

50 376
1 990
205

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

50376
1990
205

UFR DE BIOLOGIE

Année 1990

N° d'Ordre : 644

THESE

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Vincent BLANCKAERT

**MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE
FACTEURS DE CROISSANCE APPARENTES
AUX "FIBROBLAST GROWTH FACTORS" (FGFs)
ET DE LEURS SITES RECEPTEURS
CHEZ LES NEREIDAE**



Présentée le 18 décembre 1990 devant la Commission d'Examen :

Président : M. PORCHET, Professeur, Université de Lille I
Directeur du travail : Y. BOILLY-MARER, Directeur de Recherche,
Université de Lille I
Rapporteurs : D. BARRITAULT, Professeur, Université de Paris XII
B. BOILLY, Professeur, Université de Lille I
Examineur : G. SPIK, Professeur, Université de Lille I



AVANT-PROPOS

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur M. Porchet qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés. Qu'il me permette de lui témoigner ma respectueuse reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée. Qu'il soit également remercié pour l'honneur qu'il me fait en présidant mon jury.

Je dois à Madame Y. Boilly-Marer, Directeur de Recherche au CNRS, mes premiers pas de chercheur. En effet, nous nous sommes rencontrés lors de la première année du troisième cycle pour travailler sur les ecdystéroïdes. Au terme de cette difficile épreuve, nous avons cessé cette étude pour aborder un domaine de recherche encore complètement inexploité : celui des facteurs de croissance chez des invertébrés. Pour votre aide précieuse et la compétence avec laquelle vous m'avez guidé ainsi que pour la très grande liberté d'expression dont j'ai toujours bénéficié au cours de mes activités, je suis ravi de vous exprimer à travers ces quelques lignes mes remerciements les plus sincères.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur le Professeur D. Barritault qui a accepté d'être l'un des rapporteurs de ce travail. Qu'il soit également assuré de ma profonde gratitude pour l'accueil chaleureux qu'il m'a prodigué lors de mes passages dans son Laboratoire de Biotechnologie des Cellules Eucaryotes et qui m'ont permis de parfaire la purification des nHBGFs.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur B. Boilly d'avoir bien voulu juger ce manuscrit. Je tiens, par ailleurs, à lui exprimer toute ma sympathie pour l'accueil au sein du Laboratoire de Biologie des Facteurs de Croissance, la patience et la compréhension dont il a fait preuve.

Je suis très honoré que Madame le Professeur G. Spik appartenant au Laboratoire de Chimie Biologique ait bien voulu examiner ce travail et lui exprime toute ma gratitude.

J.L. Baert, au cours de ces deux dernières années, je te dois beaucoup et même plus car tu m'as apporté la méthodologie de la recherche des polypeptides. Par ailleurs, il m'est agréable d'évoquer tout particulièrement les amicales et fructueuses conversations que j'ai eues avec toi. Je ne te remercierai jamais assez pour le temps que tu as pu me consacrer et pour ta compréhension lorsque j'envahissais la salle 108.

H. Hondermarck, tu as été le complice de tous les instants. Pour ton aide en ce qui concerne les techniques récepteurs je ne te remercierai jamais assez et par ton dynamisme nous avons réussi à garder durant ces trois années une cadence de travail à l'américaine. J'espère que nous continuerons à correspondre lorsque nous serons là-bas.

Je tiens également à remercier, J. Courty, Chargé de Recherche au CNRS ; Mesdames F. Laloux et Y. Hympens, secrétaires ; Mesdames B. Léü (B12 pour les intimes) et M.C. Slomianny, techniciennes ; Madame Auger et Monsieur D. Lazarecki qui ont assuré le tirages des photographies ; Mademoiselle M. Masson pour la lecture du manuscrit ; Mademoiselle K. Delbaere et tous les autres membres du laboratoire qui m'ont permis de travailler dans une ambiance sereine.

A mes parents

A Isabelle et Philippe

A Pierre Henri

A mes grand'parents

A ma famille

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
GENERALITES : La famille des "fibroblast growth factors"	4
I : Historique	5
II : Propriétés biochimiques de la famille des FGFs.....	5
A : Les FGFs acide et basique	5
B : Les autres membres de la famille des FGFs.....	10
III : Distribution des FGFs	10
IV : Les sites de fixation spécifiques aux FGFs	11
A : Les récepteurs.....	11
B : Les sites de fixation à basse affinité.....	14
IV : Modes de transduction du signal	16
V : Propriétés biologiques des FGFs.....	17
A : Propriétés des FGFs <i>in vitro</i>	17
B Propriétés des FGFs <i>in vivo</i>	19
1 : L'angiogenèse	19
2 : Le développement embryonnaire.....	20
3 : Réparation et régénération tissulaires	21
4 : Croissance tumorale	21
MATERIEL et METHODES.....	23
I : Matériel biologique.....	24
II : Méthodes	24
A : Méthodes de purification et de caractérisation des nHBGFs	24
1 : Purification des nHBGFs	24
1.1 : Broyage et extraction.....	24
1.2 : Purification par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose.....	25
1.2.1 : Préparation de la colonne.....	25
1.2.2 : Chromatographie d'affinité.....	25
1.3 : Chromatographie d'échange d'ions.	25
1.4 : Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)	26
2 : Dosage des protéines	26
3 : Test de mitogénicité.....	26
4 : Immunodétection.....	27
5 : Electrophorèse.....	28
5.1 : Electrophorèse en milieu dénaturant.....	28
5.1.1 : Electrophorèse	28
5.1.2 : détection des protéines.....	28
5.2 : Isoélectrophorèse.....	29
6 : Immunocaractérisation.....	29
6.1 : Western Blot	29
6.2 : Immunodétection	30
7 : Production d'anticorps dirigés à la fois contre des nHBGFs et des FGFs.....	30
7.1 : Immunisation.....	30
7.2 : La fusion cellulaire	31
7.3 : Sélection des hybridomes.....	31
7.4 : Le clonage	32
8 : Analyse immunohistologique.....	32
B : Méthodes pour l'étude des récepteurs.....	33
1 : Obtention du FGF basique bovin	33
2 : Radioiodination du FGF basique bovin	33
3 : Mesure du rendement et de l'activité spécifique	33

4 : préparation de membranes cellulaires de <i>Nereis diversicolor</i>	34
5 : Etudes des récepteurs.....	34
5.1 : Compétitions et analyses de Scatchard.....	34
5.2 : Optimisation des conditions de fixation.....	35
5.2.1 : Etude de la cinétique de fixation.....	35
5.2.2 : Etude de la fixation en fonction de la concentration membranaire.....	35
6 : Caractérisation des sites par pontage moléculaire.....	35
7 : Etudes autoradiographiques sur coupes.....	36

RESULTATS 37

CHAPITRE I : Mise en évidence, purification et caractérisation de facteurs de croissance apparentés aux FGFs (nHBGFs) chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller

.....	38
I : Introduction.....	39
II : Résultats.....	39
A : Purification par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose.....	39
1 : Test <i>in vitro</i> d'activité mitogène sur des cellules de vertébrés.....	39
2 : Immunodétection des fractions éluées sur héparine-Sepharose.....	41
3 : Analyse électrophorétique et immunocaractérisation par Western blot.....	41
B : Purification par chromatographie d'échange d'ions.....	42
1 : Test d'activité mitogène.....	44
2 : Immunodétection.....	44
3 : Analyse électrophorétique des fractions à activités mitogènes majeures.....	44
C : Purification par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC).....	45
1 : Immunodétection.....	46
2 : Analyse électrophorétique et immunocaractérisation.....	47
3 : Détermination du point isoélectrique.....	48
D : Relations entre l'effet mitogène et la quantité de protéines.....	49
E : Localisation des molécules immunoréactives.....	50
III : Discussion.....	51

CHAPITRE II : Mise en évidence et caractérisation des sites de fixation spécifique chez

<i>Nereis diversicolor</i> O.F. Müller.....	56
I : Introduction.....	57
II : Résultats.....	57
A : Mise au point des conditions optimales de la fixation de FGF basique iodé sur des membranes cellulaires de jeunes <i>Nereis diversicolor</i>	57
1 : Cinétique de la fixation.....	57
2 : Effet de la concentration des membranes cellulaires.....	58
B : Tests de compétition et analyses de Scatchard.....	58
1 : Test de compétition homologue.....	59
2 : Test de compétition hétérologue.....	59
C : Caractérisation des sites récepteurs par pontage moléculaire.....	61
D : Localisation des sites de fixation par autoradiographie.....	61
III : Discussion.....	63

CHAPITRE III : Etude préliminaire du rôle des nHBGFs dans les mécanismes de croissance de régénération et d'angiogenèse	66
I : Introduction	67
II : Résultats	67
A : Croissance	67
1 : Quantification des nHBGFs au niveau d'une zone en croissance et d'une zone quiescente	67
2 : Quantification des sites de fixation au FGF dans la zone en croissance et dans la zone quiescente	68
2.1 : Analyse de Scatchard	68
2.2 : Pontage moléculaire	71
3 : Immunolocalisation des nHBGFs	71
4 : Discussion	72
B: Angiogenèse	73
1 : Quantification des nHBGFs au niveau des différentes parties du corps de <i>Perinereis cultrifera</i>	73
2 : Quantification des sites de fixation du FGF dans les tronçons antérieurs et postérieurs	74
3 : Discussion	77
 DISCUSSION GENERALE - CONCLUSION	 79
BIBLIOGRAPHIE	84
 ANNEXE I : Le modèle Néréis	
ANNEXE II : Codes à 3 et 1 lettres correspondant aux différents acides aminés	
ANNEXE III : Sigles et abréviations	

INTRODUCTION

Les néréidiens, annélides polychètes, sont des invertébrés marins qui possèdent des caractéristiques particulièrement intéressantes en ce qui concerne les processus de croissance et de régénération. De plus, certains de ces vers marins présentent une angiogenèse très importante à l'approche de la reproduction, qui, à l'instar des phénomènes biologiques précités, est sous le contrôle du système nerveux central.

Nereis diversicolor O.F. Müller et *Perinereis cultrifera* Grube, deux espèces de néréidiens, ont la capacité de croître continuellement tout au long de la vie. Cette faculté est due à la présence d'une zone de prolifération cellulaire située juste devant l'extrémité postérieure appelée pygidium. Ces animaux, lors d'une amputation, acquièrent la capacité de régénérer en direction caudale par formation d'une nouvelle zone proliférative pygidiale et de restaurer intégralement une nouvelle partie postérieure (Durchon, 1956a ; Boilly, 1965). La régénération des néréidiens est soumise au contrôle neuroendocrine des ganglions cérébroïdes situés au niveau de la partie antérieure appelée prostomium (Durchon, 1956a ; Hauenschild, 1960 ; Durchon et Marcel, 1962 ; Boilly, 1974). Après ablation des ganglions cérébroïdes, les néréidiens continuent à vivre mais ils subissent une maturation génitale prématurée (Durchon, 1952 ; Durchon, 1956b ; Hauenschild, 1956 ; Dhainaut et Porchet, 1967 ; Dhainaut, 1970 ; Bertout et Dhainaut, 1971 ; Porchet, 1976). Par ailleurs, chez les espèces à phase épitoque, *Perinereis cultrifera* en particulier, la décérébration est suivie de transformations somatiques importantes qui sont naturellement observées à l'approche de la reproduction (Durchon, 1952 ; Durchon, 1962 ; Defretin et Wissocq, 1969 ; Boilly-Marer, 1972 ; Boilly-Marer, 1973). Ces transformations comportent notamment une néoangiogenèse remarquable qui se manifeste dans la région postérieure à partir du 15ème (mâles) ou du 18ème (femelles) segment.

Si les caractéristiques morphologiques de ces événements biologiques sont actuellement bien décrites chez les néréidiens, il n'existe, à ce niveau, aucune donnée en ce qui concerne la nature des molécules induisant ces proliférations cellulaires. Chez les vertébrés, des phénomènes tels que la croissance et la régénération tissulaire (Gospodarowicz *et al.*, 1987 ; Baird et Walicke, 1989) ou l'angiogenèse (Klagsbrun et Folkman, 1990) sont le siège de divisions et / ou de différenciations cellulaires initiées par des facteurs de croissance et / ou de différenciations *via* des récepteurs spécifiques. Une meilleure connaissance des modes d'action

des facteurs de croissance a permis de leur donner une définition plus précise. Ce sont des polypeptides qui induisent une réponse au niveau de la cellule exclusivement par la formation d'un complexe avec un récepteur membranaire. La réponse cellulaire, spécifique, pouvant être hypertrophique ou hyperplasique, résulte de la formation du complexe facteur de croissance-récepteur qui par la suite est internalisé par endocytose. Par ailleurs, la production, le transport et l'interaction avec des cellules cibles interviennent dans un processus physiologique (James et Bradshaw, 1984). Trois modes possibles de transport, par analogie avec les hormones, ont été proposés : endocrine, paracrine, autocrine (Sporn et Todaro, 1980). Ces polypeptides sont multifonctionnels (Sporn et Roberts, 1988). Ils paraissent bien conservés dans leur séquence en acides aminés, au cours de l'évolution entre vertébrés inférieurs et supérieurs suggérant qu'ils ont un rôle fondamental dans le règne vivant.

Ces facteurs de croissance ont été réunis par familles en fonction de leurs homologues structurales, leurs comportements biochimiques. Au niveau de la nomenclature, huit familles sont actuellement décrites : La famille des EGFs ("epidermal growth factors"), des PDGFs ("platelet derived growth factors"), des TGFs ("transforming growth factors"), des IGFs ("insulin like growth factors"), des NGFs ("nerve growth factors"), des ILs ("interleukins"), des CSFs ("colony stimulating growth factors") et des FGFs ("fibroblasts growth factors").

Nous savons, jusqu'à présent, que les FGFs sont très bien conservés chez les vertébrés mammifères (Esch *et al.*, 1985 ; Böhlen *et al.*, 1985 ; Gimenez-Gallego, 1986a et b) et les oiseaux (Risau *et al.*, 1988) ; ces molécules ont non seulement été détectées au niveau de blastèmes d'Amphibiens (Boilly *et al.*, 1990) mais également dans le cerveau et la rétine de la roussette *Mustelus canis* (Lagente *et al.*, 1986). Par contre, elles n'ont pas encore été étudiées chez des invertébrés. Nous avons donc recherché l'existence de facteurs de croissance de type FGF et de leurs récepteurs chez des néréidiens, annélides polychètes marines, présentant des capacités régénératrices et angiogènes très importantes. Enfin, nous avons abordé l'étude du rôle biologique de ces molécules chez ces animaux.

GENERALITES

La famille des "fibroblast growth factors" (FGFs)

I : Historique

Les FGFs, également appelés HBGFs ("heparin binding growth factors"), constituent une famille de plusieurs polypeptides structurellement apparentés. Les mieux caractérisés sont le FGF basique et le FGF acide (pour revues, voir Thomas *et al.*, 1987 ; Folkman et Klagsbrun, 1987 ; Gospodarowicz, 1989 ; Burgess et Maciag, 1989). Le terme de "fibroblast growth factor" a été utilisé pour la première fois en 1974 par Gospodarowicz pour décrire un polypeptide extrait de l'hypophyse et du cerveau de bovin et possédant un pI de 9,6 et qui est capable de stimuler la prolifération des cellules 3T3 (Gospodarowicz, 1975 ; Gospodarowicz *et al.*, 1978). Un autre FGF possédant un pI de 5,6 contenu dans le cerveau de bovin a été purifié. Ce facteur est mitogène pour les cellules endothéliales (Maciag *et al.*, 1979 ; Thomas *et al.*, 1980 ; Lemmon et Bradshaw, 1983 ; Thomas *et al.*, 1984). Ces deux facteurs de croissance ont été appelés respectivement FGF basique et FGF acide. Par ailleurs, depuis dix ans une trentaine de facteurs de croissance tels que l'EDGF ("eye-derived growth factor") ou l'ECGF ("endothelial cell growth factor") ont été identifiés et se sont avérés être soit du FGF acide, soit du FGF basique (tableau I). Enfin, il a été montré que le FGF acide et le FGF basique possèdent une très forte affinité pour l'héparine (Shing *et al.*, 1983 ; Shing *et al.*, 1984 ; Gospodarowicz *et al.*, 1984 ; Lobb et Fett, 1984). Par conséquent, le terme d'"heparin binding growth factor" (HBGF) a été introduit ; le FGF acide correspond au HBGF-1 alors que le FGF basique est également appelé HBGF-2.

II : Propriétés biochimiques de la famille des FGFs

A : Les FGFs acide et basique

Le FGF basique est un polypeptide cationique composé d'une seule chaîne non glycosylée (figure 1). Ce facteur de croissance possède un poids moléculaire d'environ 18 kDa et un point isoélectrique de 9,6 (Gospodarowicz, 1989). Il a été purifié d'un nombre important de tissus et de lignées cellulaires (tableau I). Le séquençage initial du polypeptide possédant un poids moléculaire de 16,5 kDa a montré qu'il était composé de 146 acides aminés (Esch *et al.*, 1985). Cependant, les valeurs concernant le poids moléculaire de ces polypeptides sont variables car il est possible que des protéases peuvent intervenir lors de l'extraction acide des

Localisation	Dénomination	Abbréviation	Auteurs
hypophyse	pituitary FGF	FGF	Böhlen <i>et al.</i> , 1984
cerveau	brain FGF	FGF	Thomas <i>et al.</i> , 1984
cerveau	brain-derived growth factor	BDNF	Huang <i>et al.</i> , 1986a,b
cerveau	heparin-binding growth factor	HBGF	Lobb et Fett, 1984
hypothalamus	endothelial cell growth factor	ECGF	Lobb et Fett, 1984
rétine	retina-derived growth factor	RDGF	Baird <i>et al.</i> , 1985c
oeil	eye-derived growth factor	EDGF	Courty <i>et al.</i> , 1985 a,b
rein	kidney angigenic growth factor	KAF	Baird <i>et al.</i> , 1985b
glande surrénales	adrenal growth factor	AGF	Gospodarowicz <i>et al.</i> , 1986b
corps lutéinique	corpus luteum growth factor	CLAF	Gospodarowicz <i>et al.</i> , 1985
ovaires	ovarian growth factor	OGF	Makris <i>et al.</i> , 1984
placenta	placental angiogenic growth factor	PAF	Sommer <i>et al.</i> , 1987
foie	hepatocyte growth factor	HGF	Ueno <i>et al.</i> , 1986b
muscles			
-squelettiques	myogenic growth factor	MGF	Kardami <i>et al.</i> , 1985
-myocardiques	heparin-binding growth factor	HBGF	Thompson <i>et al.</i> , 1986
cartilage	cartilage-derived growth factor	CDGF	Klagsbrun et Beckoff, 1980
matrice osseuse	bone growth factor	BGF	Matsuo <i>et al.</i> , 1987
testicules	seminiferous growth factor	SGF	Bellvé et Feig, 1984
prostate	prostatopin	PGF	Story <i>et al.</i> , 1987 a, b
thymus	heparin-binding growth factor	HBGF	Gospodarowicz, 1987
Tumeurs			
chondrosarcome	tumor-derived growth factor	CDGF	Shing <i>et al.</i> , 1984
hépatome	hepatoma-derived growth factor	HDGF	Lobb <i>et al.</i> , 1986b
mélanome	melanoma-derived growth factor	MDGF	Lobb <i>et al.</i> , 1986b
néphrome	acidic fibroblast growth factor	FGF	Witte <i>et al.</i> , 1989
tumeur mammaire	mammary-tumor-derived GF	MTGF	Rowe <i>et al.</i> , 1986
tumeur prostatique	prostatic growth factor	PGF	Matsuo <i>et al.</i> , 1987
Cellules			
-follicules hypophysaires	basic fibroblast growth factor	FGF	Ferrara <i>et al.</i> , 1987
-endothéliales de vaisseaux	basic fibroblast growth factor	FGF	Schweigerer <i>et al.</i> , 1987b
-endothéliales de capillaires	basic fibroblast growth factor	FGF	Schweigerer <i>et al.</i> , 1987b
-de muscles lisses	endothelial cell growth factor	ECGF	Winkles <i>et al.</i> , 1987
-neuronales	brain derived growth factor	BDGF	Huang <i>et al.</i> , 1987
-fibroblastiques	basic fibroblast growth factor	FGF	Moscatelli <i>et al.</i> , 1986a
-épithéliales de la rétine	basic fibroblast growth factor	FGF	Schweigerer <i>et al.</i> , 1987b
-macrophages	basic fibroblast growth factor	FGF	Baird <i>et al.</i> , 1985a
-hépatomateuses	basic fibroblast growth factor	FGF	Klagsbrun <i>et al.</i> , 1986
-medulloblastomateuses	heparin-binding growth factor	HBGF	Lobb <i>et al.</i> , 1986a
-de rhabdomyosarcome	basic fibroblast growth factor	FGF	Schweigerer <i>et al.</i> , 1987a
-rétinoblastomateuses	basic fibroblast growth factor	FGF	Schweigerer <i>et al.</i> , 1987c
-HeLa	basic fibroblast growth factor	FGF	Moscatelli <i>et al.</i> , 1986a
-leucémiques	basic fibroblast growth factor	FGF	Moscatelli <i>et al.</i> , 1986a
-de neuroblastome	brain-derived growth factor	BDGF	Huang <i>et al.</i> , 1987
-de gliome	angiogenic factor	FGF	Libermann <i>et al.</i> , 1987

Tableau I : Distribution et dénomination des FGFs au niveau des tissus, des cellules et des tumeurs. (d'après Baird et Böhlen, 1989)

tissus, la formation de formes tronquées en clivant le FGF basique "natif" au niveau de sa partie N-terminale (Esch *et al.*, 1985 ; Bohlen *et al.*, 1985 ; Gautschi-Sova *et al.*, 1986b). Par ailleurs, les études sur des formes non tronquées par extraction acide en présence d'inhibiteurs de protéase ou encore à pH neutre (Ueno *et al.*, 1986a ; Klagsbrun *et al.* 1987) ont montré que le FGF basique possédait 154 acides aminés. Ces huit acides aminés supplémentaires par rapport au FGF basique (8-154) se trouvent du côté N-terminal et n'altèrent pas l'activité mitogène du FGF basique. Il a été montré également avec une forme de FGF basique (24-154) extraite du rein (Baird *et al.*, 1985a) et des glandes surrénales (Gospodarowicz *et al.*, 1986b) que les 23 premiers acides aminés ne sont pas nécessaires à l'activité biologique du FGF basique. D'autre part, une forme de FGF basique possédant 157 acides aminés et une autre à 163 ont été respectivement isolées du placenta (Sommer *et al.*, 1987) et de cellules hépatiques humaines (Prats *et al.*, 1989).

