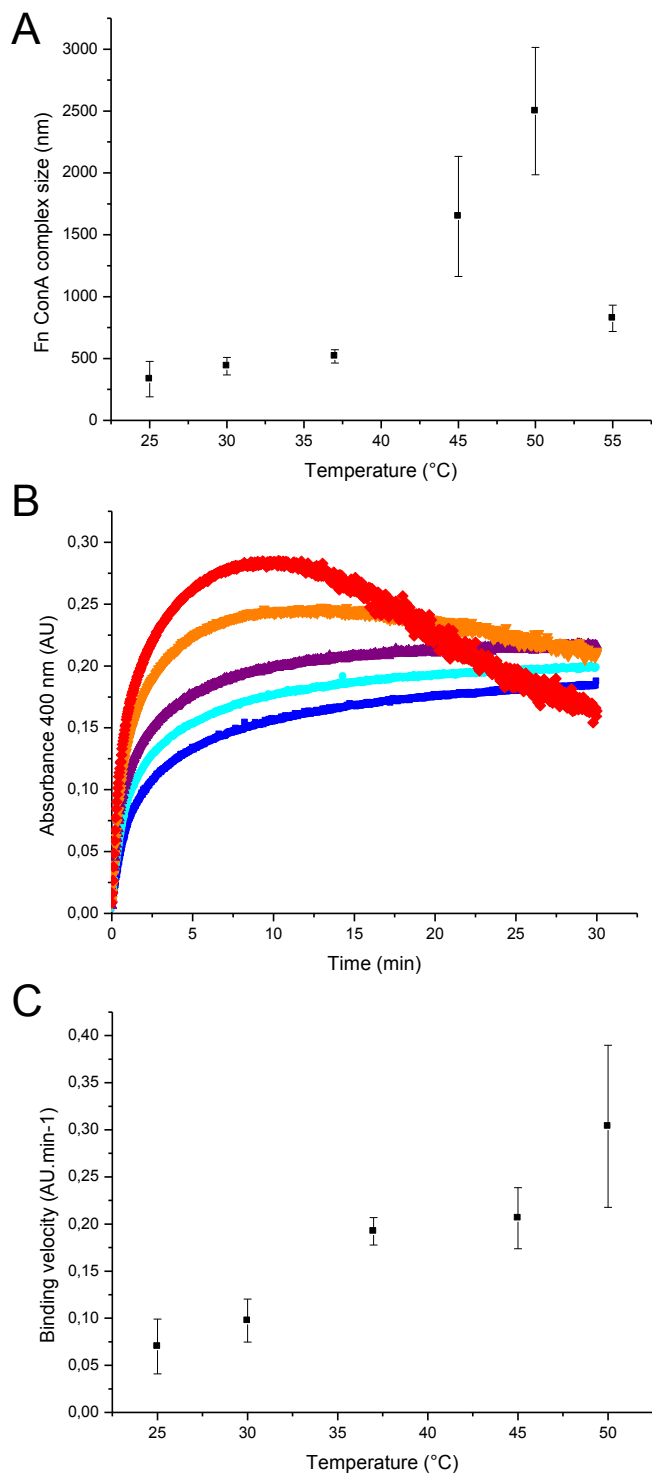


Figure 6. **A** Binding study of Fn with ConA by DLS at different temperatures. ConA was mixed with Fn 0.22 μ M to reach a 1:2 molar ratio. Each Fn-ConA solution was incubated at chosen temperature for 30 min prior to measure the average particle size. **B** Binding study by Turbidimetry of Fn with ConA at 25 (dark blue), 30 (blue), 37 (purple), 45 (orange) and 50°C (red). ConA was mixed with Fn 1.1 μ M to reach a 1:3 molar ratio. **C** Binding Velocity of Fn-ConA interaction at different temperatures. Initial rate was calculated from the slope of turbidimetry plot at $t=0$.

Lectins	Species	Specificity sugar
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Man, bi-antennary structure
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	Gal, GalNAc
DSL	<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	Man(1-3)Man
LCA	<i>Lens culinaris</i>	Man
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	NeuA(2-3)Gal
PHA-E	<i>Phaesolus vulgaris</i>	bi-antennary structure
PHA-L	<i>Phaesolus vulgaris</i>	tri/tetra-antennary structure
PNA	<i>Arachis hypogea</i>	Gal(1-3)GalNAc
PSA	<i>Pisum sativum</i>	Man
RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Man
SBA	<i>Glycin max</i>	Gal, GalNAc
SJA	<i>Sophorica japonica</i>	Gal, GalNAc
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuA
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc(1-2)Gal
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	NeuA, GlcNAc
succWGA	<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc