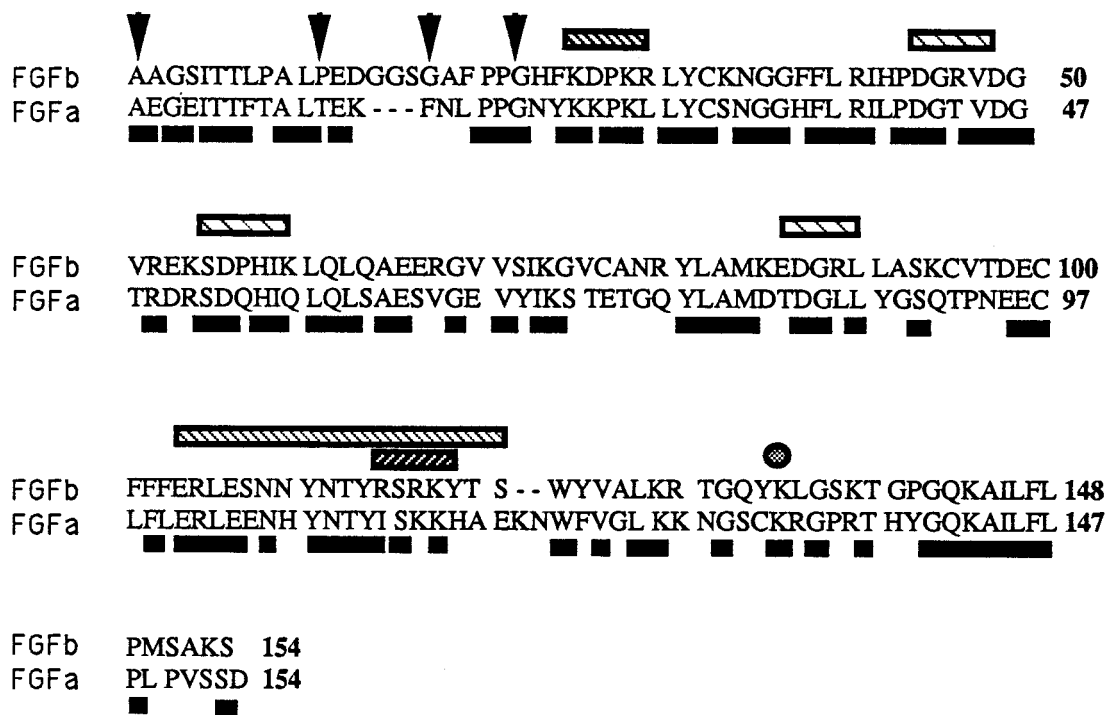
En outre, des formes possédant un poids moléculaire de 22 et de 25 kDa ont été purifiées du cerveau de rat et de cobaye (Presta *et al.*, 1988 ; Presta *et al.*, 1989 ; Moscatelli *et al.*, 1987a). Il a de plus été montré que des formes de haut poids moléculaires, après digestion trypsique, peuvent former des polypeptides dont le poids moléculaire est analogue à celui du FGF basique (1-154) (Moscatelli *et al.*, 1987a). Il apparaît que les polypeptides de plus haut poids moléculaire sont générés par un mécanisme faisant intervenir des codons CUG (Prats *et al.*, 1989 ; Florkiewicz *et al.*, 1989). Un cDNA du FGF basique a été cloné et séquencé (Prats *et al.*, 1989). La transcription et la traduction de ce cDNA montrent l'existence de trois polypeptides de 18, 21 et 22.5 kDa dont seule la forme à 18 kDa (Prats *et al.*, 1989) est initiée par un codon AUG (Abraham *et al.*, 1986b).

Le FGF acide est composé d'une chaîne polypeptidique unique (figure 1) qui possède un poids moléculaire de 18 kDa et un pI de 5,6 (Thomas *et al.*, 1987 ; Burguess et Maciag, 1989 ; Thomas *et al.*, 1984). Ce facteur a été initialement purifié du cerveau et présente tout comme le FGF basique une forte affinité pour l'héparine (Lobb *et al.*, 1984 ; Maciag *et al.*, 1984 ; Conn *et al.*, 1984). Primitivement, deux formes de FGF acide possédant respectivement 140 et 134 acides aminés ont été identifiées (Gimenez-Gallego *et al.*, 1985 ; Gautschi-Sauva *et al.*, 1986a et b) mais elles ne représentent en réalité que des formes tronquées au niveau N-

terminal. Il apparaît que le FGF acide "natif" est caractérisé par un enchaînement de 154 acides aminés (Burgess *et al.*, 1985; Burgess *et al.*, 1986; Crabb *et al.*, 1986). Cette observation a été confirmée par l'analyse de la séquence déduite du cDNA du FGF acide (Jaye *et al.*, 1986).

Les séquences en acides aminés du FGF acide et du FGF basique (figure 1) ont donné de nombreuses informations en ce qui concerne la structure de ces polypeptides. Tout d'abord, ils sont fortement conservés car le FGF basique possède 53% d'homologie par rapport au FGF acide (Esch *et al.*, 1985 ; Gimenez-Gallego *et al.*, 1985 ; Bohlen *et al.*, 1985 ; Gimenez-Gallego *et al.*, 1986a et b) suggérant qu'ils dérivent d'un gène ancestral commun. L'homologie structurale est également importante pour l'un ou l'autre de ces facteurs de croissance provenant d'espèces différentes. Par exemple, le FGF basique de bovin diffère de deux acides aminés par rapport au FGF basique humain et celui du rat de cinq acides aminés par rapport aux deux autres molécules. Il est à noter que deux cystéines en position 33 et 100 par rapport au FGF (1-154) se retrouvent chez tous les membres de la famille des FGFs. Par ailleurs, la conversion des cystéines en sérines (Ortega *et al.*, 1988) ne modifie pas l'activité biologique de ces polypeptides mais la stabilise notamment en empêchant la formation de dimères biologiquement inactifs.

Les gènes des FGFs acide (Jaye *et al.*, 1986) et basique (Abraham *et al.*, 1986a ; Kurokawa *et al.*, 1989) humains, du FGF basique bovin (Abraham *et al.*, 1986b) et murin (Shimasaki *et al.*, 1988) ont été clonés et séquencés. Ils présentent des similitudes en ce qui concerne la structure génique. Cette dernière est composée de trois exons séparés par deux introns localisés respectivement entre les résidus 60-61 et les résidus 94-95 (Gospodarowicz, 1989). De plus, il n'existe pas de séquence codant pour un peptide "signal" (Abraham *et al.*, 1986a et b ; Jaye *et al.*, 1986). Des différences notables ont cependant été rapportées, en particulier au niveau de leur localisation génomique. Les gènes correspondant au FGF acide sont situés sur le chromosome 5 humain alors que ceux du FGF basique sont localisés au



niveau du chromosome 4 (Mergia *et al.*, 1986). En ce qui concerne les transcrits, une forme majeure d'ARN messager de 4,8 kb a été détectée (Jaye *et al.*, 1986 ; Mergia *et al.*, 1986) pour le FGF acide et deux autres formes mineures ont également été décrites dans les tissus embryonnaires (Wang *et al.*, 1990). Pour le FGF basique, deux formes ayant respectivement 7 et 3,7 kb ont été décrites et parfois de 1,4 kb (Abraham *et al.*, 1986c). Enfin, l'ADN complémentaire du FGF acide, codant pour un produit de traduction de 154 acides aminés, possède des codons de terminaisons contrairement à celui du FGF basique (1-154). Cette différence structurale pourrait expliquer la possibilité d'avoir des FGFs basiques de poids moléculaires plus élevés.

B : Les autres membres de la famille des FGFs

Plusieurs oncogènes ont été décrits car ils codent pour des protéines possédant une homologie avec les FGFs de 40-50% (tableau II) et une affinité pour l'héparine. Les oncogènes faisant partie de cette famille sont respectivement *int-2* (Dickson et Peters, 1987), *hst / K-fgf* (Delli-Bovi *et al.*, 1987 ; Yoshida *et al.*, 1987 ; Heath *et al.*, 1989), FGF-5 (Zhan *et al.*, 1988), FGF-6 (Marics *et al.*, 1989). Ils présentent au niveau de leur structure la configuration 3 exons / 2 introns et possèdent, en outre, dans leur séquence en acides aminés, deux cystéines correspondant aux résidus en position 33 et 100 du FGF(1-154). Cependant, ils diffèrent des FGFs acide et basique par le fait de l'existence d'un peptide "signal". Par ailleurs, deux autres polypeptides ont été découverts : Le FGF7 purifié à partir de fibroblastes (Finch *et al.*, 1989) et le HBGF-8 extrait du cerveau (Rauvala, 1989) et de l'utérus (Milner *et al.*, 1989).

III : Distribution des FGFs

Les membres de la famille du FGF, en particulier les FGFs acide et basique, sont largement distribués (tableau I).

Le FGF acide a été trouvé dans les tissus nerveux tels que le cerveau (Lobb *et al.*, 1984 ; Maciag *et al.*, 1984 ; Pettman *et al.*, 1985 ; Mc Keehan et Crabb, 1987), l'hypothalamus (Maciag *et al.*, 1979), l'oeil (Barritault *et al.*, 1981), la rétine (Courty *et al.*, 1985a et b) mais également dans l'os (Hauschka *et al.*, 1986), le rein (Gautschi-Sova *et al.*, 1987).

Le FGF basique se retrouve au niveau du cerveau (Gospodarowicz *et al.*, 1978 ; Lobb et Fett, 1984 ; Pettmann *et al.*, 1985) localisé dans les neurones (Pettmann *et al.*, 1986 ; Huang *et al.*, 1987), l'hypothalamus (Klagsbrun et Shing, 1985), l'hypophyse (Maciag *et al.*, 1979) et l'oeil (Courty *et al.*, 1985a et b). En outre, le FGF basique est également présent dans des tissus tels que l'os (Hauschka *et al.*, 1986), le cartilage (Sullivan et Klagsbrun, 1985), le placenta (Moscatelli *et al.*, 1986b), le *corpus luteum* (Gospodarowicz *et al.*, 1985), les gonades mâles (Ueno *et al.*, 1986a ; Story *et al.*, 1987) et femelles (Baird et Hsueh, 1986), la prostate (Story *et al.*, 1987a et b), les glandes surrénales (Gospodarowicz *et al.*, 1986b), le rein (Baird *et al.*, 1985b), le foie (Ueno *et al.*, 1986b), le coeur (Quinkler *et al.*, 1989 ; Kardami et Fandrich, 1989), les capillaires sanguins (Hanneken *et al.*, 1989) ou des tumeurs comme les chondrosarcomes (Shing *et al.*, 1984).

De plus, il a été montré que le taux de FGF basique varie durant le développement embryonnaire du rein (Risau et Ekblom, 1986), du bourgeon de membre de poulet (Munaim *et al.*, 1988) et dans l'ovocyte de xénope (Kimmelman *et al.*, 1988). Il apparaît que les FGFs acide et basique sont les facteurs de croissance dont la répartition, au sein d'un organisme vivant, est la plus large. En outre, la présence de ces facteurs dans des tissus adultes où la croissance est terminée suggère que l'activité de ces facteurs de croissance est fortement régulée dans les conditions physiologiques normales.

Les autres membres de la famille des FGFs (*int-2*, *hst / K-fgf*, FGF5 et FGF6) présentent une répartition totalement différente. En effet, ils sont très rarement trouvés dans des tissus adultes normaux mais ces oncogènes s'expriment au cours de l'embryogenèse et de la croissance tumorale où la prolifération cellulaire est intense (Jakobovits *et al.*, 1986 ; Wilkinson *et al.*, 1988 ; Yoshida *et al.*, 1989 ; Wilkinson *et al.*, 1989 ; Basilico *et al.*, 1989 ; Zhan *et al.*, 1988).

IV : Les sites de fixation spécifiques aux FGFs

A : Les récepteurs

Les cellules répondant aux FGFs possèdent des récepteurs spécifiques. Ceux-ci ont été

Noms	Poids moléculaires (kDa)	Localisation chromosomique (humain)	Sécrétion	Homologie / FGF basique
FGF basique	18	5	Non	100
FGF acide	18	4q26-27	Non	53
<i>int-2</i>	27	11q13	ND	44
<i>hst / K-fgf</i>	23	11q13	Oui	43
FGF 5	29	ND	Oui	45
FGF 6	ND	12q13	ND	40
FGF7 (KGF)	22	ND	oui	39
HBGF8	17	ND	ND	ND

ND : non déterminé

Tableau II : La famille des FGFs

trouvés à la surface de nombreux types cellulaires, tels que : les cellules endothéliales (Friesel *et al.*, 1986) et fibroblastiques (Olwin et Hauschka, 1986 ; Huang et Huang, 1986), les myoblastes (Olwin et Hauschka, 1986), les cellules BHK (Neufeld et Gospodarowicz, 1985 ; Moscatelli, 1987b), les cellules épithéliales du cristallin (Moenner *et al.*, 1986 ; Moenner *et al.*, 1987) et les cellules de phéochromocytomes (PC 12) (Neufeld *et al.*, 1987). Par ailleurs, ces récepteurs ont également été détectés au niveau de tissus tels que le cerveau de bovin (Courty *et al.*, 1988), le cerveau de cobaye (Ledoux *et al.*, 1989) et le placenta de souris (Hondermarck *et al.*, 1990a). Plusieurs études semblent indiquer que le FGF basique, le FGF acide (Olwin et Hauschka, 1986 ; Friesel *et al.*, 1986 ; Neufeld et Gospodarowicz, 1986) et probablement le K-FGF (Baird *et al.*, 1988 ; Halaban *et al.*, 1988 ; Basilico *et al.*, 1989 ; Mansukhani *et al.*, 1990) interagissent avec le même récepteur. Il apparaît que celui-ci est une protéine monocaténaire dont le poids moléculaire varie entre 110 et 150 kDa en fonction des différentes lignées cellulaires précitées et de 80 à 170 kDa en ce qui concerne les études au niveau des préparations tissulaires précédemment décrites. Une des observations les plus remarquables réside dans le fait que la plupart des cellules et des tissus étudiés possèdent, en général, deux formes de récepteurs. Il semblerait, par ailleurs, que la protéine possédant le plus faible poids moléculaire présente une affinité plus importante vis-à-vis du FGF acide (Neufeld et Gospodarowicz, 1986). Par ailleurs, une étude réalisée sur les récepteurs des cellules BHK a permis de montrer que ceux-ci étaient glycosylés (Feige et Baird, 1988). En effet, les deux formes récepteurs initialement observées, suite à l'action d'endoglycosidases, possèdent respectivement des masses protéiques de 100 et 125 kDa. Elles seraient ensuite glycosylées pour donner des formes récepteurs de 115 et 140 kDa riches en mannose et seraient maturées, par la suite, en formant des complexes glycoprotéiques de 130 et 150 kDa. De plus, il apparaît que la glycosylation est nécessaire à la fonction du récepteur, en particulier au niveau de la fixation des FGFs, car l'action des endoglycosidases influence fortement les potentialités de fixation du ligand. Enfin, il est à noter que les sucres présents semblent être reliés par des liaisons N-glycosidiques. Il est cependant impossible de préciser si la présence de deux récepteurs est due à l'expression de gènes différents ou à une modification post-traductionnelle d'une même protéine. L'approche par la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence un

ARN messenger codant pour un récepteur affiné pour le FGF basique. Ce transcrite, appelé *flg*, a été initialement découvert au niveau d'une cDNAthèque de poulet et est traduit en un polypeptide de 100 kDa (Lee *et al.*, 1989). Il est à noter que cet ADN complémentaire possède une forte homologie avec deux autres éléments : *flg* et *bek*. Ces derniers ont été partiellement clonés et séquencés chez l'humain (*flg*) (Ruta *et al.*, 1988) et la souris (*bek*) (Kornbluth *et al.*, 1988). Les séquences de *flg* et *bek* ont été complètement caractérisées (Dionne *et al.*, 1990) et présentent une homologie importante avec celle décrite par Lee *et al.* (1989). Par ailleurs, ces transcrits traduisent pour deux glycoprotéines membranaires de 150 et 145 kDa possédant un domaine tyrosine-kinase et dont la partie glycosylée correspond à 40 kDa. Il est difficilement concevable que cette seule protéine génère l'ensemble des récepteurs aux FGFs et certains récepteurs distincts de *flg* ont déjà été rapportés (Burrus et Olwin, 1989). Il a également été montré qu'il existe deux formes de RNA messenger au niveau du neuroépithélium d'embryon de souris (Reid *et al.*, 1990). La première d'entre elles correspond à *flg* et la seconde à une forme ne possédant que 75% d'homologie.

La grande variabilité des poids moléculaires notée au sein des cellules et des tissus, pourrait être due, pour partie, à une glycosylation plus ou moins importante des formes récepteurs et donc expliquer l'hétérogénéité des constantes de dissociation qui varient de 10 à 270 pM, mais également à l'existence probable de gènes récepteurs différents.

B : Les sites de fixation à basse affinité

Au sein des cellules et des tissus précédemment décrits, il apparaît que deux classes de sites spécifiques pour les FGFs existent. Une distinction entre sites d'interaction spécifique à haute affinité et ceux à basse affinité peut être réalisée (Moscatelli, 1987b ; Moscatelli, 1988). Si les premiers correspondent aux récepteurs précédemment cités, responsables de l'activité biologique, la fonction des sites de fixation à basse affinité définis par un Kd compris entre 3 et 30 nM est encore inconnue. Ces sites de fixation à basse affinité sont sensibles aux traitements à l'héparinase. En outre, l'adjonction d'héparine empêche la fixation du FGF au niveau de ces sites (Moscatelli, 1988). Ces sites à basse affinité ont non seulement été trouvés à la surface des cellules mais également associés avec la matrice extracellulaire (Bashkin *et al.*, 1989) et la

membrane basale (Folkman *et al.*, 1988) en particulier au niveau des glycoaminoglycannes sulfatés (GAGs) de type héparane (Moscatelli, 1987b ; Baird *et al.*, 1988 ; Rosengart *et al.*, 1988) . De plus, une étude récente effectuée au niveau du cerveau de poulet semblent indiquer que ces héparanes possèdent un poids moléculaire de l'ordre de 15 kDa et 65 kDa (Hondermarck, 1990).

Par ailleurs, il semblerait que la faculté de la matrice extracellulaire à capter certaines protéines expliquerait la présence à ce niveau du FGF basique (Kurokawa *et al.*, 1989 ; Neufeld et Gospodarowicz, 1987 ; Rogelj *et al.*, 1989) et du FGF acide (Moenner *et al.*, 1987 ; DiMario *et al.*, 1989). En effet, la notion de l'existence d'une relation entre FGFs et matrice extracellulaire n'est pas récente car des préparations de matrice extracellulaire de cellules endothéliales peuvent mimer *in vitro* l'action du FGF dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire (Gospodarowicz, 1984). De plus, des études effectuées avec la matrice extracellulaire de cellules de carcinome embryonnaire HR-9 ne synthétisant pas le FGF ne présente pas les caractéristiques précitées. Par contre, si le DNA complémentaire du FGF basique est transfecté au niveau de ces cellules, des préparations obtenues à partir de la matrice extracellulaire sont à nouveau capable de stimuler la prolifération des cellules endothéliales et d'induire la différenciation des cellules PC 12 (Rogelj *et al.*, 1989). Ces données semblent indiquer que les FGFs sont les éléments extracellulaires indispensables à ces activités biologiques. De telles observations sont actuellement difficiles à appréhender particulièrement en ce qui concerne les FGFs acide et basique car ces derniers ne possèdent pas de peptide "signal" permettant la sécrétion. Cependant, la présence de FGFs au niveau de la matrice extracellulaire (Gonzales *et al.*, 1990), au niveau des GAGs (Saksela *et al.*, 1988), pourrait être expliquée par des mécanismes tels que la lyse cellulaire ou la sécrétion par association avec des molécules de type héparine. Cette interaction avec les GAGs au niveau de la matrice extracellulaire et de la membrane basale pourrait correspondre à une forme de stockage et de régulation du facteur empêchant sa dégradation (Baird et Ling, 1987 ; Vlodaysky *et al.*, 1987) et permettant sa biodisponibilité (Bashkin *et al.*, 1989).

IV : Modes de transduction du signal

Le signal de transduction au niveau des cellules par le FGF n'est pas encore bien défini. En effet, il n'est pas possible de proposer pour le moment un schéma général du mécanisme de transduction cellulaire des FGFs contrairement aux EGFs et aux PDGFs dont la transduction se caractérise par une série d'événements incluant la stimulation de l'activité tyrosine-kinase au niveau du récepteur, puis l'internalisation et la dégradation de ces complexes (Yarden et Ullrich, 1988).

En ce qui concerne les FGFs, l'interaction ligand-récepteur se traduit par une augmentation des protéines phosphorylées (Magnaldo *et al.*, 1986 ; Pelech *et al.*, 1986 ; Coughlin *et al.*, 1988). Il a été montré que le FGF basique peut stimuler une activité de type tyrosine-kinase sur des cellules BHK (Neufeld et Gospodarowicz, 1985). Par ailleurs, il a été montré que les FGFs pouvaient induire la phosphorylation d'une protéine de 90 kDa *in vitro* au niveau des cellules NIH 3T3 (Friesel *et al.*, 1989) d'une part, et *in vivo* d'autre part (Coughlin *et al.*, 1988). Cette protéine phosphorylée est cependant plus petite que les formes récepteurs au FGF basique couramment décrites mais pourrait être le substrat spécifique des FGFs reflétant l'activité tyrosine-kinase.

De plus, la fixation du FGF acide sur son récepteur induit la phosphorylation de résidus tyrosine non seulement au niveau d'une protéine de 135 kDa sur des préparations membranaires de cellules Swiss 3T3 (Huang et Huang, 1986) mais également sur des protéines de 130 et de 150 kDa dans les cellules NIH 3T3 (Friesel *et al.*, 1989). Ces polypeptides phosphorylés possèdent des poids moléculaires analogues à ceux des récepteurs et les données obtenues semblent indiquer que les FGFs induisent l'autophosphorylation de leurs récepteurs à l'instar des EGFs, des PDGFs, des CSFs et des IGFs (Yarden et Ullrich, 1988).

Par ailleurs, les possibilités de l'activation d'une S6 kinase ainsi que la phosphorylation d'autres protéines cytosoliques ont également été montrées et permettent d'émettre l'hypothèse d'un rôle probable de la PKC (protéine kinase C) (Togari *et al.*, 1985 ; Magnaldo *et al.*, 1986 ; Pelech *et al.*, 1986 ; Blanquet *et al.*, 1988) ainsi que de celui des courants calciques (Tsuda *et al.*, 1985 ; Magnaldo *et al.*, 1986). Les seconds messagers possibles sont les éléments issus du métabolisme des inositides qui sous l'action des phospholipases forment les

inositols monophosphates (IP), diphosphates (IP₂) et triphosphates (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ joue le rôle de second messenger au même titre que l'AMPc et permet l'augmentation calcique intracellulaire (Tsuda *et al.*, 1985 ; Magnaldo *et al.*, 1986). Le DAG est responsable de l'activation de la PKC (Tsuda *et al.*, 1985 ; Takeyama *et al.*, 1986). Il apparaît que la formation de DAG ne semble pas s'accompagner de la formation d'IP₃ (Magnaldo *et al.*, 1986 ; Mioh et Cheng, 1987 ; Chambard *et al.*, 1987 ; Moscat *et al.*, 1988). Cependant, une réponse de type IP peut se manifester après la stimulation de cellules endothéliales aortiques de porcs par du FGF (Moscat *et al.*, 1988) suggérant ainsi une possibilité métabolique faisant intervenir des phospholipases autres que la phospholipase C.

Ces mécanismes de transduction, parfois contradictoires, se sont encore compliqués par le fait que les FGFs peuvent être également internalisés et dégradés lentement dans la cellule (Moenner *et al.*, 1987 ; Moscatelli *et al.*, 1988) ; il apparaît que ces polypeptides intracellulaires peuvent s'accumuler dans le noyau au niveau du nucléole (Bouché *et al.*, 1987). De plus, il a été montré que ces translocations sont spécifiques de la phase G₁ du cycle cellulaire (Baldin *et al.*, 1990). Cependant, ces données ne permettent pas de déterminer si les FGFs peuvent avoir un effet direct à l'intérieur de la cellule.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe une grande diversité des voies de transduction permettant les effets pleiotropiques des FGFs et dont le mécanisme général reste à définir.

V : Propriétés biologiques des FGFs

A : Propriétés des FGFs *in vitro*

Les FGFs, en particulier les FGFs acide et basique, sont des polypeptides pouvant stimuler la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire *in vitro*. Ces facteurs de croissance peuvent induire la prolifération d'un grand nombre de cellules d'origine mésodermique et neuroectodermique (tableau III). Par ailleurs, la présence des FGFs permet la différenciation de certaines lignées cellulaires provenant de tissus normaux (tableau III) ou de cellules cancéreuses telles que les cellules PC 12 (Rogelj *et al.*, 1989).

Cellules	Activité mitogène <u>in vitro</u>	Rôle non mitogène et / ou différenciateur <u>in vitro</u>
Fibroblastes endothéliales	Gospodarowicz, 1974	Senior et al., 1986
- de capillaires	Gospodarowicz et al., 1984	Presta et al., 1986
- de vaisseaux	Gospodarowicz et al., 1976	Gospodarowicz et al., 1980
cellules satellites	Allen et al., 1984	
myocytes	Lathrop et al., 1985a	Lathrop et al., 1985b
chondrocytes	Kato et Gospodarowicz, 1984	Kato et Gospodarowicz, 1985
cellules osseuses	Globus et al., 1988	Canalis et al., 1987
kératinocytes	O'Keefe et al., 1988	
mélanocytes	Halaban et al., 1987	Halaban et al., 1987
cellules de Leydig		Fausser et al., 1988
neurones rétiniens		Lipton et al., 1988
neurones du SNC		Walicke et al., 1986
neurones périphériques		Unsicker et al., 1987
astrocytes	Pettmenn et al., 1985a	Morisson et al., 1985
oligodendrocytes	Saneto et De Vellis, 1985	Rogister et al., 1988
cellules de Schwann	Pruss et al., 1981	Pruss et al., 1981
myoblastes	Linkhart et al., 1980	Gospodarowicz et Mescher, 1981
ostéoblastes	Togari et al., 1983	
neuroblastes	Gensburger et al., 1987	

Tableau III : Activité du FGF *in vitro* au niveau de différents types cellulaires

Il est à noter enfin que les propriétés des FGFs peuvent être modulées par l'héparine qui potentialise notamment l'effet biologique des FGFs acides et du K-FGF.

B : Propriétés des FGFs *in vivo*

Si les caractéristiques du rôle biologique des FGFs *in vitro* sont bien décrites, le rôle de ces facteurs de croissance *in vivo* est plus difficile à mettre en évidence. Cependant, plusieurs études ont montré que les membres de la famille des FGFs pouvaient avoir un rôle important dans des mécanismes physiologiques tels que l'angiogenèse, la cicatrisation, la réparation voire la régénération de tissus lésés et le développement embryonnaire.

1 : L'angiogenèse

Des polypeptides tels que l'angiogénine (Fett *et al.*, 1985 ; Riordan et Vallée, 1988), le TGF alpha (Schreiberg *et al.*, 1986), le TGF beta (Roberts *et al.*, 1986), le TNF alpha (Leibovitch *et al.*, 1987), les FGFs acide et basique se sont avérés être des molécules angiogènes *in vivo*.

L'angiogenèse est un mécanisme biologique complexe qui débute par la dégradation de la membrane basale des capillaires sanguins et se poursuit par la migration et la prolifération cellulaire se traduisant finalement par la formation de nouveaux capillaires sanguins.

Ces événements peuvent être mimés *in vitro*. Dans ce cas, il apparaît que les FGFs sont capables d'intervenir à tous les stades du processus de néovascularisation. Ces facteurs de croissance sont mitogènes pour les cellules endothéliales (Presta *et al.*, 1986 ; Conolly *et al.*, 1987 ; Sato et Rifkin, 1988), permettent l'expression de protéases capables de dégrader la membrane basale (Presta *et al.*, 1986 ; Saksela *et al.*, 1987 ; Mignatti *et al.*, 1989) et d'induire la formation de tubes capillaires (Montesano *et al.*, 1986). *In vivo*, ces facteurs se fixent au niveau des endothéliums (Rosengart *et al.*, 1988) et des vaisseaux (Hondermarck *et al.*, 1990b) et permettent la formation de capillaires au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, de la cornée de rat et de lapin (Shing *et al.*, 1985 ; Lobb *et al.*, 1985) ou encore au niveau de la cavité péritonéale par l'intermédiaire d'implants imbibés de FGF (Davidson *et al.*, 1985).

Les FGFs acide et basique pourraient avoir un rôle important dans des processus physiologiques naturels notamment dans des mécanismes accompagnant la reproduction. En effet, ces facteurs pourraient être les polypeptides responsables des changements vasculaires rapides se produisant autour du follicule au moment de l'ovulation (Gospodarowicz *et al.*, 1985) et l'évolution des taux des FGFs et de leurs récepteurs pourrait également être impliqué au cours de la croissance placentaire (Moscatelli *et al.*, 1986b ; Kohnke-Godt et Hans -Joackim, 1989 ; Hondermarck *et al.*, 1990a).

2 : Le développement embryonnaire

Il a été montré que les FGFs interviennent à des moments précis au cours du développement embryonnaire. Le FGF basique semble jouer au cours de la formation du bourgeon de membre (Munaim *et al.*, 1988) et du rein (Risau *et al.*, 1986). De plus, les gènes tels que *int-2* (Jakobovits *et al.*, 1986 ; Mansour et Martin, 1988 ; Wilkinson *et al.*, 1988 ; Smith *et al.*, 1988) et *hst / K-fgf* (Yoshida *et al.*, 1989 ; Basilico *et al.*, 1989) s'expriment pendant le développement de l'embryon de souris alors que le FGF 5 (Zhan *et al.*, 1988) est exprimé dans le cerveau à l'approche de la naissance.

La synthèse de molécules apparentées aux FGFs a été étudiée dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* (Slack *et al.*, 1987 ; Kimmelman *et al.*, 1987 ; Kimmelman *et al.*, 1988). L'induction mésodermique chez les vertébrés est obtenue par des signaux provenant de l'endoderme présomptif. Apparemment, il semble que la formation du mésoderme soit due à la présence de molécules de type FGF (Slack *et al.*, 1987 ; Kimmelman *et al.*, 1987 ; Kimmelman *et al.*, 1988 ; Paterno *et al.*, 1989). La mise en évidence de ce processus majeur a été réalisée en ajoutant du FGF basique de bovin ou d'humain au milieu de culture. Ces derniers induisent la formation de mésoderme sur des embryon de stade 8. Cet effet est spécifique car d'autres facteurs de croissance (EGF, PDGF, IGF, interleukines, TGF β) n'induisent pas la formation du feuillet mésodermique (Kimmelman *et al.*, 1988). Cependant, il est à noter que le FGF basique agit en synergie avec le TGF β (Kimmelman *et al.*, 1988). De plus, l'induction naturelle est bloquée par l'héparine (Slack *et al.*, 1987) suggérant que les polypeptides responsables de l'induction ecto-mésoderme sont des molécules appartenant à la famille des FGFs. Enfin, il a

été montré qu'un RNA messenger de 4,2 kb transcrit au stade neurula est traduit en un polypeptide de 155 acides aminés possédant une homologie de 80% avec le FGF basique humain (Kimmelman *et al.*, 1988). L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure qu'au cours de l'embryogenèse les FGFs peuvent être des éléments "signal" très importants.

3 : Réparation et régénération tissulaires

Dans les processus de cicatrisation, il a été montré que le FGF basique avait la capacité de stimuler la formation de tissu cicatriciel en induisant la migration et la prolifération des cellules des tissus conjonctifs dans une blessure (Buntrock *et al.*, 1984 ; Buckley-Sturrock *et al.*, 1989). De plus, dans des lésions dermiques, il a été observé que la vitesse de cicatrisation était augmentée lorsque du FGF était ajouté (Thomas *et al.*, 1987).

L'endothélium de la cornée possède des capacités régénératrices limitées en fonction de l'âge ou après une lésion. L'adjonction de FGF stimule la prolifération des cellules endothéliales de la cornée *in vivo* (Landshman *et al.*, 1987 ; Fredj-Reygrobellet *et al.*, 1987) et augmente le potentiel régénératif de ce tissu.

L'action de ces facteurs de croissance pourrait également être invoqué lors de la régénération du foie (Kan *et al.*, 1989), des nerfs périphériques (Cuevas *et al.*, 1988 ; Danielsen *et al.*, 1988 ; Cordeiro *et al.*, 1989) ou du membre de pleurodèle (Gospodarowicz *et Mescher*, 1981 ; Boilly *et al.*, soumis ; Hondermarck and Boilly, 1990).

4 : Croissance tumorale

Le rôle de ces facteurs de croissance dans le développement tumoral n'est pas vraiment défini. Il n'existe pas de corrélation apparente entre l'expression des FGF acide et basique et l'effet tumorigène car des transfections de DNA complémentaire de FGF acide et basique ne changent pas le phénotype des cellules transfectées (Blam *et al.*, 1989 ; Jaye *et al.*, 1988). Cependant ces résultats suggèrent que les FGFs acide et basique n'agissent pas de manière autocrine ; par contre le rôle paracrine pourrait être invoqué dans la transformation de cellules voisines car il a été montré que le FGF basique peut induire la croissance de lignées cellulaires non transformées dans des cultures en agar-mou (Rizzino *et al.*, 1986).

Par ailleurs, les autres membres de la famille des FGFs (*int-2*, *hst / K-fgf*, FGF 5), sont non seulement présents dans les tissus embryonnaires mais ils sont également détectés dans les tumeurs et pourraient être alors les formes de FGFs responsables de la tumorigénicité. Ces oncogènes possèdent un peptide "signal" permettant la sécrétion du produit de traduction et pourraient transformer les cellules par voie paracrine ou autocrine. Cette hypothèse est corrélée par l'obtention d'un phénotype cellulaire transformé après adjonction d'un peptide "signal" au niveau des FGFs acide et basique (Blam *et al.*, 1989).

MATERIEL et METHODES

I : Matériel biologique

Les *Nereis diversicolor* O.F. Müller (annélides polychètes marines) ont été récoltées près de Dunkerque (Grand Fort Philippe, Mer du Nord).

Au laboratoire, ces vers marins sont soit gardés à 15°C dans des aquariums dont l'eau de mer est oxygénée, soit congelés dans l'azote liquide puis stockés à -70°C. L'état génital des animaux peut être déterminé après examen, au microscope photonique, d'une ponction intracoelomique.

Pour l'extraction des nHBGFs, nous avons utilisé le matériel biologique congelé.

II : Méthodes

A : Méthodes de purification et de caractérisation des nHBGFs

1 : Purification des nHBGFs

1.1 : Broyage et extraction.

Toutes les étapes sont effectuées à 4°C. 500 g de néréis sont broyés à l'aide d'un mixer à grille. 500 ml de tampon phosphate à 100 mM, pH 7,5, contenant 250 mM de sulfate d'ammonium et 5 mM d'EDTA sont ajoutés au broyat de néréis correspondant à environ 3000 individus. L'ensemble est à nouveau homogénéisé par un mixer (Polytron). Une extraction acide des protéines est ensuite effectuée pendant 2 heures, à pH 4,5, en utilisant une solution HCl 6N. L'extrait est alors centrifugé à 11000g pendant 60 minutes. Le surnageant est, à ce terme, ramené à pH 7,5 à l'aide d'une solution NaOH 6N puis soumis à deux précipitations successives par le sulfate d'ammonium.

La première précipitation est réalisée, pendant 50 minutes, par adjonction de 200 g / l de sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé à 11000 g pendant 30 minutes. La seconde précipitation est effectuée pendant 12 heures à 4°C en rajoutant au surnageant 300 g / l de sulfate d'ammonium. Le culot obtenu est repris dans 200 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5. Afin d'éliminer le sulfate d'ammonium présent, cette solution est dialysée contre 20 volumes de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 contenant 5 mM EDTA renouvelés quatre fois en 24 heures

puis une dernière dialyse est effectuée avec le tampon précité contenant 0,5 M NaCl. La fraction obtenue est appelée extrait brut.

1.2 : Purification par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose

1.2.1 : Préparation de la colonne

4 grammes d'héparine-Sepharose CL6B (Pharmacia) sont mis en présence de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 contenant 3 M NaCl. Après gonflement du gel, celui-ci est dégazé puis introduit dans une colonne (XK 16 / 26, Pharmacia). Le gel est ensuite prééquilibré, pendant 12 heures, par du tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 contenant 0,5 M NaCl à un débit de 1 ml par minute.

1.2.2 : Chromatographie d'affinité

Lorsque le gel est équilibré, l'extrait brut est passé sur la colonne à un débit de 0,7 ml / mn. Le rinçage est réalisé par le même tampon que celui utilisé lors de la prééquilibration jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm devienne négligeable. Les protéines, plus ou moins affines pour l'héparine, sont alors éluées à un débit de 0,7 ml / mn par un gradient linéaire de 0,5 à 2 M en NaCl. Des fractions de 2 ml sont recueillies dans des tubes à hémolyse préalablement siliconés. Chaque fraction est testée, d'une part, pour apprécier sa capacité à stimuler la prolifération des cellules fibroblastiques et, d'autre part, par immunodétection, comme cela sera décrit dans les paragraphes 3 et 4.

1.3 : Chromatographie d'échange d'ions.

Les fractions, contenant l'activité mitogène, éluées par 1,2 M NaCl en chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose sont regroupées. Cette fraction est ensuite dessalée par dialyse-concentration avec des membranes ProdiMem (Bioblock), possédant un seuil de coupure de 10 kDa, contre du tampon phosphate 50 mM, pH 6,8. La solution dessalée est ensuite fractionnée par FPLC sur une colonne échangeuse de cations Mono-S HR 5 / 5 (Pharmacia). Les molécules retenues sur la colonne sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl avec un débit de 1 ml / mn. L'éluat est recueilli par fractions de 1 ml dans des tubes à

hémolyse siliconés. Comme pour le fractionnement précédent, une aliquote de chaque fraction est utilisée en vue d'apprécier à la fois sa capacité mitogène et sa parenté immunologique avec des FGFs de vertébrés.

1.4 : Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Les fractions biologiquement actives, issues de la chromatographie d'échange d'ions, sont regroupées puis séparées par RP-HPLC sur une colonne de type C4 (Vydak). L'injection de la fraction est réalisée en mode isocratique dans l'eau-TFA 0,1%. L'élution des molécules est ensuite effectuée par des gradients préétablis sur moniteur (Waters). Un premier gradient linéaire de 0 à 60% d'acétonitrile est réalisé pendant 60 minutes. Celui-ci est ensuite suivi d'un second gradient de 60% à 100% d'acétonitrile en 30 minutes, auquel succède un passage en isocratique à 100% d'acétonitrile afin de laver la colonne. A ce terme, la colonne repasse en mode isocratique dans l'eau-TFA 0,1%.

2 : Dosage des protéines

Les quantités de protéines présentes ont été mesurées par la technique de Bradford (1976). Les mesures sont effectuées à 595 nm. La gamme étalon permettant la quantification est réalisée par utilisation de concentration croissante de sérum albumine bovine (SAB) (Sigma).

3 : Test de mitogénicité

La méthode décrite par Plouët *et al.* (1984) permet l'appréciation du potentiel mitogène par l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée et donc de déterminer l'aptitude de certaines molécules à stimuler la prolifération de fibroblastes de poumon du hamster chinois (ATCC CCL39).

Les cellules sont repiquées dans des plaques à 24 puits (Costar), à raison de $4 \cdot 10^4$ cellules par puits, dans 0,5 ml de milieu de culture composé de milieu minimum essentiel (MEM, Gibco), contenant 10% de serum de veau foetal (SVF) (IBF), 1 mM de glutamine, 100 U / ml de pénicilline (Eurobio), 0,1 mg / ml de streptomycine (Eurobio) et 0,1 mg / ml de fungizone (Squibb). Les cellules sont mises en incubation à 37°C en atmosphère humide

enrichie par 5% de CO₂. A confluence, le milieu de culture contenant 10% de SVF est éliminé, puis remplacé par 0,5 ml du milieu de culture dépourvu de sérum. Vingt quatre heures après, les différentes fractions sont ajoutées au milieu de culture pendant 20 heures, avec ou sans 2 µg / ml d'héparine. Les cellules sont incubées durant 4 heures avec de la méthyl-thymidine tritiée (A.S. : 1 Ci / millimole) (Oris, France) à raison de 1 µCi par puits. Le milieu est ensuite aspiré, puis les cellules sont fixées au fond du puits par de l'acide trichloroacétique à 5%, à 4°C, pendant 45 minutes. Elles sont ensuite rincées à l'eau courante, séchées puis lysées par 0,5 ml d'une solution de soude 0,3 M afin de libérer leur DNA. L'incorporation de méthyl-thymidine tritiée dans le DNA est alors mesurée au compteur à scintillation liquide (LKB Wallack) par transfert du contenu des puits dans des piluliers où est ajouté du liquide scintillant Ready Safe (Beckman). Dans ces études, chaque fraction est testée en triple.

4 : Immunodétection

Ce test basé sur une technique immunoenzymatique de type ELISA est réalisé sur des plaques souples de 96 puits (Falcon), selon la technique mise au point par Engvall et Perlmann (1971).

50 µl de chaque fraction sont ajoutés à chaque puits. Les antigènes présents sont adsorbés pendant 2 heures à température ambiante puis, toute la nuit, à 4°C. Chaque puits est ensuite saturé par du PBS contenant 2% de SAB pendant 2 heures à température ambiante puis rincé avec du PBS contenant 0,1% de SAB et 0,05% de Tween 20. Tous les puits sont incubés avec le premier anticorps pendant une nuit à 4°C. Les anticorps utilisés dans le cadre de notre étude sont respectivement l'anticorps anti-FGF acide de bovin (R&D System) utilisé à la dilution de 1 / 4000e et l'anticorps anti-FGF basique de bovin (R&D System) dilué au 1 / 2000e. La plaque multipuits est rincée 6 fois par du PBS contenant 0,1% de SAB et 0,05% de Tween 20 avant de recevoir le second anticorps, en l'occurrence l'anticorps anti-lapin biotynilé (Amersham) dilué au 1 / 1000e. L'incubation est alors réalisée pendant 3 heures, à température ambiante. Après le rinçage, un complexe streptavidine couplé à la peroxydase (Amersham) est ajouté au 1 / 750e dans chaque puits, pendant 45 minutes, à température ambiante. Après 6 lavages, la révélation des plaques est obtenue en utilisant un tampon citrate,

pH 5,5. Ce dernier contient, pour 25 ml, 9 mg d'orthophényldiamine (OPD, Sigma) et 10 μ l de peroxyde d'hydrogène 10 volumes.

5 : Electrophorèse

5.1 : Electrophorèse en milieu dénaturant

5.1.1 : Electrophorèse

Le suivi électrophorétique des fractions possédant une activité mitogène au cours des différents fractionnements a été réalisé en milieu dénaturant par SDS-PAGE sur des gels à 15 ou 17% d'acrylamide suivant le protocole établi par Laemmli (1970). Les échantillons, composés des fractions à tester mélangées au tampon de reprise de Laemmli, sont traités pendant 3 minutes à 100°C puis sont déposés sur le gel. La migration s'effectue sous ampérage constant (20 mA) jusqu'à disparition complète du front de migration visualisé par le bleu de bromophénol. La masse moléculaire apparente est, par la suite estimée par rapport à des protéines de poids moléculaires connus. Ces polypeptides témoins sont : la phosphorylase B (94 kDa), l'albumine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur de trypsine (20.1 kDa) et l'alpha lactalbumine (14.4 kDa).

5.1.2 : détection des protéines.

La détection des protéines est réalisée selon la technique de coloration à l'argent mise au point par Merrill (1981). Les molécules, après migration électrophorétique, sont fixées dans le gel par une solution aqueuse composée à 50% de méthanol (Merck) et à 12% d'acide acétique. Le SDS est ensuite éliminé par bains successifs dans une solution d'éthanol 10% et d'acide acétique 5%. Les étapes suivantes sont effectuées à l'obscurité. Celles-ci débutent par un bain de 5 minutes avec une solution au bichromate de potassium (3,4 mM) contenant de l'acide nitrique (3,2 mM final). Celui-ci est suivi d'un second bain avec une solution de nitrate d'argent (1,2 mM) pendant 30 minutes. A ce terme, la révélation est effectuée par un mélange de carbonate de sodium (0,28 M) et de formaldéhyde (1 ml / l) (Merck).

5.2 : Isoélectrophorèse.

L'isoélectrofocalisation en milieu natif a été réalisée selon le procédé mis au point par Robertson et *al.*, 1987. Un système minigel vertical (minicuve double Hoeffer) a été utilisé pour cette technique. Les gels d'une épaisseur de 1,5 mm ont été coulés en utilisant le mélange suivant : 7 ml d'eau, 2 ml d'une solution composée de 30% d'acrylamide (P / V) et de 1% de bis-acrylamide (P / V), 2,4 ml d'une solution à 50% de glycérol (V / V) et 0,6 ml d'ampholytes dont le pH est compris entre 3 et 10. Ces composants sont mélangés, dégazés puis 50 µl d'une solution à 10% de persulfate d'ammonium et 20 µl de TEMED sont ajoutés. Les gels sont coulés puis polymérisés en une heure environ.

La solution cathodique se compose de 25 mM NaOH et l'anode est immergée dans une solution de 20 mM d'acide acétique. Ces solutions sont au préalable refroidies à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Les protéines standards (Broad pI calibration Kit, Pharmacia) et les échantillons sont mélangés avec un volume égal d'une solution aqueuse contenant 60% de glycérol (V / V) et 4% (V / V) d'ampholytes.

L'électrophorèse est ensuite réalisée à température ambiante pendant 110 minutes à 200 volts (voltage constant) puis à 400 volts pendant 110 minutes. Les gels sont placés dans une solution d'acide trichloroacétique à 10% pendant une heure et enfin immergés dans des bains successifs d'acide trichloroacétique à 1% dans l'eau pendant 4 heures. Les protéines sont par la suite détectées par la méthode de coloration à l'argent de Merrill précédemment décrite.

6 : Immunocaractérisation

6.1 : Western Blot

Après migration électrophorétique, le gel de polyacrylamide est équilibré pendant 30 minutes dans du tampon de transfert composé de Tris (25 mM), de glycine (190 mM), de SDS 0,01% (P / V) et de méthanol 15% (V / V). Une membrane PVDF de type Immobilon P (Millipore) est découpée à la taille du gel. Cette membrane est activée par du méthanol (Merck), rincée plusieurs fois à l'eau milli Q puis mise en incubation dans du tampon de transfert pendant 10 minutes. Le gel est ensuite placé sur la membrane. L'ensemble est introduit dans une cuve

de transfert (Bio-Rad). Les protéines sont alors électrotransférées sur la membrane à voltage constant (45 V), pendant 5 heures, puis détectées par une solution à 1% d'amido-Black (Bioblock) dans une solution aqueuse comprenant 45% de méthanol et 12% d'acide acétique.

6.2 : Immunodétection

La membrane d'Immobilon P est ensuite lavée 3 fois pendant 15 minutes dans un tampon 20 mM phosphate, pH 7,4 contenant 190 mM NaCl (PBS) et 0,05% Tween 20 (Tampon A) puis découpée en fonction des dépôts. Les sites aspécifiques sont saturés par du PBS contenant 2% de SAB pendant 12 heures à 4°C. La membrane est rincée par du tampon A, puis mise en incubation pendant 5 heures à température ambiante avec l'anticorps anti-FGF acide dilué au 1 / 4000e ou, avec l'anticorps anti-FGF basique dilué au 1 / 2000e dans du tampon B (PBS contenant 0.1% de SAB). Une seconde incubation de 12 heures à 4°C est réalisée, avec un anticorps anti-lapin biotynilé dilué au 1 / 200e dans du tampon B, après lavage de la membrane avec du tampon A. Un complexe streptavidine-peroxydase (Amersham) dilué au 1 / 750e dans du tampon B est enfin ajouté pendant 2 heures à température ambiante, après élimination de l'anticorps secondaire et rinçage de la membrane par du tampon A. La membrane de transfert est récupérée, puis la réaction antigène-anticorps est révélée par une solution contenant 3 ml de 4-chloro-1-naphtol à 0,3% dans le méthanol ; 10 µl de peroxyde d'hydrogène 30% et 50 ml de PBS.