Table 1. Glycan ligand specificities of plant lectins

Temperature		n	Kb	c
°C	K	ConA/Fn	$M^{-1} \times 10^7$	
25	298	1,30 ± 0,06	2,06 ± 0,39	59
30	303	1,37 ± 0,14	1,79 ± 0,12	54
37	310	1,41 ± 0,07	2,80 ± 0,50	86
40	313	1,36 ± 0,11	4,75 ± 0,26	142
45	318	1,48 ± 0,08	5,99 ± 1,45	195
50	323	2,13 ± 0,33	4,01 ± 1,11	188

Table 2. Stoichiometry (n) and Binding constant (Kb) with respective standard deviation for FN-ConA interactions from 25°C (298K) to 50°C (323K)

Etude de l'auto-assemblage de la fibronectine plasmatique humaine : mécanismes et réponses cellulaires

La matrice extracellulaire est un réseau enchevêtré de macromolécules variées, en étroite relation avec les cellules qu'elle environne. Les interactions bidirectionnelles qui s'établissent entre les cellules et leur microenvironnement matriciel régulent mutuellement leur comportement et devenir. La diversité biochimique des constituants moléculaires de la matrice, leurs propriétés biophysiques, leur architecture tout comme leur dynamique représentent autant de signaux régulateurs. Parmi les constituants de la matrice, la fibronectine (FN) est une glycoprotéine structurale et fonctionnelle majeure intervenant dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ces fonctions diverses sont directement liées à la dynamique structurale de cette protéine et à sa capacité à interagir avec les autres molécules matricielles, dont elle-même. Retrouvée sous forme soluble dans les fluides biologiques, la FN est incorporée dans les matrices insolubles sous forme d'assemblages supramoléculaires principalement fibrillaires mais aussi sous forme d'agrégats. Ces assemblages sembleraient être impliqués dans des processus physiologiques et pathologiques distincts.

Si l'étude des assemblages de FN est rendue possible par l'élaboration de modèles *in vitro*, les mécanismes de polymérisation et l'effet d'assemblages de structures définies sur le comportement cellulaire restent cependant à mieux élucider et constituent le cœur de ce travail.

Les travaux ont donc consisté à élaborer des assemblages de FN, à caractériser les mécanismes et structures impliqués dans leur polymérisation, et à étudier leur influence sur un modèle de cellules cancéreuses ovariennes. D'autre part, des études préliminaires comparatives ont été menées avec un analogue végétal de la FN.

L'irréversibilité de la dénaturation thermique de la FN entraîne la formation d'agrégats de type amyloïde. Deux populations d'agrégats coexistent en solution. Cette agrégation est corrélée à une diminution de l'accessibilité des sites de liaison à la gélatine et des sites RGD, et à une diminution de l'incorporation dans les réseaux matriciels. De plus, si la FN sous sa forme agrégée n'est pas cytotoxique pour les cellules étudiées, la modification de la conformation de la FN favorise leur migration isolée et aléatoire.

Ces résultats soulèvent la question de l'implication de ces agrégats de FN dans des processus pathologiques tels que le développement tumoral.

Mots clés : matrice extracellulaire, fibronectine, auto-assemblage, migration cellulaire, cellule cancéreuse, analogue végétal de la fibronectine

Study of human plasma fibronectin self-assembly: mechanisms and cell responses

Extracellular matrix is a complex meshwork of various macromolecules that have a tight relationship with the surrounding cells. Bidirectional interactions between cells and the microenvironment control their respective behaviors and fate. The biochemical diversity of matrix molecular components, their biophysical properties, their architecture but also their dynamic represent as many regulator signals. Among the components of the matrix, fibronectin (FN) is a major structural and functional glycoprotein involved in numerous physiological and pathological processes. These various functions are directly linked to the structural dynamic of this protein and its ability to interact with others matrix components, in particular with itself. Found as a soluble protein in biological fluids, FN is also incorporated in insoluble matrix as supramolecular assemblies, mainly fibrils but also aggregates. These assemblies could be involved in distinct physiological and pathological processes.

If the study of the assembly of the FN is possible with the help of *in vitro* models, the mechanism of polymerization and the effects of defined assemblies on the cell behavior still have to be better defined.

Therefore, this work consisted in elaborating FN assemblies, in characterizing the mechanisms and structures involved in their polymerization and in studying their influence on behaviors of a model of ovarian cancer cells. Besides, preliminary comparative studies have been performed with a plant analogous of FN.

We show that irreversible thermal unfolding of FN triggers amyloid-like aggregation. Two states of aggregates could coexist in solution. FN aggregation correlates with a decrease of gelatin-binding domain and RGD sequence accessibility, and a decrease of the incorporation in the matrix network. Moreover, if aggregates are not cytotoxic for the studied cells, conformation change of FN promotes their single-cell and random migration.

These results raise questions about the role of FN aggregates in pathological processes like tumor development.

Keywords: extracellular matrix, fibronectin, self-assembly, cell migration, cancer cell, fibronectin plant analogous