7 : Production d'anticorps dirigés contre des nHBGFs

7.1 : Immunisation

Des souris Balb/c ont été immunisées contre des extraits de prostomium et de pygidium purifiés par chromatographie sur héparine-Sepharose. Ces extraits correspondent aux fractions éluées par 1,15 et 2 M NaCl dans du tampon phosphate 50mM, pH 7,4. Les fractions obtenues sont, au préalable, additionnées d'un volume égal d'adjuvant de Freund complet puis injectées tous les 15 jours. La première injection est réalisée par voie sous-cutanée, les suivantes par voie intrapéritonéale. Trois jours avant le prélèvement de la rate, une solution contenant les antigènes et de l'adjuvant de Freund incomplet est injectée. La qualité de

l'immunisation des souris est appréciée par test immunoenzymatique (ELISA) effectué avec du sérum dilué au 1 /10, 1 / 100, 1 / 1000, 1 /10000e et dont le principe a été décrit dans le paragraphe 4.

7.2 : La fusion cellulaire

Des lymphocytes spléniques de souris Balb/c immunisées sont fusionnés avec des cellules de myélome SP₂O / Ag 14 en présence de polyéthylène glycol (PEG) selon la technique de Kohler et Milstein (1975). Les hybridomes sont séparés des autres types cellulaires grâce à l'utilisation d'un milieu de culture sélectif HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine). Les cellules de myélome SP₂O / Ag14 sont déficientes en Hypoxanthine Guanine Ribosyl Transférase (HGPRT) et donc incapables d'incorporer l'hypoxanthine et la thymidine. Ces cellules meurent en quelques jours. Les lymphocytes sont éliminés par leur incapacité naturelle à se multiplier en culture. Les hybridomes, possédant d'une part la HGPRT des lymphocytes et, d'autre part, la faculté de se multiplier propre aux cellules de myélome, sont seuls à survivre en milieu HAT. Lorsque les puits témoins renfermant des cellules SP₂O non fusionnées meurent en milieu HAT, l'aminoptérine est éliminée en remplaçant le milieu initial par du milieu HT puis par du DMEM contenant 10% de SVF.

7.3 : Sélection des hybridomes

La sélection est réalisée à partir de surnageant de culture, placé en présence de FGFs de vertébrés et de fractions contenant des HBGFs de néréidiens à la fois par immunodétection (ELISA) et immunocaractérisation (Western Blot) dont les principes sont décrits respectivement dans les paragraphes 4 et 6. Il est à noter, dans ce cas, que l'anticorps secondaire est soit un anticorps anti-souris biotynilé (Amersham) dilué au 1 / 500e, soit un anticorps anti-immunoglobulines G+M de souris (Nordic) couplé à la peroxydase et dilué au 1 / 10000e dans le tampon PBS.

7.4 : Le clonage

Le clonage est réalisé par la technique de la dilution limite qui a pour but d'obtenir statistiquement une cellule par puits. Cette méthode permet l'établissement d'une lignée à partir d'une seule cellule produisant un type unique d'anticorps. Lorsque les cellules sont à confluence, chaque surnageant de culture est testé par ELISA. Les hybridomes intéressants sont maintenus en culture expansive jusqu'à congélation et les surnageants de culture stockés en vue d'une utilisation immunohistochimique.

8 : Analyse immunohistologique

Le prostomium, partie antérieure des néreïdiens, et l'extrémité postérieure comprenant la zone de prolifération et le pygidium sont obtenus par dissection sous une loupe binoculaire. Les pièces sont fixées au Bouin Hollande sublimé sans acide acétique, déshydratées puis incluses dans de la cytoparaffine. Des coupes sériées d'une épaisseur de 7 μm sont réalisées au microtome (Reichert) et déposées sur une lame de verre chauffée, préalablement humidifiée. Les lames sont séchées, déparaffinées par un bain de toluène durant 5 minutes, réhydratées par des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'alcool iodé et enfin décolorées dans du métabisulfite de sodium à 2%. Les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées par incubation des lames dans du méthanol absolu contenant 0,3% de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes. Les coupes sériées sont à nouveau réhydratées, saturées avec du sérum de lapin préimmun dilué au 1 / 10e dans du tampon Coons, pH 7,2, durant 30 minutes, puis mises en incubation pendant une nuit à 4°C avec les surnageants de culture à tester, lavées puis incubées avec un antisérum de lapin anti-immunoglobulines de souris biotynilé (Amersham) dilué au 1 / 100e dans le Coons, pendant 3 heures, à température ambiante. Enfin, les coupes sont à nouveau rincées puis incubées en présence d'un complexe streptavidine-peroxydase dilué au 1 / 100e dans le Coons durant 40 minutes. La révélation est réalisée, à l'obscurité, à l'aide de diaminobenzidine (DAB) (Sigma) solubilisée dans du tampon Tris / HCl, pH 7,6 et de peroxyde d'hydrogène. Elle est arrêtée par de l'eau distillée. Les coupes sont alors montées dans la glycérine pour l'observation.

B : Méthodes pour l'étude des récepteurs

1: Obtention du FGF basique bovin

Le FGF basique bovin a été purifié à partir de cerveaux de bovins de la même manière que les nHBGFs (chromatographie sur héparine-Sepharose et par échange de cations), puis stocké dans l'azote liquide avant son utilisation.

2 : Radioiodination du FGF basique bovin

L'iodination du FGF basique a été réalisée selon une modification de la méthode à la chloramine T (Hunter et Greenwood, 1962). 3 µg de FGF basique dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,3 contenant 0,1% de polyéthylène glycol sont incubés à température ambiante pendant 1 minute avec 1 mCi de NaI¹²⁵ et 20 µM de chloramine T. La réaction est, par la suite, arrêtée par adjonction de 100 mM de N-acétyl tyrosine. L'iode libre est éliminé par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose et le I¹²⁵- FGF basique stocké à 4°C. Par ailleurs, l'activité mitogène du FGF radiomarqué est contrôlée par test *in vitro* sur des fibroblastes de poumons de hamster chinois.

3 : Mesure du rendement et de l'activité spécifique

Le rendement de l'iodination est obtenu en faisant le rapport entre la totalité du nombre de coups par minute (cpm) des polypeptides radioactifs et la radioactivité totale. Le nombre de cpm total pour les protéines est estimé par l'addition, d'une part, de la radioactivité retenue sur héparine-Sepharose et , d'autre part, par la radioactivité des polypeptides non retenus sur héparine et séparés de l'iode libre par fractionnement en gel filtration sur une colonne PD10 dont le seuil de tamassage moléculaire est de 10 kDa (Pharmacia). La radioactivité de l'iode libre est également définie au cours du fractionnement sur PD10.

L'activité spécifique exprimée en µCi / µg est déterminée en faisant le rapport de la radioactivité présente sur la protéine à la quantité totale de protéines

4 : préparation de membranes cellulaires de *Nereis diversicolor*

Les membranes de néréidiens sont préparées selon la méthode mise au point par Ledoux et al. (1989) avec, cependant, quelques modifications. De jeunes néréis sont homogénéisées dans du tampon A (20 mM HEPES, pH 7,4, 5mM EDTA, 0,56 M NaCl, 1 µg / ml de leupeptin, 1 µg / ml de pepstatine, 5 kallikrein inhibitor units / ml d'aprotinine et 0,1 mM de PMSF) (Sigma) contenant 0,3 M de sucrose. L'homogénat est centrifugé à 1000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à nouveau à 40000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot obtenu est homogénéisé dans un volume de tampon A contenant 3 M MgCl₂ puis mis en incubation à 4°C pendant 15 minutes. Une nouvelle centrifugation de 40000 g pendant 30 minutes à 4°C est réalisée après adjonction de 5 volumes de tampon B (tampon A sans EDTA et contenant 1 mM MgCl₂ et 1 mM CaCl₂). Le culot de membranes obtenu est ensuite lavé deux fois dans du tampon B. La concentration protéique, déterminée par la méthode de Bradford (1976), est ajustée à 1 mg / ml.

5 : Etudes des récepteurs

5.1 : Compétitions et analyses de Scatchard

Les tests de compétition ont été réalisés selon la méthode de Courty et al. (1988). 30 µg de membranes cellulaires de néréis sont incubés dans 500 µl de tampon B contenant 0,5% de SAB en présence de 23 pM de I¹²⁵- FGF basique pendant 45 minutes à 4°C. De plus, d'autres incubations sont réalisées en présence de la même quantité de ligand radiomarqué et de quantités croissantes de FGF basique froid variant de 10⁻¹¹ à 23 nM obtenues par dilutions limites. Les membranes sont récupérées par centrifugation (4000 g, 15 min, 4°C) et le surnageant est éliminé par aspiration. La radioactivité fixée sur les membranes est alors mesurée à l'aide d'un compteur Gamma (LKB-Wallack). Les données sont analysées au moyen du programme LIGAND (Munson et Rodbard, 1980). Par ailleurs, des tests de compétition hétérologues ont été réalisés dans les mêmes conditions, d'une part avec la fraction mitogène éluée en 1,2 M NaCl (fraction 1,2M HS) sur la colonne d'héparine-Sepharose et, d'autre part avec celle éluée en présence de 0,7 M NaCl obtenue par chromatographie d'échange de cations (fraction 0,7M MS).

5.2 : Optimisation des conditions de fixation

5.2.1 : Etude de la cinétique de fixation

23 pM de I^{125} - FGF basique sont incubés en présence de 30 μ g de membranes, comme précédemment décrit, pendant 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80 minutes. Lorsque l'équilibre est atteint, dans la moitié des tubes, 23 nM de FGF basique non radiomarké sont ajoutés au mélange réactionnel pour l'étude de la cinétique de dissociation et les membranes sont récupérées à des temps d'incubation différents (10, 20, 30 et 40 minutes). La radioactivité fixée sur les membranes est alors mesurée au compteur Gamma (Wallack LKB).

5.2.2 : Etude de la fixation en fonction de la concentration membranaire

Des concentrations croissantes de membranes variant de 5 à 100 μ g sont incubées pendant 40 minutes à 4°C avec une quantité constante (23 pM) de FGF basique radiomarké puis les membranes sont récupérées (4000 g, 10 min., 4°C) et la radioactivité fixée mesurée. Par ailleurs, un déplacement obtenu par un excès de 1000 fois la molarité de FGF iodé est réalisé afin de déterminer la proportion de fixation non-spécifique. La fixation spécifique sur les membranes de néréidiens a alors été déterminée en soustrayant à la fixation totale, la fixation non-spécifique.

6 : Caractérisation des sites par pontage moléculaire

Les membranes (500 μ g de protéines membranaires) de néréis sont incubés, pendant 50 minutes, à 4°C dans du tampon B avec 1,2 nM de I^{125} - FGF basique avec, ou non, un excès de FGF non radiomarké équivalent à 500 fois la molarité du FGF iodé, d'une part, et, d'autre part, avec la fraction contenant l'activité mitogène obtenue par chromatographie sur héparine-Sepharose (fraction 1,2M HS) ou par chromatographie d'échange d'ions (fraction 0,7M MS). La réaction de pontage moléculaire est initiée par addition de 0,1 mM de disuccinimidylsubérate (DSS) (Pierce Chemical Co). Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la réaction est arrêtée par 10 mM final de méthylamine. Les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon B, centrifugées puis solubilisées dans un tampon Tris / HCl 70 mM, pH 6,8, 10% de glycérol, 1% de SDS durant 15 minutes à 37°C. Une dernière centrifugation est réalisée

et les surnageants sont récupérés afin d'être analysés par SDS-PAGE sur des gels en gradient (5-10% d'acrylamide) selon le protocole établi par Laemmli (1970). Après migration électrophorétique, les gels sont séchés puis autoradiographiés à -70°C avec des films Kodak Xomat R sous écrans renforceurs.

7 : Etudes autoradiographiques sur coupes

Des parties postérieures de néréis sont prélevées puis incluses dans du cryogel (Reichert). Les pièces sont ensuite coupées à l'aide d'un cryostat et les coupes déposées sur une lame de verre qui est trempée dans du PBS pendant 15 minutes puis dans du PBS 3M MgCl₂ pendant 5 minutes à température ambiante. Après 3 lavages dans le PBS, une quantité de 1 nM de I¹²⁵-FGF basique dans du tampon B avec ou sans un excès de FGF basique correspondant à 500 fois celle du FGF basique iodé, est mise en contact des coupes sériées pendant 60 minutes, à température ambiante. Après l'incubation, les lames sont rincées 6 fois par du PBS puis séchées une nuit à 37°C. En chambre noire, l'émulsion photographique K2 Ilford est diluée au demi dans de l'eau milliQ puis portée à la température de 45°C. Les lames sont plongées lentement dans l'émulsion, séchées pendant une heure puis stockées à 4°C. L'ensemble des étapes suivantes est réalisé à 15°C. Les lames sont ensuite développées par du D19B (Kodak) pendant 2 minutes 50 puis rincées brièvement à l'eau. Les coupes sont ensuite fixées par de l'hyposulfite de sodium à 30% (Kodak) pendant 5 minutes, rincées à l'eau bi-permutée et colorées pendant 5 minutes avec du rouge nucléaire. Les lames sont enfin rincées avant d'être montées dans le XAM (BDH).

RESULTATS

CHAPITRE I

**MISE en EVIDENCE, PURIFICATION et
CARACTERISATION de FACTEURS de CROISSANCE
APPARENTES aux FGFs (nHBGFs) chez
Nereis diversicolor O.F. Müller**

I : Introduction

La recherche de molécules affines pour l'héparine pouvant stimuler la prolifération de cellules en culture a été réalisée à partir de broyat de *Nereis diversicolor* réparties en lot de 3000 individus environ correspondant à un poids frais de 500 grammes. Après plusieurs précipitations au sulfate d'ammonium, centrifugations et dialyses suivant le protocole décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes", l'extrait obtenu est purifié successivement par chromatographie sur héparine-Sepharose, chromatographie d'échange de cations et enfin chromatographie liquide haute performance en phase inverse. A chaque étape de purification nous avons apprécié l'activité biologique de chacune des fractions, leur comportement électrophorétique et leur immunoréactivité en présence d'anticorps dirigés envers les FGF acide et basique de bovin.

II : Résultats

A : Purification par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose

Les protéines de l'extrait de néréis retenues sur la colonne d'héparine-Sepharose sont éluées en présence d'un gradient 0,5-2 M en NaCl (figure 2A). Dans ces conditions, la plupart des molécules affines pour l'héparine sont éluées entre 0,6 et 1 M en NaCl.

1 : Test *in vitro* d'activité mitogène sur des cellules de vertébrés

Les différentes fractions obtenues après chromatographie sur héparine-Sepharose sont ajoutées au milieu de culture de cellules de poumon de hamster chinois (ATCC CCL39) afin d'évaluer leur aptitude à stimuler la prolifération de ces cellules. Le test d'incorporation de thymidine tritiée *in vitro* nous a permis de constater que la fraction présentant l'activité mitogène la plus importante est éluee en présence de 1,2 M en NaCl (figure 2A). Cependant cette activité n'est décelable qu'en présence d'héparine (2 µg / ml de milieu de culture). Nous constatons, par ailleurs, que la fraction à activité mitogène la plus importante ne correspond pas au pic protéique majeur élué de la colonne (figure 2A).

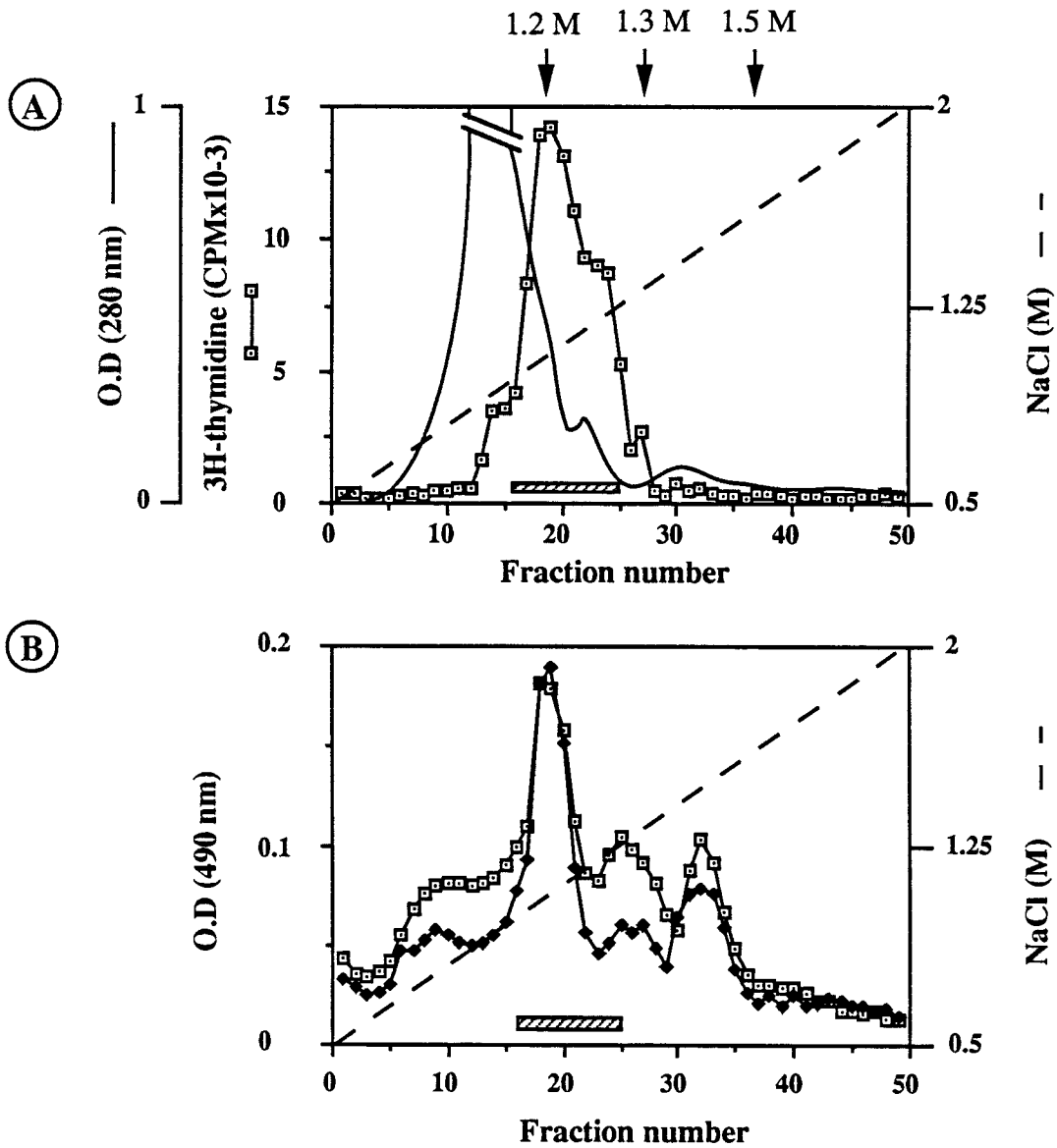


Figure 2 : Chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose d'un extrait provenant de 500 g de *Nereis diversicolor*.

A : Profil d'élution à 280 nm et test d'activité mitogène des protéines retenues sur la colonne

B : Immunodétection des molécules apparentées aux FGFs

- par un anticorps anti-FGF basique de bovin (□—□)

- par un anticorps anti-FGF acide de bovin (◆—◆)

2 : Immunodétection des fractions éluées sur héparine-Sepharose

Les différentes fractions éluées par chromatographie sur héparine-Sepharose présentent lors de tests de type ELISA un profil d'immunodétection en présence d'un anticorps anti-FGF acide comparable à celui obtenu après utilisation d'un anticorps anti-FGF basique (figure 2B). Les fractions éluées aux environs de 1,2 M NaCl présentent le taux le plus important de molécules immunoréactives envers les deux anticorps utilisés. Deux autres pics élués en 1,3 M et 1,5 M NaCl possèdent une immunoréactivité plus importante envers l'anticorps anti-FGF basique qu'envers l'anticorps anti-FGF acide de bovin.

Il existe donc une concordance certaine entre le pic d'activité mitogène (figure 2A) et le pic immunodéTECTÉ (figure 2B) correspondant tous deux aux fractions éluées en 1,2 M NaCl environ. Par conséquent, nous avons poursuivi, dans un premier temps, notre étude uniquement au niveau de cet extrait biologiquement actif que nous avons dénommé fraction 1,2 M HS

3 : Analyse électrophorétique et immunocaractérisation par Western blot

4 µg de protéines de la fraction 1,2 M HS contenant l'activité mitogène, sont analysés par électrophorèse en condition dénaturante dans des gels à 15% en acrylamide. Après coloration à l'argent, 3 bandes protéiques majeures sont mises en évidence (figure 3, piste 1). Celles-ci possèdent respectivement un poids moléculaire apparent de 20, 18, 15 kDa. Par ailleurs, d'autres formes polypeptidiques, possédant des poids moléculaires aux environs de 90 et 70 kDa, sont également détectables. Une même quantité de protéines a été utilisée en vue d'une immunocaractérisation soit par un anticorps anti-FGF basique, soit par un anticorps anti-FGF acide. Les résultats de cette étude indiquent que ces deux anticorps reconnaissent une fraction protéique possédant un poids moléculaire proche de 20 kDa (fig. 3, piste 2 et piste 3). Enfin, parmi les protéines séparées, l'anticorps anti-FGF basique (figure 3, piste 3) reconnaît également un autre polypeptide possédant un poids moléculaire de 90 kDa.

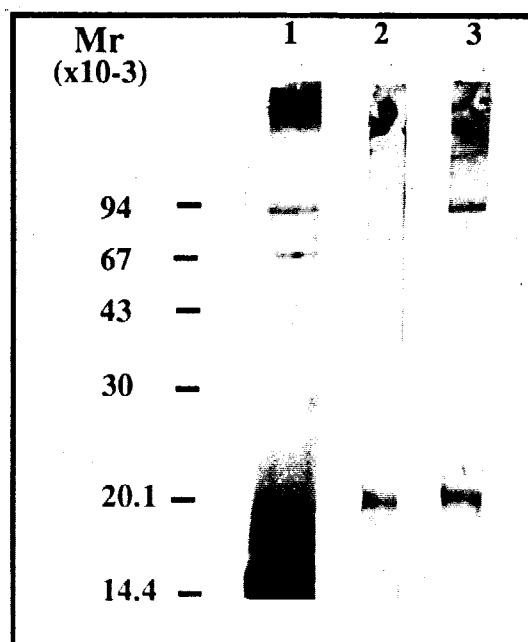


Figure 3 : Analyse électrophorétique et immunocaractérisation des polypeptides contenus dans la fraction 1.2 M HS.

-piste 1 : 4 µg de protéines sont séparés par électrophorèse sur des gels à 15% en polyacrylamide et détectés par une imprégnation à l'argent comme précédemment décrit dans le chapitre "matériel et méthodes"

-piste 2 : immunocaractérisation, après transfert sur feuille d'Immobilon P de la même quantité de protéines, en utilisant un anticorps anti-FGF acide de bovin.

-piste 3 : immunocaractérisation en utilisant un anticorps anti-FGF basique de bovin au niveau des polypeptides présents dans cette fraction.

B: Purification par chromatographie d'échange d'ions

Les résultats du fractionnement à pH 6.8 de la fraction 1.2 M HS sur une colonne Mono-S HR 5 / 5, par FPLC, sont présentés sur la figure 4.

La figure 4A indique que la fraction éluée en présence de 1.2 M NaCl lors de la chromatographie sur héparine-Sepharose n'est pas homogène. En effet, une partie du matériel n'est pas retenue sur la colonne échangeuse de cations. D'autre part, en ce qui concerne la fraction retenue, plusieurs entités protéiques sont éluées différemment en fonction de leur

Figure 4 : Chromatographie d'échange de cations de la fraction 1.2 M HS par FPLC sur une colonne Mono-S HR 5 / 5.

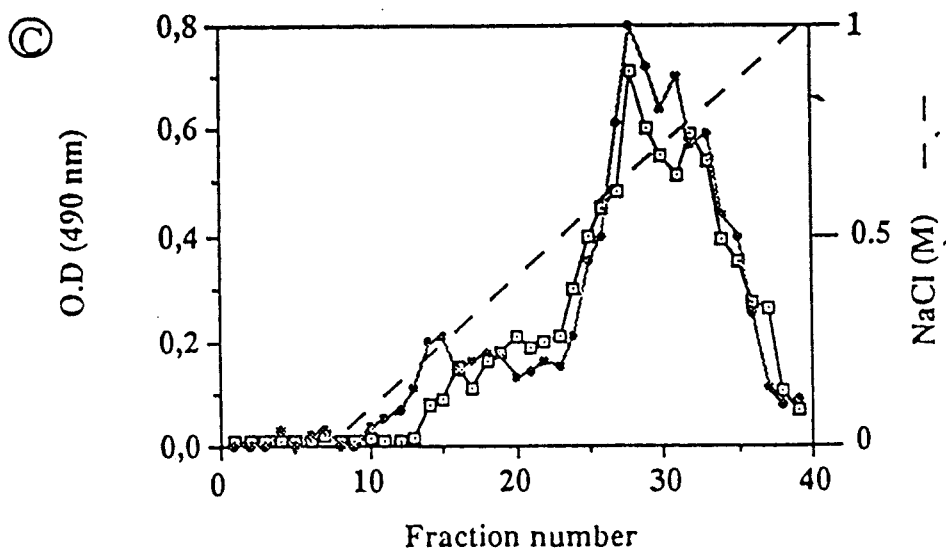
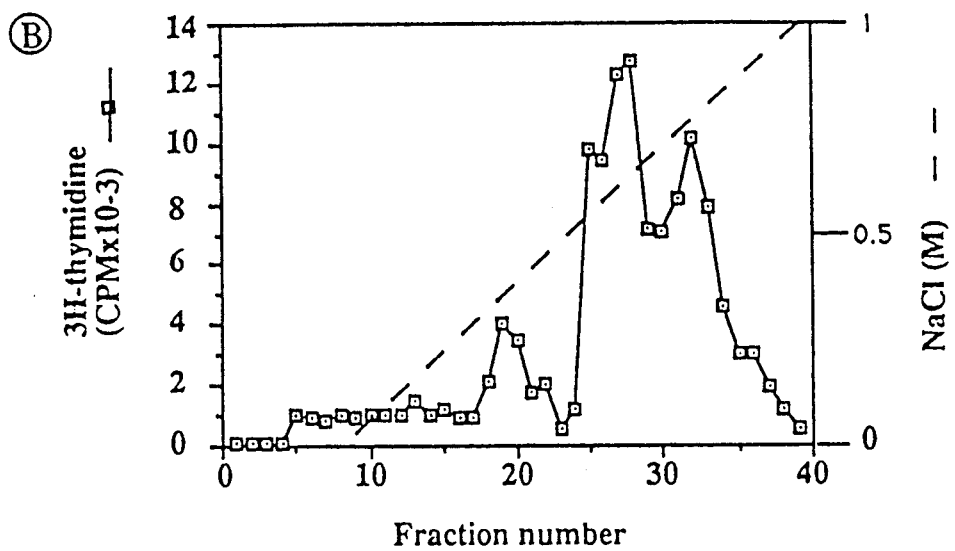
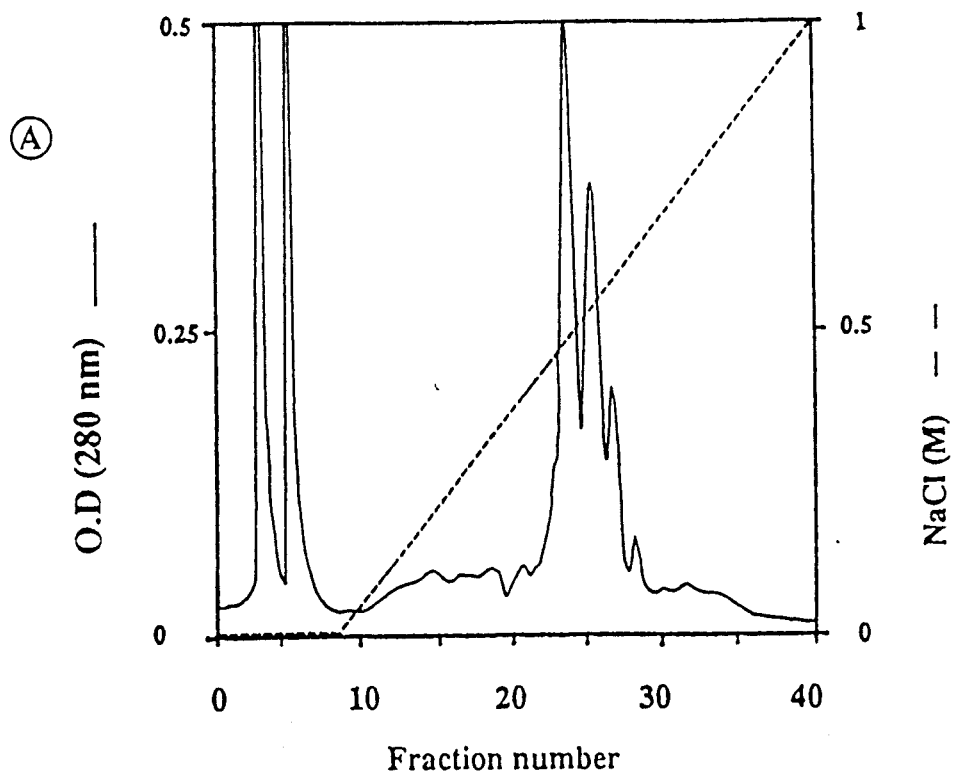
A : Profil d'élution à 280 nm

B : Test d'activité mitogène des fractions issues de la Mono-S sur les cellules CCL 39

C : Immunodétection des molécules apparentées aux FGFs

- par un anticorps anti-FGF basique de bovin (—■—)

- par un anticorps anti-FGF acide de bovin (—◆—)



degré d'interaction avec la phase solide. Quatre pics sont élués respectivement en 0,4, 0,55, 0,6 et 0,7 M NaCl.

1 : Test d'activité mitogène

Les fractions éluées par chromatographie d'échange d'ions sont éprouvées pour leur aptitude à induire l'incorporation de thymidine tritiée sur des cellules CCL 39. Les résultats représentés par la figure 4B mettent en évidence l'existence de trois pics distincts possédant une activité mitogène. Les deux pics à activités mitogènes majeures sont élués respectivement en 0,7 M NaCl (fraction 0,7 M MS) et en 0,85 M NaCl (fraction 0,85 M MS). Le troisième pic ayant une activité mitogène mineure sur CCL 39 est élué en 0,35 M NaCl. L'absorbance de ce pic à 280 nm est très faible, à l'instar de celui élué en 0,85 M NaCl et possédant une activité mitogène importante.

2: Immunodétection

Les fractions issues du fractionnement par chromatographie d'échange de cations, comme l'indique la figure 4C, possèdent des formes apparentées aux FGFs acide et basique de bovins. L'éluat en 0,7 M NaCl présente l'immunoréactivité la plus importante envers l'anticorps anti-FGF acide et aussi envers l'anticorps anti-FGF basique. Une réponse légèrement inférieure à la précédente est observée pour l'immunodétection effectuée avec les mêmes anticorps au niveau de la fraction éluée aux alentours de 0,85 M NaCl. La fraction éluée en 0,35 M NaCl et possédant une faible activité mitogène n'est pas reconnue immunologiquement par les anticorps dirigés contre les FGFs acide et basique.

3 : Analyse électrophorétique des fractions à activités mitogènes majeures

Les polypeptides contenus dans les fractions éluées en 0,7 et en 0,85 M NaCl sont analysés par électrophorèse en condition dénaturante dans des gels à 17% d'acrylamide. Après coloration à l'argent, deux polypeptides sont mis en évidence au niveau de la fraction 0,7 M MS (figure 5, piste 1). Ceux-ci possèdent des poids moléculaires respectifs proches de 20 kDa et

19 kDa. Le profil électrophorétique de la fraction 0.85 M MS (figure 5, piste 2) montre que plusieurs polypeptides différents sont présents. Ces derniers sont caractérisés par des poids moléculaires proches de : 14.4 kDa, 21 kDa et 90 kDa.

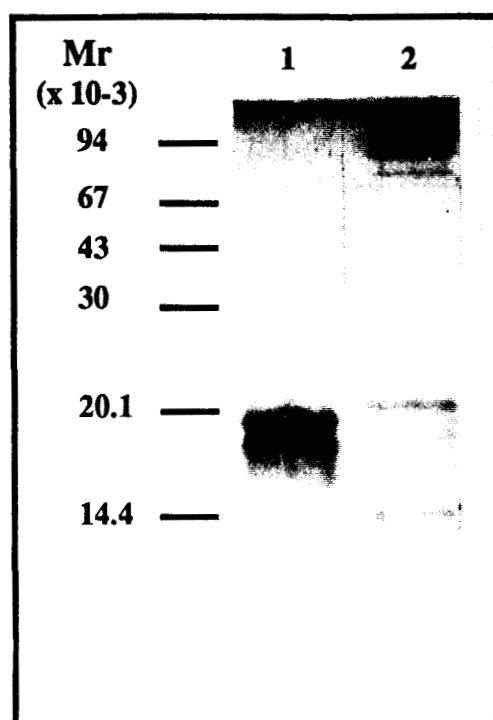


Figure 5 : Analyse électrophorétique dans des gels à 17% en acrylamide des fractions mitogènes à l'issue de la chromatographie d'échange de cations
 -piste 1 : fraction 0.7 M MS (500 ng de protéines)
 -piste 2 : fraction 0.85 M MS (dépôt d'environ 500 ng de protéines).

C : Purification par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Le fractionnement par HPLC réalisé à l'aide d'une colonne chromatographique en phase inverse de type C-4 a été effectué à partir de la fraction 0.7 M MS (figure 6). Le profil d'absorbance à 220 nm montre la présence de deux pics majeurs. Ces derniers sont élués respectivement en 32 et 34% d'acétonitrile. De plus, quatre pics mineurs absorbant à 220 nm sont respectivement élués en 7, 8, 10 et 37% d'acétonitrile.

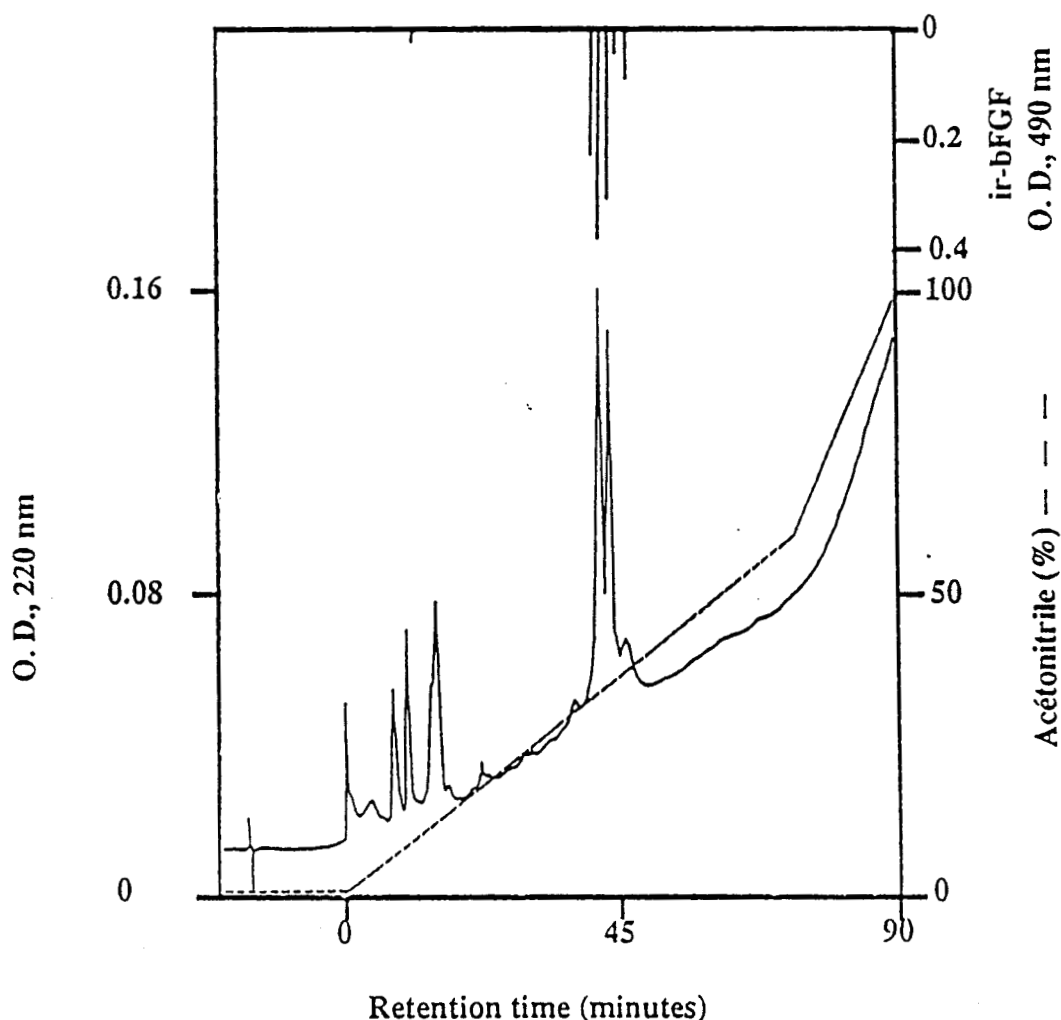


Figure 6 : Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) de la fraction 0.7 M MS.

- Profil d'élution à 220 nm. 2 ml sont injectés sur une colonne Vydack C-4. Le profil d'élution est obtenu par un gradient linéaire de 0-60% en acétonitrile dans l'eau contenant 0.1% d'acide trifluoroacétique (ligne pointillée).
- Immunodétection par un anticorps anti-FGF basique (histogramme)

1 : Immunodétection

Les fractions issues de la chromatographie liquide haute performance ont été éprouvées afin de déterminer la localisation des polypeptides apparentés aux FGFs acide et basique de bovin. Il apparaît que l'immunoréactivité envers l'anticorps anti-FGF basique est mise en évidence au niveau des deux pics majeurs élués respectivement en 32 et 34% d'acétonitrile (figure 6). Les polypeptides immunoréactifs envers un anticorps anti-FGF acide de bovin, sont localisés au niveau des deux mêmes pics majeurs (non montré).

2 : Analyse électrophorétique et immunocaractérisation

Les polypeptides contenus dans les fractions éluées en 32 et en 34% d'acétonitrile sont analysés par SDS-PAGE dans des gels à 17% en acrylamide. Après coloration à l'argent, une seule bande protéique apparaît au niveau de la fraction éluee en 32% d'acétonitrile (figure 7A, piste 1). Celle-ci possède un poids moléculaire proche de 20 kDa. De plus, ce même polypeptide est reconnu, après Western Blot, par un anticorps anti-FGF acide de bovin (figure 7B, piste 1) et par un anticorps anti-FGF basique de bovin (figure 7B, piste 2). Enfin, une forme possédant un poids moléculaire de l'ordre de 19 kDa (figure 7A, piste 2) est présente dans la fraction éluee en 34% d'acétonitrile, celle-ci présentant également la double immunoréactivité (non montré).

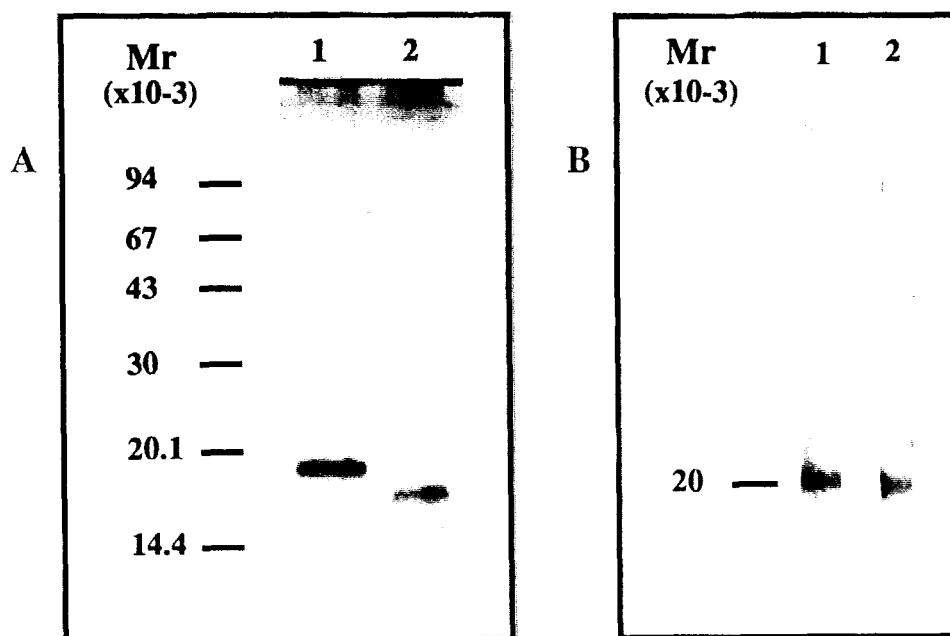


Figure 7 : Caractérisation des molécules séparées par RP-HPLC.

- A : analyse électrophorétique dans des gels à 17% d'acrylamide.
- piste 1 : fraction éluee en 32% d'acétonitrile (500 ng de protéines)
 - piste 2 : fraction éluee en 34% d'acétonitrile (500 ng de protéines)
- B : immunocaractérisation après transfert sur membrane Immobilon P de 1 µg de protéines du polypeptide éluee par 32% d'acétonitrile.
- piste 1 : avec un anticorps anti-FGF acide
 - piste 2 : avec un anticorps anti-FGF basique

3: Détermination du point isoélectrique

Les polypeptides contenus dans les fractions éluées en 32 et 34% d'acétonitrile après chromatographie liquide à haute performance en phase inverse sont soumis à l'analyse par isoélectrofocalisation. Les résultats obtenus montrent que la forme de 20 kDa possède un point isoélectrique (pI) de 6.4 environ (figure 8, piste 1) ; la forme polypeptidique de 19 kDa (figure 8, piste 2), éluée en 34% d'acétonitrile, présente également un pI de 6.4. Par ailleurs, un échantillon témoin sans protéines a été analysé dans les mêmes conditions (figure 8, piste 3) et montre que la bande située entre les pH 8.45 et 8.65 est aspécifique. Cette dernière est vraisemblablement due à une mauvaise élimination des ampholites dans cette zone de pH, phénomène probablement lié aux conditions expérimentales utilisées.

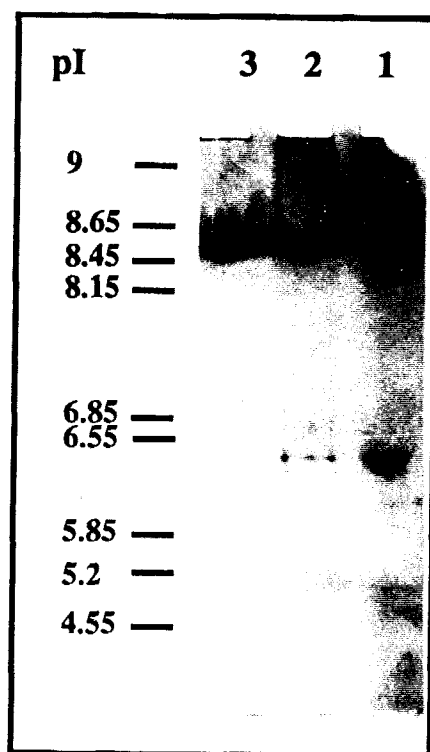


Figure 8 : Isoélectrofocalisation des polypeptides purifiés à l'issue de la RP-HPLC

- piste 1 : polypeptide de la fraction éluée en 32% d'acétonitrile
- piste 2 : polypeptide de la fraction éluée en 34% d'acétonitrile
- piste 3 : échantillon sans protéines

D : Relations entre l'effet mitogène et la quantité de protéines

Nous avons recherché si l'effet mitogène était dose dépendant. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 9. Il apparaît que les fractions 1,2 M HS et 0,7 M MS possèdent un ou des polypeptides induisant l'incorporation de thymidine tritiée au niveau des cellules de poumon de hamster Chinois (ATCC CCL 39) selon un effet-dose dépendant. La moitié de l'incorporation de thymidine tritiée (ED₅₀) est obtenue d'une part, avec environ 200 ng de protéines en ce qui concerne les polypeptides contenus dans la fraction 1,2 M HS et, d'autre part, avec 30 ng de protéines pour les polypeptides contenus dans la fraction 0,7 M MS. Cette étude a été poursuivie avec les polypeptides de la fraction 0,7 M MS séparés par RP-HPLC. Les résultats, quant à la détermination de l'ED₅₀, se sont révélés négatifs car, quelles que soient les doses ajoutées dans les puits de culture contenant les cellules, l'incorporation de thymidine tritiée était proche du bruit de fond.

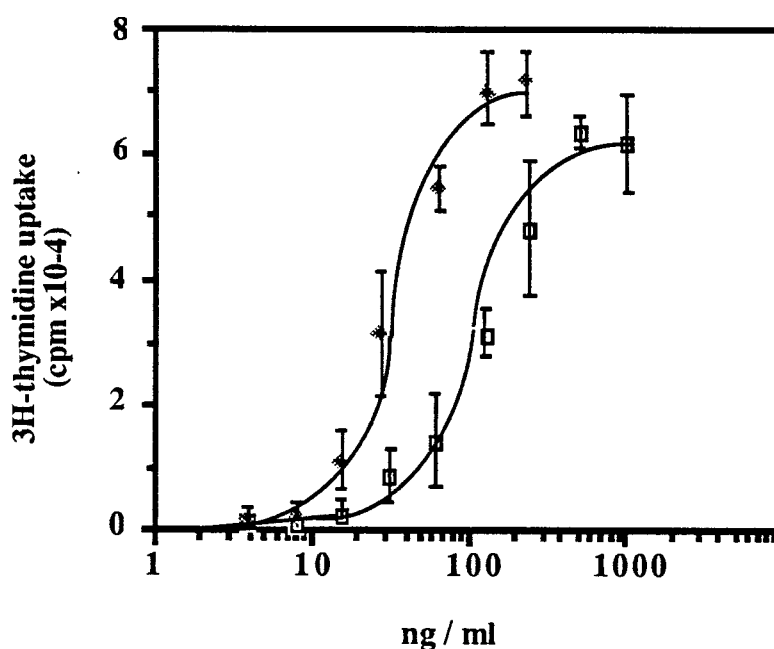


Figure 9 : Courbes dose-réponse obtenues par la mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée sur les cellules CCL 39

- dose-réponse des polypeptides contenus dans la fraction 1.2 M HS (□)
- dose-réponse des polypeptides contenus dans la fraction 0.7 M MS (♦)

E : Localisation des molécules immunoréactives

Des hybridomes ont été obtenus après la fusion entre des cellules de myelome SP₂O/Ag14 et des lymphocytes B immunisés contre les fractions 1 et 2 M NaCl après chromatographie sur héparine-Sepharose des extraits de l'extrémité postérieure (pygidium et zone de prolifération). Sur 36 surnageants de culture présentant une bonne immunoréactivité en présence des fractions 1 et 2 M en NaCl, deux surnageants ont été sélectionnés (PYA15 et PYA8C1). Ces derniers reconnaissent lors des études par "Western Blot" une bande de poids moléculaire proche de 20 kDa des fractions 1,2 M NaCl et les FGFs acide et basique de bovin.

Ces deux souches ont été clonées jusqu'à l'obtention d'anticorps monoclonaux présentant une excellente immunoréactivité, d'une part, envers les FGF acide et basique de bovin, et d'autre part, envers les nHBGFs. Dans un premier temps, nous avons sélectionné trois anticorps monoclonaux : deux anticorps issus de PYA15 que nous avons appelés PB31 et EG11 et le dernier provenant de la souche PYA8C1 a été dénommé DB1.


Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été utilisés afin de préciser la localisation des nHBGFs chez *Nereis diversicolor*. Il apparaît qu'une immunoréactivité est située au niveau de certains neurones du noyau 20 dans le cerveau, d'une part, avec l'anticorps polyclonal PYA15 (planche IA-B), et d'autre part, avec les anticorps monoclonaux DB1 (planche IC) et PB31 (planche ID). Par ailleurs des plages immunoréactives envers l'anticorps monoclonal EG11 (planche IE-F) ont été trouvées au niveau de la basale de l'épithélium digestif.


Planche I : Etude immunohistochimique du cerveau et du tube digestif de *Nereis diversicolor* en présence d'anticorps produits contre les nHBGFs

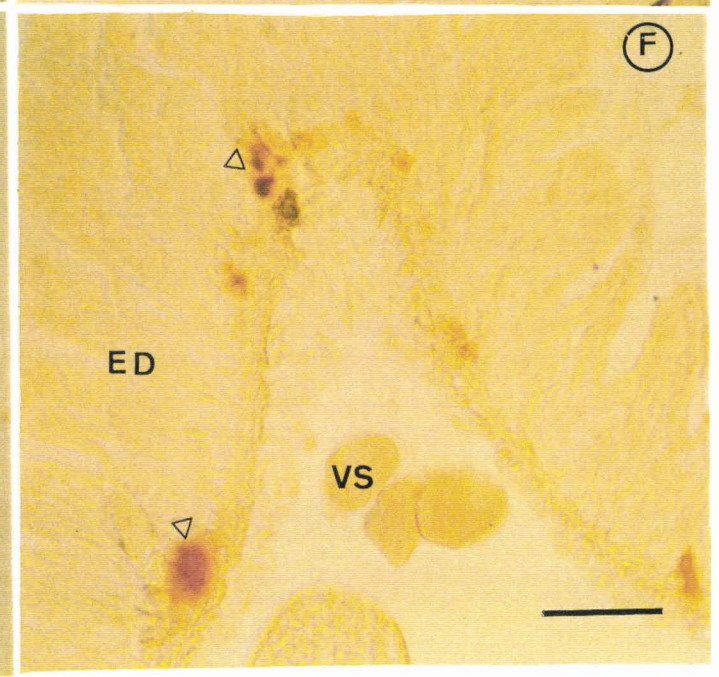
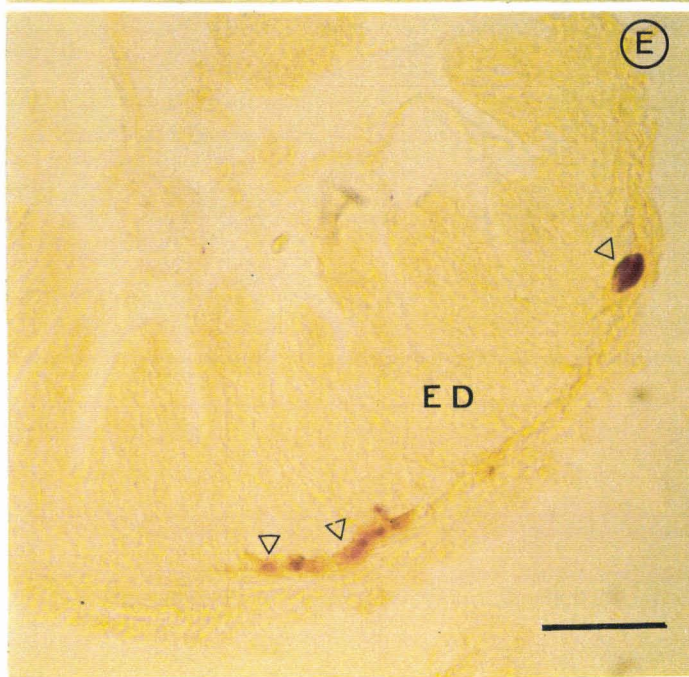
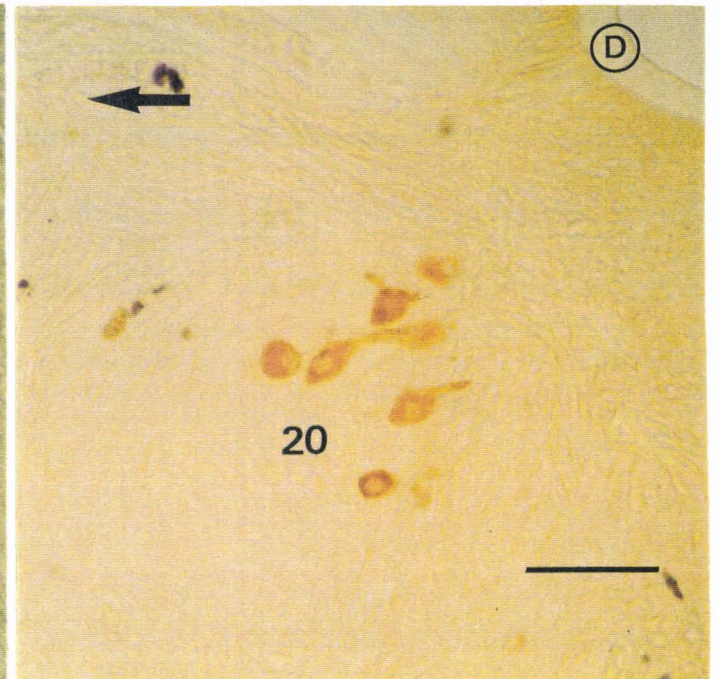
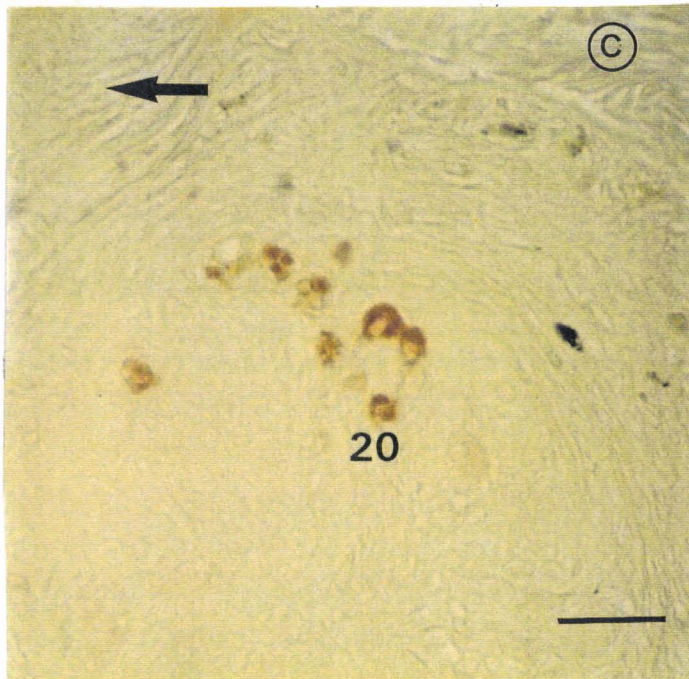
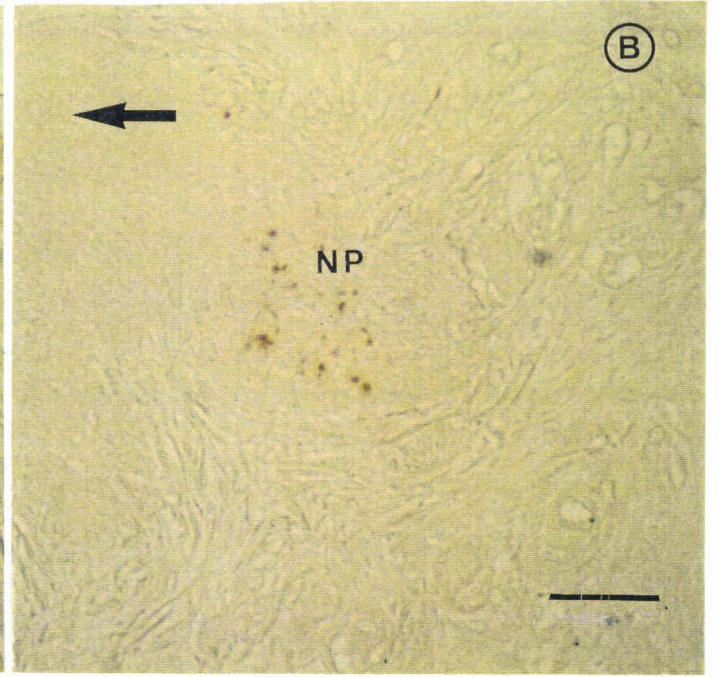
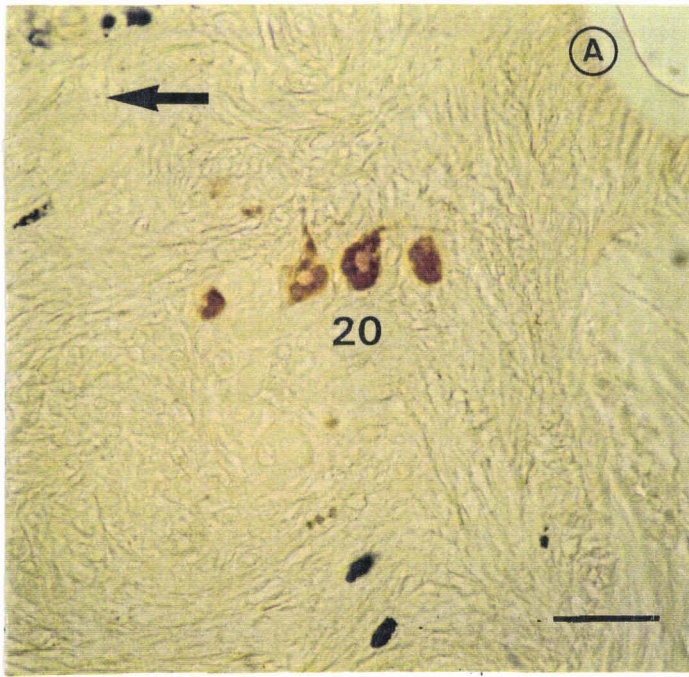
A, B, C, D - Coupes sagittales de cerveau
E, F - Coupes frontales du tube digestif

A, B - Immunoréactivité au niveau de cellules du noyau 20 du cerveau et des prolongements nerveux dans le neuropile (NP) envers le surnageant PYA15

C, D - Immunoréactivité de cellules du noyau 20 envers les anticorps monoclonaux DB1 (C) et PB31 (D)

E, F - Plages immunoréactives () envers l'anticorps monoclonal EG11 au niveau de la basale de l'épithélium digestif (ED).
Noter l'absence d'immunoréactivité au niveau des vaisseaux

La flèche  est dirigée vers la partie antérieure du prostomium ; la barre correspond à 40 μm .



III : Discussion

A la suite de cette étude, il apparaît que *Nereis diversicolor* possède des molécules affines pour l'héparine et capables d'induire *in vitro* la prolifération des fibroblastes de poumons de hamster chinois (ATCC CCL39).

L'activité mitogène, éluée en 1,2 M NaCl à l'issue de la chromatographie sur héparine-Sepharose (fraction 1,2 M HS), est potentialisée par l'héparine comme dans le cas des FGFs acides de vertébrés (Baird et Walicke, 1989). Par ailleurs, ces molécules que nous avons appelées nHBGFs ("heparin-binding growth factors" extraits de néréidiens) sont reconnues par un anticorps anti-FGF acide. Elles présentent donc des propriétés analogues aux FGFs acides extraits de différents tissus de vertébrés et purifiés de la même manière (Courty *et al.*, 1985 ; Courty *et al.*, 1986). Toutefois, la fraction 1,2 M HS est également immunodétectée par un anticorps anti-FGF basique de bovin. Au sein de cette fraction se trouverait donc un ou plusieurs polypeptides possédant soit des épitopes communs aux FGFs acide et basique, soit l'un ou l'autre de ces épitopes. Le fait que ces molécules sont éluées pour une même concentration saline (1,2 M NaCl) alors que les FGFs acide et basique sont éluées par des concentrations salines différentes (1 M et 1,5 M NaCl respectivement) (Klagsbrun et Shing, 1985 ; Courty *et al.*, 1987 ; Witte *et al.*, 1989) lors d'une chromatographie sur héparine-Sepharose, il est possible que des formes distinctes de nHBGFs présentant des poids moléculaires similaires soient coéluées au cours de cette étape chromatographique. En effet, nous avons trouvé une double immunoréactivité au niveau d'une seule fraction protéique possédant un poids moléculaire proche de 20 kDa.

A la suite de cette première étape chromatographique de purification sur héparine-Sepharose, il n'était cependant pas possible de préciser la correspondance qui pouvait exister entre les molécules immunoréactives et celles qui possèdent l'activité mitogène pouvant stimuler la prolifération des fibroblastes ATCC CCL39.

Lors du fractionnement par chromatographie d'échange de cations à pH 6,8 de la fraction 1,2 M HS, deux fractions présentant une activité mitogène importante sont respectivement éluées en 0,7 M NaCl (fraction 0,7 M MS) et en 0,85 M NaCl (fraction 0,85 M

MS). Ces deux fractions possèdent, à l'instar de la fraction 1,2 M HS, des molécules apparentées aux FGFs acide et basique de bovin. Par ailleurs, contrairement à un certain nombre de protéines affines pour l'héparine (Presta *et al.*, 1988), l'élution de ces molécules à activité mitogène et des molécules immunodétectées n'est pas modifiée si le fractionnement est effectué à différents pH (non montré). En conséquence, l'interaction ionique serait négligeable et la séparation par chromatographie d'échange de cations des nHBGFs, immunologiquement apparentés aux FGFs acide et basique de vertébrés, serait due principalement à l'interaction non spécifique avec le support chromatographique. Il est probable que la concordance des comportements chromatographiques entre molécules à activité mitogène et molécules immunodétectées soit due à des polypeptides de même nature. Les zones d'élution des nHBGFs sont toutefois assez différentes de celles des FGF acide et basique de bovin à l'issue d'une chromatographie d'échange de cations. En effet, le FGF basique est en général élué aux alentours de 0,3 M NaCl et le FGF acide aux environs de 0,4 M NaCl (Courty *et al.*, 1986 ; Gautschi-Sauva *et al.*, 1987). D'autre part, dans nos conditions expérimentales nous avons pu déterminer que le FGF basique bovin est élué en 0,35 M NaCl et le FGF acide bovin en 0,46 M NaCl. Il faut rappeler que le poids moléculaire de ces molécules se situe entre 16 et 18 kDa. Or il a été montré qu'une forme de FGF basique plus lourde (25 kDa) extraite du cerveau de cobaye est élue en 0,6 M NaCl, à pH 6 (Moscatelli *et al.* 1987) alors que la forme à 18 kDa est élue en 0,45 M NaCl. Bien que cette zone d'élution plus tardive puisse être attribuée au fait que le FGF soit plus basique, il reste possible qu'une forme plus lourde puisse interagir plus fortement de manière aspécifique sur le support chromatographique. Dans ces conditions, l'élution des nHBGFs vers 0,7-0,8 M NaCl, à pH 6,8, pourrait être reliée à leur poids moléculaire plus élevé que ceux des FGFs acide et basique de bovin.

La purification des nHBGFs de la fraction 0,85 M MS n'a pas été poursuivie car la quantité de matériel était trop faible. Toutefois l'analyse électrophorétique de cette fraction permet d'émettre plusieurs hypothèses. Dans cette fraction, nous retrouvons un polypeptide de 90 kDa. Ce dernier pourrait correspondre au polypeptide de même poids moléculaire présent dans la fraction 1,2 M HS qui possède une parenté immunologique avec le FGF basique et non avec le FGF acide. Cependant, nous n'avons pour le moment aucune donnée permettant

d'affirmer que ce polypeptide de haut poids moléculaire est responsable de l'activité mitogène car dans cette fraction d'autres molécules présentant un épitope commun avec le FGF acide bovin ont été immunodétectées. De plus, l'analyse électrophorétique montre que d'autres polypeptides sont présents dans la fraction 0,85 M MS, en particulier deux polypeptides de poids moléculaires proches de 21 kDa et 15 kDa. Le fait que nous n'avons pas d'immunoréactivité sur des polypeptides proches de 15 kDa après chromatographie sur héparine-Sepharose pourrait être un argument en faveur d'une molécule immunoréactive à 21 kDa. Cette dernière pourrait être un élément précurseur des nHBGFs détectés dans la fraction 0.7 M MS. Il conviendra, à l'avenir, de tester ces hypothèses.

Nous avons, par contre, purifié jusqu'à homogénéité les nHBGFs contenus dans la fraction 0,7 M MS. Cette fraction présente la particularité de n'être composée que de deux bandes polypeptidiques dont les poids moléculaires sont respectivement proches de 20 et de 19 kDa. L'analyse après HPLC en phase inverse montre que ces deux polypeptides sont élués par 32% d'acétonitrile pour la forme de 20 kDa et par 34% d'acétonitrile pour la seconde forme moléculaire. Ces deux éléments sont immunodétectés par l'anticorps anti-FGF acide et également avec l'anticorps anti-FGF basique, ce qui permet de les définir comme étant deux nHBGFs. Il faut remarquer que leurs conditions d'éluion sont analogues à celles des FGFs acide et basique de vertébrés dont les zones d'éluion en acétonitrile fluctuent entre 32 et 45% d'acétonitrile (Esch *et al.*, 1985 ; Courty *et al.*, 1986 ; Eloumani *et al.*, 1990).

L'analyse par isoélectrofocalisation de ces nHBGFs a permis de montrer que les formes à 20 et à 19 kDa possèdent un point isoélectrique de l'ordre de 6,4. Il est possible que la forme possédant le poids moléculaire de 19 kDa corresponde à une forme tronquée du polypeptide possédant le poids moléculaire de 20 kDa puisque nous n'avons détecté qu'une fraction protéique immunoréactive à l'issue de la chromatographie en héparine-Sepharose possédant un poids moléculaire proche de 20 kDa. Dans ce cas, comme le pI de ces deux formes (20-19 kDa) est identique, il faudrait supposer que le fragment issu du clivage du polypeptide de haut poids moléculaire est composé d'acides aminés neutres.

L'ensemble des données obtenues semble indiquer que les HBGFs de néréidiens possèdent certaines caractéristiques très proches des FGFs de vertébrés. Cependant les nHBGFs

présentent la particularité de posséder à la fois des épitopes spécifiques au FGF acide et des épitopes spécifiques au FGF basique de bovin. La séquence en acides aminés de ces polypeptides permettra de préciser le degré d'homologie entre les nHBGFs et les FGFs et de vérifier si les nHBGFs que nous avons isolés correspondent à des polypeptides différents ou à un seul polypeptide et un produit de dégradation généré au cours de l'extraction.

Nous avons montré que l'unité de stimulation des nHBGFs présents dans la fraction 0,7 M MS est de 30 ng / ml. Cette unité de stimulation est élevée si nous la comparons avec celles des FGFs acide et basique de bovin qui sont respectivement de 5 et 0.5 ng / ml (Courty et *al.*, 1987). La différence d'unité de stimulation des nHBGFs par rapport à celles des FGFs acide et basique de vertébrés peut être due à une affinité plus faible de ces polypeptides pour les récepteurs aux FGFs des cellules ATCC CCL 39 ou encore à la présence des contaminants séparés, par la suite, par RP-HPLC. Cependant, nous n'avons pas pu confirmer ce fait car, à l'issue de la chromatographie liquide en phase inverse, les protéines sont dénaturées et il a été impossible d'établir l'unité de stimulation des différents pics protéiques. De plus, il peut être envisagé que la forme à 19 kDa soit une forme tronquée inactive ou encore que la forme à 20 kDa soit un élément précurseur ne présentant pas d'activité mitogène. Dans ce cas, l'unité de stimulation se rapprocherait de celui des FGFs de vertébrés. Afin de préciser quel(s) est (sont) l' (les) élément(s) porteur(s) de l'activité mitogène, une étude chromatographique, utilisant les différences d'hydrophobicité des nHBGFs, pourrait être tentée par FPLC sur des colonnes hydrophobes de type phényl-Superose et pour laquelle les conditions d'élution seraient moins stringentes que la RP-HPLC sur colonne C-4.

Enfin, plusieurs anticorps monoclonaux obtenus à partir des nHBGFs reconnaissent le FGF acide et le FGF basique de bovin. Une étude immunohistologique réalisée avec ces anticorps a permis de mettre en évidence une immunoréactivité de certaines cellules dans le cerveau et le tube digestif de *Nereis diversicolor*. Au niveau du cerveau, seul le péricaryon de quelques cellules fuchsinophiles (neurosecrétrices) du noyau 20 et quelques fibres nerveuses du neuropile sont immunoréactifs. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer si cette immunoréactivité relève d'une synthèse des nHBGFs dans le péricaryon. Néanmoins ces résultats immunohistochimiques sont analogues à ceux obtenus pour le tissu nerveux des

vertébrés supérieurs où des marquages neuronaux et des fibres ont été observés (Pettmann et al., 1986 ; Huang et al., 1987 ; Janet et al., 1987). Par ailleurs, en dehors du système nerveux, une immunoréactivité envers les anticorps anti-nHBGFs a été observée au niveau des segments postérieurs de *Nereis diversicolor* , dans la partie basale de l'épithélium intestinal. La présence des FGFs au niveau de la matrice extracellulaire a également été rapportée chez les vertébrés, *in vitro* et *in vivo* (Gonzalez et al., 1990 ; Schweigerer et al., 1987b ; Vlodaysky et al., 1987 ; Flaumenhaft et al., 1989). Il est possible, dans ce cas, que les nHBGFs puissent agir dans les processus de croissance car l'immunoréactivité se situe près d'une zone de prolifération cellulaire.

CHAPITRE II
MISE en EVIDENCE et CHARACTERISATION des
SITES de FIXATION SPECIFIQUES aux FGFs
chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller

I : Introduction

Dans le chapitre I nous avons montré, d'une part, que les néréis contiennent des HBGFs reconnus à la fois par les anticorps dirigés contre les FGF acide et basique de bovin. La présence de ces facteurs nous a conduit à rechercher leurs sites de fixation spécifiques. Ce travail a été réalisé sur des préparations membranaires obtenues à partir de jeunes *Nereis diversicolor* encore sexuellement indifférenciées en utilisant du I¹²⁵-FGF basique.

II : Résultats

A : Mise au point des conditions optimales de la fixation de FGF basique iodé sur des membranes cellulaires de jeunes *Nereis diversicolor*

1 : Cinétique de la fixation

La cinétique de fixation du FGF basique iodé sur des membranes cellulaires de néréidiens, à 4°C, est présentée au niveau de la figure 10. Dans les conditions expérimentales utilisées, la radioactivité maximale associée aux membranes est obtenue après une incubation de 30 minutes.

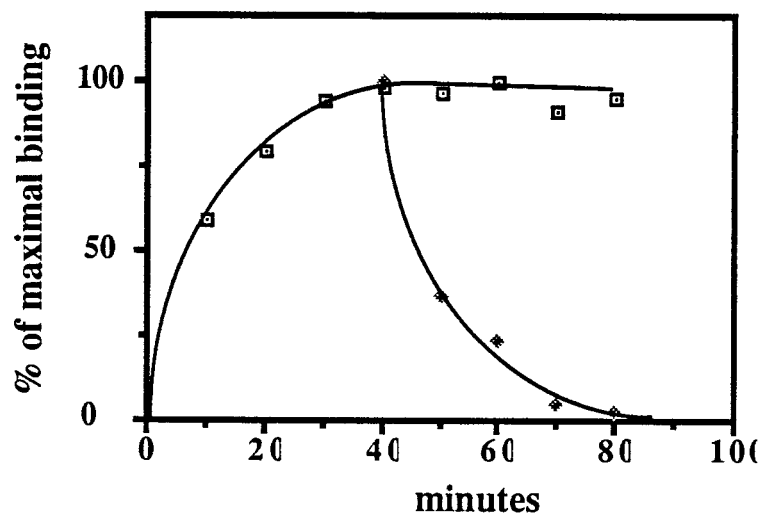


Figure 10 : Cinétique d'association et de dissociation du FGF basique iodé sur les préparations membranaires de *Nereis diversicolor*.

- Cinétique d'association (□)
- Cinétique de dissociation (◆)

La fixation entre le ligand et les membranes semble, à ce terme, avoir atteint un état d'équilibre. 23 nM de FGF basique non radiomarqué, correspondant à un excès molaire de 1000 fois supérieur à celui du FGF basique iodé, sont ajoutés après 40 minutes d'incubation et induisent le déplacement du ligand "chaud". Ce déplacement atteint 75% après 10 minutes et, approche 100% après 30 minutes.

2 : Effet de la concentration des membranes cellulaires

Comme le montre la figure 11, la fixation spécifique, obtenue par la différence entre la fixation totale et la fixation non spécifique comme cela a été décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes", augmente en fonction de la concentration des membranes cellulaires. La fixation non spécifique est déterminée par un déplacement du FGF basique iodé par 23 nM de FGF basique non radiomarqué. Pour 23 pM de FGF basique iodé, la saturation est atteinte avec 30 μ g de protéines membranaires.

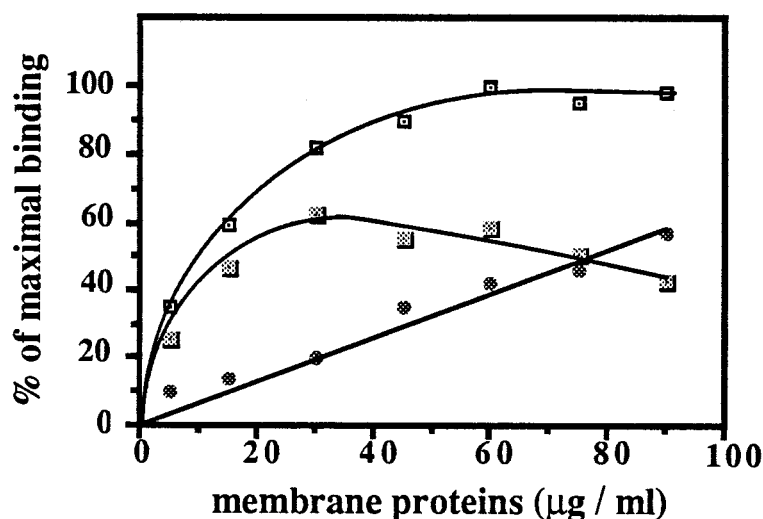


Figure 11 : Effet de la concentration des protéines membranaires sur la fixation de 23 pM de FGF basique iodé.

- Incubation avec 23 pM de FGF basique iodé (■).
- Incubation avec une dilution isotopique réalisée avec 2.3 nM de FGF basique non radiomarqué (fixation non spécifique) (●).
- Fixation spécifique (▣) obtenue par la différence entre la fixation totale (■) et la fixation non spécifique (●)

B : Tests de compétition et analyses de Scatchard

Les tests de compétition ont été réalisés dans les conditions optimales de fixation du FGF basique sur les préparations membranaires de jeunes *Nereis diversicolor*. Les préparations membranaires sont incubées avec différentes dilutions isotopiques de I¹²⁵-FGF basique. Les données obtenues sont traitées au moyen du programme LIGAND.

1 : Test de compétition homologue

Cette étude nous a permis de montrer la présence de deux classes de sites à fixation spécifique pour le FGF basique sur les membranes cellulaires de néréidiens (figure 12) . Ces deux classes de sites de fixation sont mises en évidence par la courbe à deux pentes obtenue par analyse de Scatchard. La première classe de sites de fixation spécifiques, correspondant à la portion de courbe ayant la plus forte pente, possède une constante de dissociation apparente (Kd) de 40 pM et une capacité membranaire de 140 fmoles / mg de protéines membranaires (tableau IV). La seconde classe de sites de fixation spécifiques présente un Kd apparent de 4 nM et une capacité de 25 pmoles / mg de protéines membranaires (tableau IV). La mise en évidence de ces deux types de sites de fixation spécifique a été obtenue après avoir extrait les membranes de néréidiens et effectué les études de compétition dans un tampon contenant 0,56 M NaCl correspondant à la pression osmotique interne des animaux.

2 : Test de compétition hétérologue

Sur la figure 12, sont également représentées les analyses de Scatchard en utilisant comme compétiteur vis-à-vis du I¹²⁵- FGF basique soit, une fraction éluée en 1,2 M NaCl sur colonne d'héparine-Sepharose (1,2 M HS), contenant l'activité mitogène, soit, les nHBGFs élués en 0,7 M NaCl lors du fractionnement par chromatographie d'échange de cations (0,7 M MS). La linéarisation de Scatchard des données obtenues à la suite des tests de compétition avec la fraction 1,2 M HS, ne met en évidence qu'une seule classe de sites d'interaction. Cette classe possède un Kd apparent de 3 nM et une capacité membranaire de 51 pmoles / mg de protéines membranaires (tableau IV). Par contre, l'analyse des données obtenues en utilisant la fraction 0,7 M MS permet de définir deux classes de sites d'interaction

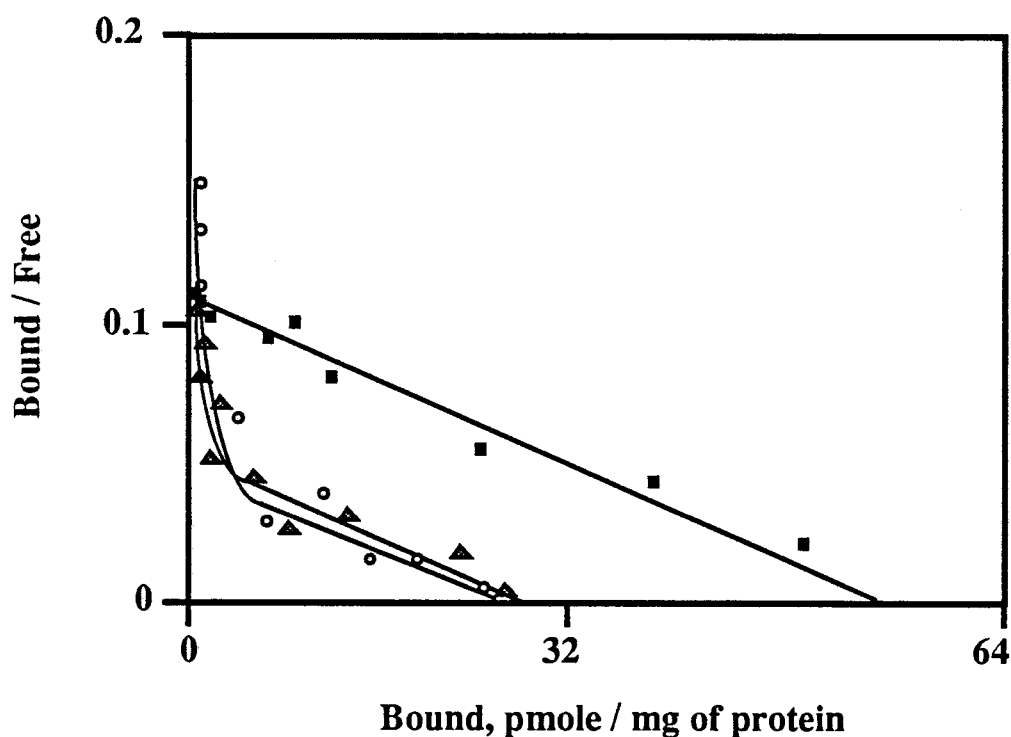


Figure 12 : Linéarisation de Scatchard des études de compétition en utilisant comme ligand 23 pM de I125-FGFbasique (A.S. : 50 μ Ci / μ g).

Les compétiteurs sont respectivement :

- le FGF basique non radiomarqué (\circ)
- les polypeptides contenus dans la fraction 1.2 M HS (\blacksquare)
- les polypeptides contenus dans la fraction 0.7 M MS (\blacktriangle)

Ligand	High affinity binding sites		Low affinity binding sites	
	Kd (pM)	R1 (fmol/mg)	Kd (nM)	R2 (pmol/mg)
bFGF	40 (20)	140 (80)	4 (2)	25 (6)
1.2 M HS	ND	ND	3 (1)	51 (8)
0.7 M MS	30 (19)	100 (60)	5 (2)	30 (10)

Tableau IV : Données obtenues au moyen du programme LIGAND après linéarisation de Scatchard des compétitions entre le FGF basique iodé et les différents compétiteurs.

- Kd : constante de dissociation
- R1 : capacité membranaire des sites de fixation à haute affinité
- R2 : capacité membranaire des sites de fixation à basse affinité
- ND : non détectable

Les données obtenues correspondent à la moyenne de 3 déterminations ; entre parenthèses l'écart type

spécifiques : une première classe de sites de fixation à haute affinité qui possède un K_d apparent de 30 pM et une capacité de 100 fmoles / mg de protéines membranaires et une seconde classe de sites de fixation à basse affinité est caractérisée par un K_d de 5 nM et une capacité membranaire de 30 pmoles / mg de protéines membranaires (tableau IV). Une étude statistique réalisée à l'aide du test de Student indique que les différences des valeurs de K_d et des capacités membranaires, entre compétition homologe avec le FGF basique et compétition hétérologue par la fraction 0,7 M MS contenant le nHBGF, ne sont pas significatives.

C : Caractérisation des sites récepteurs par pontage moléculaire

Les complexes obtenus, par pontage moléculaire, entre le FGF basique iodé et les protéines membranaires sont analysés par électrophorèse puis autoradiographiés. L'autoradiogramme obtenu est représenté dans la figure 13. La piste 1 montre que 3 bandes possédant des poids moléculaires respectifs de 180, 120 et 70 kDa. Ces bandes correspondent à des formes récepteur putatives qui possèdent des poids moléculaires respectifs de 165, 105 et 55 kDa. Ceux-ci sont obtenus en retirant le poids moléculaire du ligand au niveau des différents complexes. Par ailleurs, la spécificité du pontage des protéines possédant une affinité vis-à-vis du FGF basique iodé est confirmée par la disparition du marquage lorsqu'une dilution isotopique est réalisée au 1 / 500^e par du FGF basique froid (piste 2). Le même résultat est obtenu par un excès de polypeptides provenant de la fraction 1,2 M HS (piste 3) ou de la fraction 0,7 M MS (piste 4) 500 fois supérieur à celui du I¹²⁵-FGF basique. Par ailleurs, ces complexes radiomarqués n'apparaissent pas lorsque l'agent pontant n'est pas ajouté lors de l'incubation entre ligand et préparation membranaire (piste 5).

D : Localisation des sites de fixation par autoradiographie

Cette étude a été réalisée sur des coupes sériées de l'extrémité postérieure du corps comportant 10 segments, la zone de prolifération et le pygidium. Les résultats obtenus par autoradiographie confirment le fait que la fixation de I¹²⁵-FGF basique sur des éléments membranaires de *Nereis diversicolor* est spécifique. En effet, la totalité de la fixation représentée par la planche IIA est déplacée par du FGF basique froid, à raison d'un excès

molaire de 500 fois supérieur à la molarité du FGF basique iodé, comme le montre la planche IIB. La planche IIC, représentant un détail de l'autoradiographie globale de la partie postérieure de la néréis, permet de situer plus précisément la fixation du I^{125} -FGF basique au niveau des constituants de la membrane basale de l'épithélium digestif et des dissépinements. De plus, il est à noter que les vaisseaux sanguins présentent une affinité particulière pour le facteur iodé.

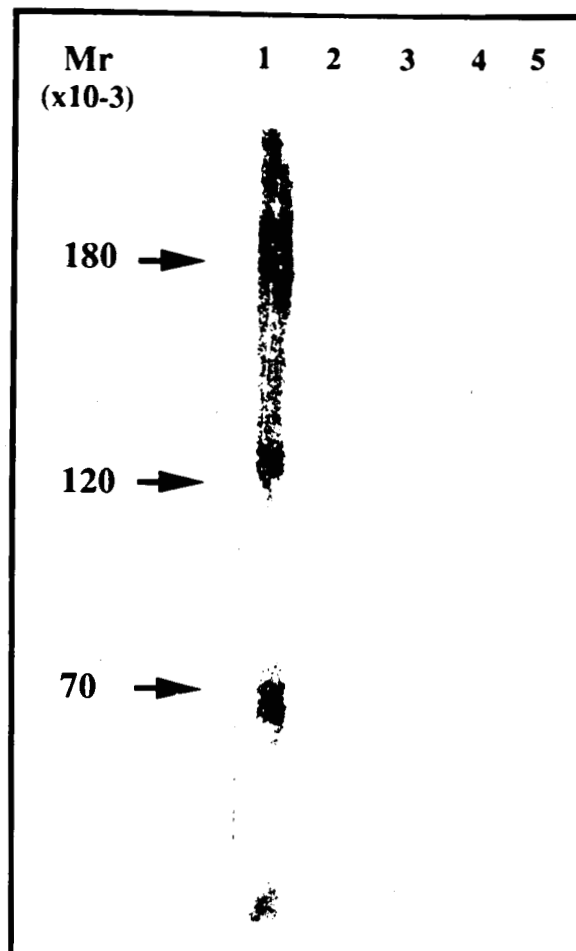


Figure 13 : Caractérisation des sites récepteurs par pontage moléculaire

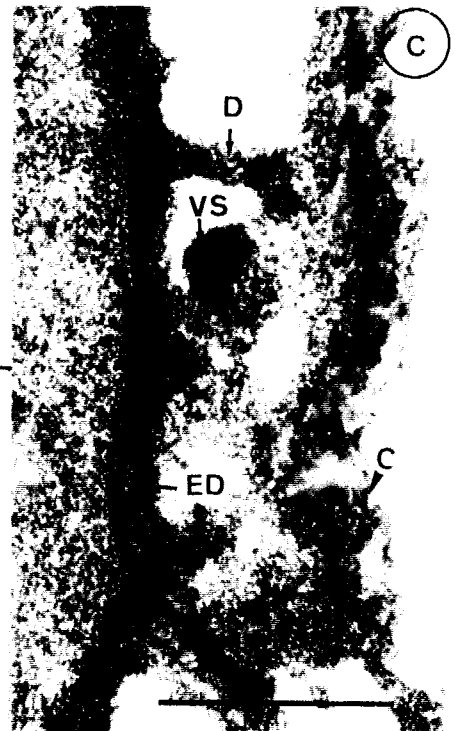
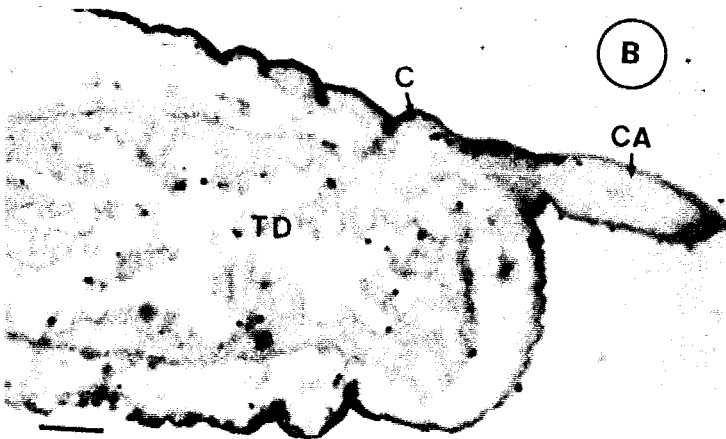
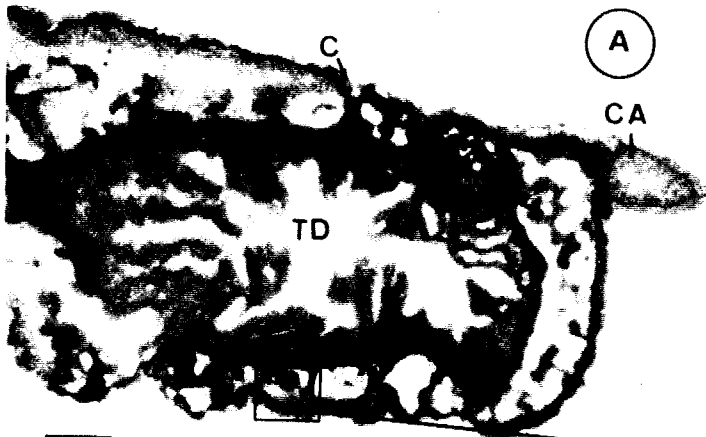
- piste 1 : Pontage réalisé avec 1 ng de FGF basique iodé (A.S. 50 μ Ci / μ g).
- piste 2 : I^{125} - FGF basique (1 ng) et FGF basique (500 ng)
- piste 3 : I^{125} - FGF basique (1 ng) et polypeptides de la fraction 1.2 M HS (500 ng de protéines)
- piste 4 : I^{125} - FGF basique (1 ng) et nHBGFs contenus dans la fraction 0.7 M MS (500 ng de protéines)
- piste 5 : Séparation réalisée sans l'agent pontant (DSS)

Planche II : Autoradiographie de coupes de parties postérieures de *Nereis diversicolor*.

A, C - Vue d'ensemble (A) et de détail (C) de la fixation du FGF basique iodé (1 nM). La fixation est localisée au niveau de la basale de l'épithélium digestif (ED), des dissépinements (D) et des vaisseaux sanguins (VS).

B - Déplacement de la fixation du FGF basique iodé (1 nM) par un excès de 500 nM de FGF basique non radiomarké. Le liseré noir situé à la périphérie de l'animal correspond à des pigments tégumentaires

C, cuticule ; CA, cirre anal ; TD, tube digestif.
La barre correspond à 100 μ m.



III : Discussion

Cette étude a permis d'établir, pour la première fois, la présence de sites d'interactions spécifiques pour le FGF basique chez des invertébrés (nérédiens).

Après optimisation des conditions de fixation (état d'équilibre ; saturation), les études de compétition sur des préparations membranaires de *Nereis diversicolor* et les analyses par linéarisation de Scatchard de ces données, nous ont permis de montrer l'existence de deux classes de sites de fixation pour le FGF basique. Il est à noter que ces études de radiorécepteurs sont différentes de celles effectuées chez les vertébrés par le fait que la pression osmotique a été augmentée à 1000 milliosmoles, ceci correspondant à une concentration saline de 33 grammes par litre donc à la pression osmotique interne de ce matériel biologique marin. Cette augmentation saline nous a permis notamment de remédier à une fixation non spécifique importante qui masquait l'une de ces classes de site de fixation spécifique (non montré).

L'une de ces classes de sites de fixation spécifiques est caractérisée par une constante de dissociation (K_d) de 40 pM et par une capacité de fixation de 140 fmoles par mg de protéines membranaires. Cette première classe peut être considérée comme étant celle de sites à haute affinité alors que la seconde, à basse affinité, est définie par un K_d de 4 nM et par une capacité membranaire de 25 pmoles par mg de protéines membranaires. La présence de deux classes de sites de fixation pour le FGF, montrant des caractéristiques analogues à celles trouvées chez les nérédiens, a été rapportée sur des préparations membranaires de vertébrés, notamment au niveau du cerveau de bovin (Courty et al., 1988), du cerveau de cobaye (Ledoux et al., 1989) et au niveau du placenta de souris (Hondermarck et al., 1990a). De plus, chez les vertébrés, les sites à haute affinité, de K_d variant entre 10 et 300 pM (Ledoux et al., 1989 ; Courty et al., 1988 ; Olwin et Hauska, 1986 ; Walicke et al., 1988 ; Blanquet et al., 1989 ; Hondermarck et al., 1990), correspondent à des glycoprotéines de poids moléculaires compris entre 85 et 170 kDa (Ledoux et al., 1989 ; Courty et al., 1988 ; Olwin et Hauska, 1986 ; Walicke et al., 1989 ; Blanquet et al., 1989) et nous avons montré qu'une forme récepteur de 80 kDa existe au niveau du placenta (Hondermarck et al., 1990a). Ces sites à haute affinité sont considérés comme les récepteurs membranaires permettant la transmission de l'effet biologique des FGFs (Moscatelli,

1987). Chez les néréidiens, ces effets pourraient être médiés par au moins une des trois formes possibles de récepteurs mises en évidence par pontage moléculaire entre le FGF iodé et les préparations membranaires de *Nereis diversicolor* et possédant des poids moléculaires apparents de 165, 105 et 55 kDa. Le fait d'avoir plusieurs formes de récepteurs n'est pas rare car dans la plupart des cas au moins deux formes putatives sont présentes (Ledoux et *al.*, 1989 ; Courty et *al.*, 1988). De plus, une forme récepteur à 170 kDa a été décrite dans les cerveaux de bovins et de cobaye (Ledoux et *al.*, 1989 ; Courty et *al.*, 1988) et une autre de 105 kDa a été purifiée du cerveau de bovin (Méreau et *al.*, 1989). Par contre, la forme de 55 kDa n'a jamais été rapportée et pourrait être un produit de dégradation des molécules plus lourdes pouvant survenir avant et / ou pendant la réaction de pontage moléculaire.

En ce qui concerne les sites de fixation à basse affinité qui, rappelons le, possèdent un Kd de 4 nM et une capacité de 25 pmoles par mg de protéines membranaires, il semble que ceux-ci soient sensibles à des traitements enzymatiques tels que l'héparinase. En effet, lors d'une expérience préliminaire il apparaît que le taux de fixation du FGF basique iodé diminue de l'ordre de 60% par rapport à un témoin non traité (non montré). Ces sites seraient peut-être de même nature que ceux détectés chez les vertébrés et qui sont sensibles aux traitements par l'héparinase et l'héparitinase (Bashkin et *al.*, 1989). De plus, les sites à basse affinité des vertébrés n'ont pas seulement été trouvés à la surface des membranes cellulaires mais également associés à la matrice extracellulaire. Si la fonction réelle de ces sites à basse affinité est inconnue, ils pourraient cependant correspondre à une forme de stockage du FGF et donc intervenir dans un mécanisme de régulation contrôlant la biodisponibilité de ce facteur de croissance (Bashkin et *al.*, 1989).

Par ailleurs, les études autoradiographiques des parties postérieures de *Nereis diversicolor* indiquent que la fixation spécifique se situe au niveau de la membrane basale de la paroi intestinale, des disséminations et des vaisseaux sanguins et pourrait correspondre plus particulièrement à la localisation *in situ* des sites de fixation à basse affinité.

Nous pouvons donc en conclure que les sites de fixation des FGFs des néréidiens sont très proche de ceux des vertébrés.

Par ailleurs, l'interaction entre les FGFs et les récepteurs membranaires de néréidiens étant démontrée, il nous est apparu fondamental d'établir si les nHBGFs pouvaient entrer en compétition avec les FGFs. Il apparaît que les nHBGFs contenus dans la fraction 0,7 M MS entrent en compétition avec le FGF basique iodé au niveau de préparations membranaires de *Nereis diversicolor*. Dans ce cas, le Kd est de 30 pM et la capacité de 100 fmoles par mg de protéines membranaires pour les sites de fixation à haute affinité. Les sites à basse affinité possèdent un Kd de 5 nM et une capacité de 30 pmoles par mg de protéines membranaires. Il semble que les nHBGFs contenus dans la fraction 0,7 M MS déplacent le FGF iodé sur les mêmes sites récepteurs car, outre la similarité des Kd et des capacités membranaires de ces deux classes de sites de fixation, il est à noter que les sites récepteurs observés après pontage moléculaire disparaissent après adjonction d'un excès molaire 500 fois supérieur de nHBGFs par rapport à celui du I¹²⁵- FGF basique. Par contre, des compétitions hétérologues réalisées avec la fraction 1,2 M HS ne donnent qu'une seule classe de sites caractérisée par un Kd de 3 nM et une capacité membranaire de 100 pmoles par mg de protéines membranaires. Une dilution isotopique correspondant à un excès molaire équivalent à 500 fois celle du FGF basique radiomarké de la fraction 1,2 M HS montre que les polypeptides présents dans cette fraction entrent en compétition avec les formes récepteurs visualisées par pontage moléculaire. Il est possible que dans la fraction 1,2 M HS, des polypeptides interagissent, d'une part, avec les deux classes de sites de fixation spécifique précédemment décrits et, d'autre part, avec des sites de fixation moins spécifiques masquant ainsi les sites récepteurs à haute affinité. Cette augmentation du déplacement pourrait être due pour partie à des protéines très basiques qui, comme cela a déjà été décrit (Dauchel *et al.*, 1989), peuvent déplacer le FGF basique.

CHAPITRE III
ETUDE PRELIMINAIRE du ROLE des nHBGFs
dans les
MECANISMES de CROISSANCE, de REGENERATION et
d'ANGIOGENESE

I : Introduction

Les néréidiens contiennent des facteurs de croissance proches des FGFs de vertébrés (chapitre I) et possèdent des sites de fixation spécifiques pour ces facteurs (chapitre II). Nous nous proposons dans ce chapitre d'aborder la signification biologique de la présence de ces molécules en étudiant la régulation de leur production dans des phénomènes où ces facteurs sont susceptibles d'intervenir. Compte-tenu du rôle de ces facteurs de croissance chez les vertébrés nous envisagerons dans un premier temps la croissance caractérisée par une prolifération cellulaire intense et dans un deuxième temps l'angiogenèse.

II : Résultats

A : Croissance

Les néréidiens ayant la faculté de croître tout au long de leur vie, nous avons évalué, pour un stade de maturation génital donné (femelle dont le diamètre ovocytaire est compris entre 80 et 120 μm), le taux des molécules apparentées aux FGFs au niveau, d'une part, d'une zone en croissance et, d'autre part, d'une zone quiescente. En outre, nous avons recherché s'il existe une différence dans la répartition des sites à fixation spécifique entre ces mêmes zones. La zone en croissance est constituée de la zone proliférative postérieure et les segments contigus (3 segments). La zone quiescente est obtenue après prélèvement du 20^{ème} segment par rapport au prostomium (tête).

1 : Quantification des nHBGFs au niveau d'une zone en croissance et d'une zone quiescente

Le taux (relatif) des nHBGFs a été évalué par ELISA, d'une part, au niveau de la zone en croissance et, d'autre part, au niveau d'une zone quiescente. Cette étude a été effectuée en utilisant 3 et 5 grammes de tissus correspondant respectivement à 4802 zones de prolifération et 3106 segments quiescents. Après l'extraction selon le protocole établi dans la partie "Matériel et Méthodes", 56 mg de protéines sont passés sur une colonne d'héparine-Sepharose de 1ml. Les protéines retenues sont éluées séquentiellement par 2 ml de tampon contenant respectivement 0,5 M en NaCl (rinçage), 1,2 M et 2 M en NaCl. A la suite de ces éluions, il n'a pas été possible de quantifier précisément les protéines présentes dans ces fractions. Le test ELISA

réalisé avec un anticorps anti-FGF basique de bovin (figure 14) montre que la plus grande partie du matériel immunoréactif est élué en 1,2 M NaCl et que le taux de molécules apparentées au FGF basique est significativement plus important dans la zone en croissance que dans la zone quiescente. En effet, en test ELISA les molécules immunodétectées au niveau de la fraction 1,2M en NaCl de la zone en croissance induisent une valeur d'absorbance à 490 nm de 0,267, tandis que celles de la zone quiescente correspondent à une valeur d'absorbance de 0,186. Au cours de cette étude, 500 ng de FGF basique ont donné dans les mêmes conditions une valeur d'absorbance de 0,742.

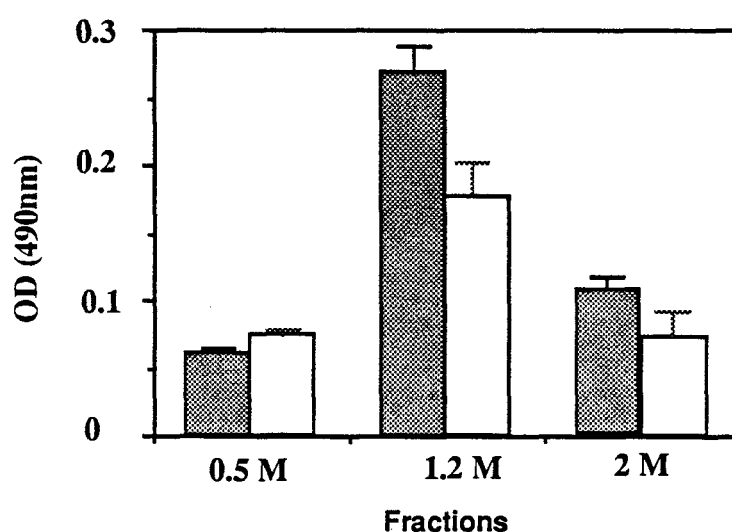


Figure 14 : Variation du taux des nHBGFs, immunodétectés par un anticorps anti-FGF basique de bovin, contenus dans une zone en croissance (■) et une zone quiescente (□)

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'écart-type de 2 expérimentations

2 : Quantification des sites de fixation au FGF dans la zone en croissance et dans la zone quiescente

2.1 : Analyse de Scatchard

- Zone en croissance : la linéarisation de Scatchard des études de compétition entre du I^{125} -FGF basique et du FGF basique non radiomarqué est présentée sur la figure 15 montre deux classes de sites d'interaction spécifiques : une classe de sites à haute affinité possédant un K_d de 60 pM et une capacité membranaire de 190 fmoles / mg de protéines membranaires ; une

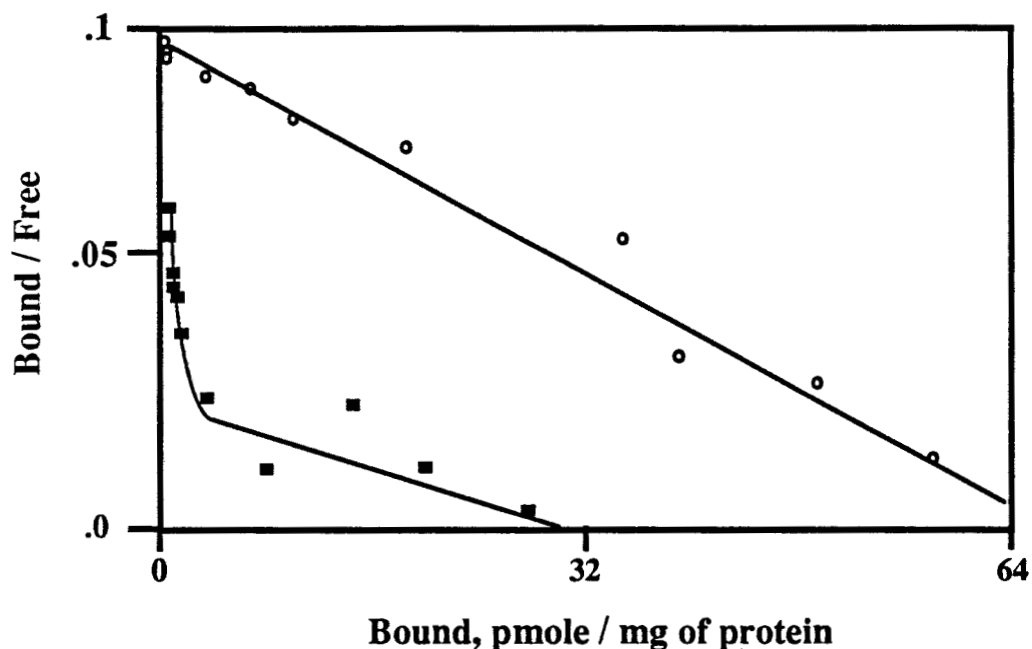


Figure 15 : Linéarisation de Scatchard des études de compétition obtenues entre le FGF basique iodé (A.S. : 50 μ Ci / μ g) et le FGF basique non radiomarqué de préparations membranaires de zones en croissance (\blacksquare) et de zones quiescente (\circ) prélevées chez des *Nereis diversicolor* femelles.

Tissues	High affinity binding sites		Low affinity binding sites	
	Kd (pM)	R1 (fmol/mg)	Kd (nM)	R2 (pmol/mg)
Proliferative Zone	60 (30)	190 (140)	8 (5)	30 (12)
Non-Proliferative Zone	ND	ND	4 (2)	102 (20)

Tableau V : Données de Scatchard des préparations membranaires de zones en croissance (proliferative zone) et en quiescence (non proliferative zone) obtenues aux moyens du programme LIGAND.

- Kd : constante de dissociation
- R1 : capacité membranaire des sites de fixation à haute affinité
- R2 : capacité membranaire des sites de fixation à basse affinité
- ND : non détecté

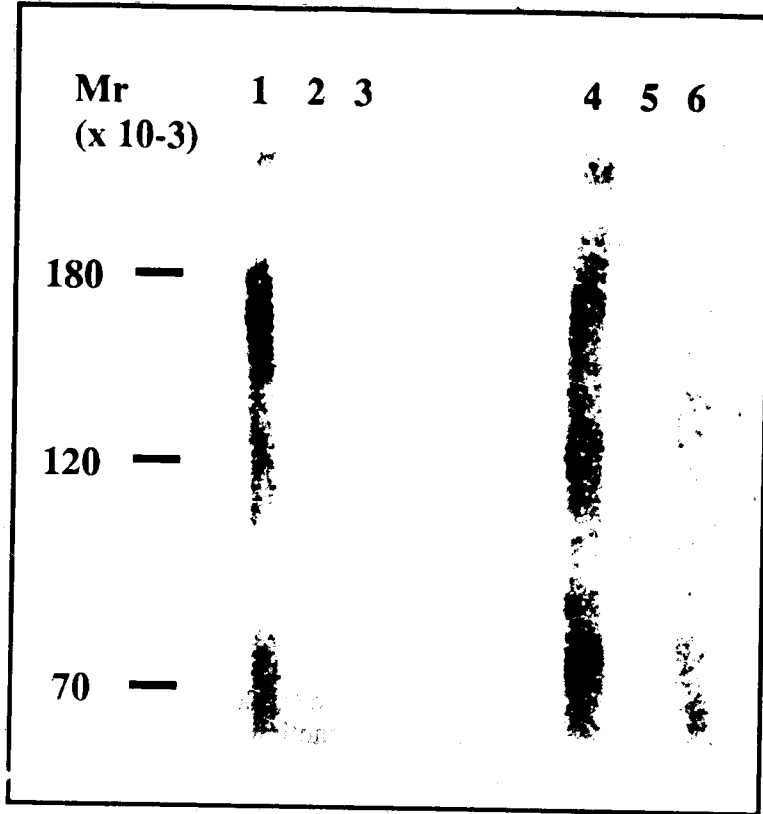
Les données obtenues correspondent à la moyenne de 2 déterminations ; entre parenthèses l'écart type

Figure 16 : Pontage moléculaire de FGF basique iodé sur des préparations membranaires (500 µg) de zone de croissance (piste 1 à 3) et de zone en quiescence de *Nereis diversicolor* femelles.

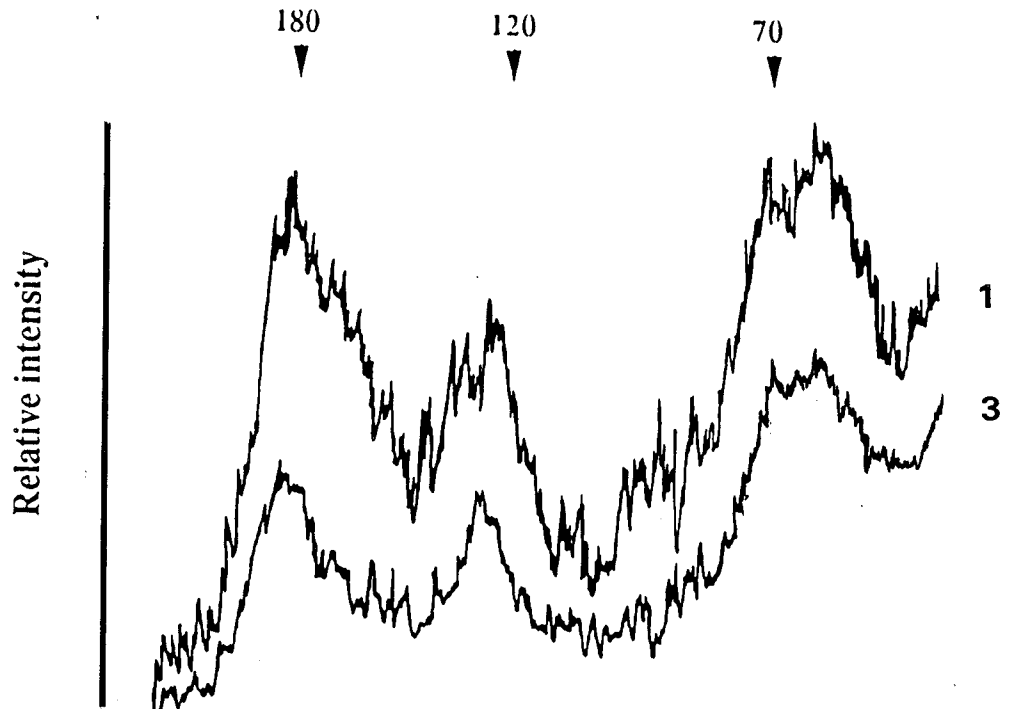
- A : Autoradiographie après migration électrophorétique de membrane
- piste 1-3 : FGF basique iodé (1.2 nM)
 - piste 2-4 : déplacement par un excès molaire (x500) de FGF basique froid
 - piste 3-6 : déplacement par un excès molaire (x500) des nHBGFs contenus dans la fraction 0.7 M MS

B : Analyse densitométrique des pistes 1 et 3 aux moyens de l'analyseur d'images SAMBA 2005

A



B



classe de sites à basse affinité caractérisée par un Kd de 8 nM et par une capacité de 30 pmoles / mg de protéines membranaires (tableau V).

- Zone quiescente : la même étude effectuée sur des préparations membranaires de métamères différenciés est présentée sur la figure 15. Dans ce cas, l'analyse de Scatchard ne permet la détection que d'une seule classe de sites d'interaction caractérisée par un Kd de 4 nM et par une capacité membranaire de 102 pmoles / mg de protéines membranaires (tableau V).

2.2 : Pontage moléculaire

Les complexes obtenus entre le FGF basique iodé et les protéines membranaires de zone en croissance et de zone quiescente sont séparés par électrophorèse et autoradiographiés. Les résultats obtenus (figure 16A) montrent que ces complexes sont présents au niveau de la zone de croissance (piste 1) et au niveau de la zone en quiescence (piste 4) ; Ils possèdent des poids moléculaires proches de 180, 120 et 70 kDa. La spécificité de la fixation du I¹²⁵-FGF basique a été vérifiée en déplaçant, avant l'adjonction de l'élément pontant (DSS), par un excès molaire équivalent à 500 fois celui du FGF iodé d'une part, avec du FGF non radiomarké (pistes 2 et 5) et d'autre part avec les nHBGFs contenus dans la fraction 0,7 M MS (pistes 3 et 6). L'analyse densitométrique par l'analyse d'images (SAMBA 2005) montre cependant que l'intensité de ces complexes, notamment pour les éléments à 180 et 120 kDa, est 3 à 4 fois plus intense au niveau des préparations membranaires des zones en croissance que dans celles des zones quiescentes (figure 16B).

3 : Immunolocalisation des nHBGFs

Comme cela a déjà été décrit dans le chapitre I, nous avons produit des anticorps monoclonaux reconnaissant, d'une part, les nHBGFs et, d'autre part, les FGFs de vertébrés. Ces anticorps nous ont permis de détecter (planche IIIA-B) des plages immunoréactives particulièrement importantes près de la basale de l'épithélium digestif au niveau de la zone de prolifération.

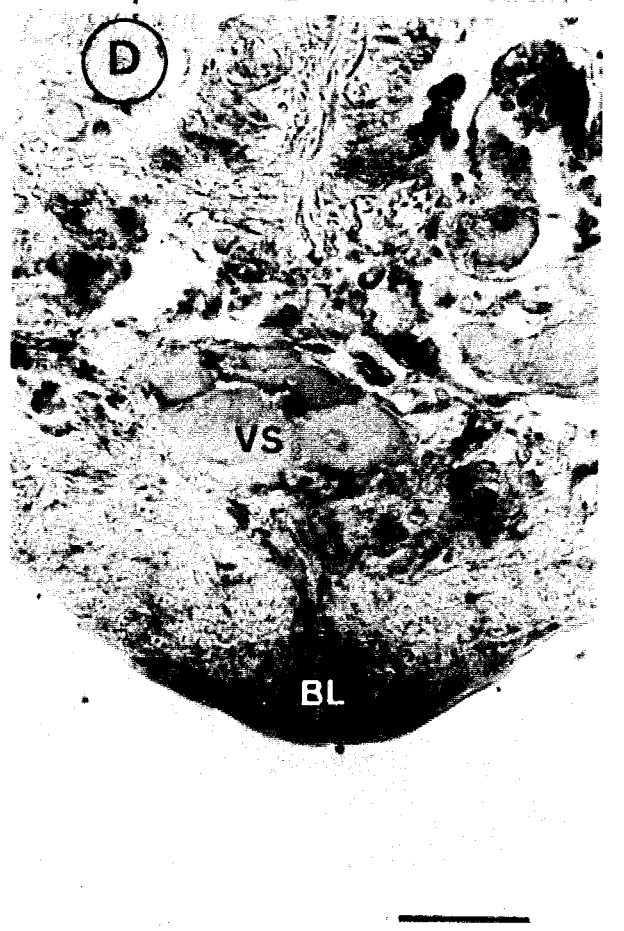
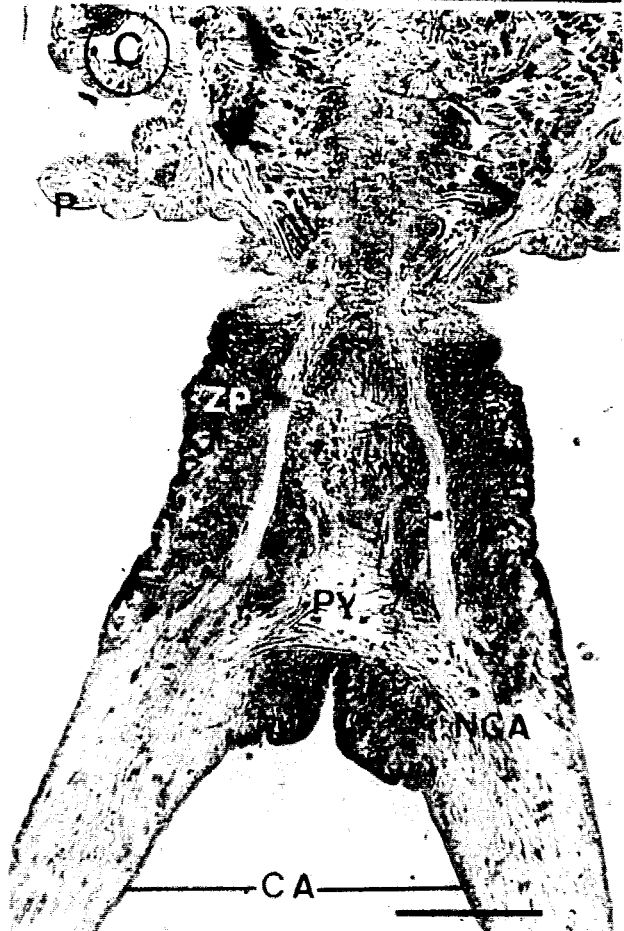
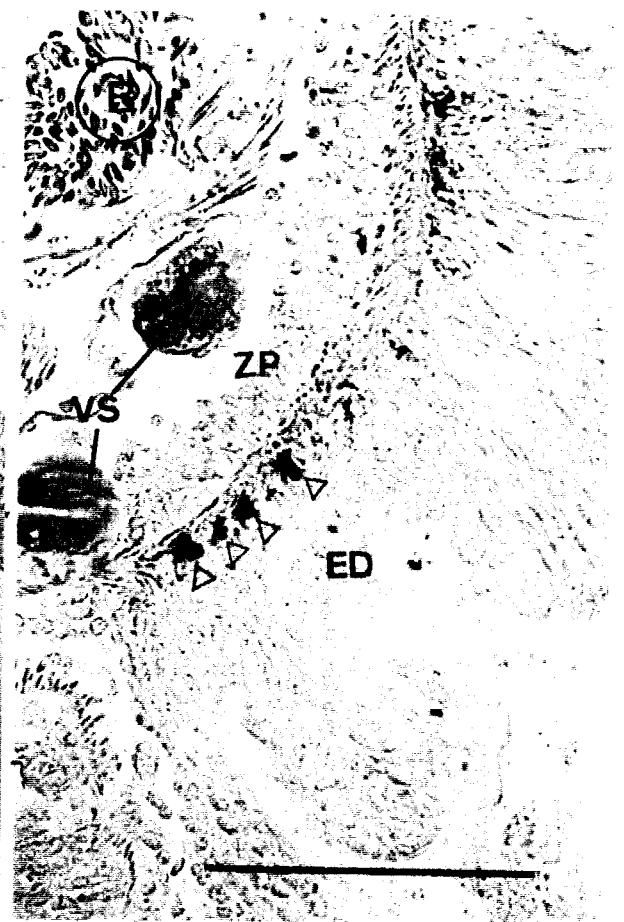
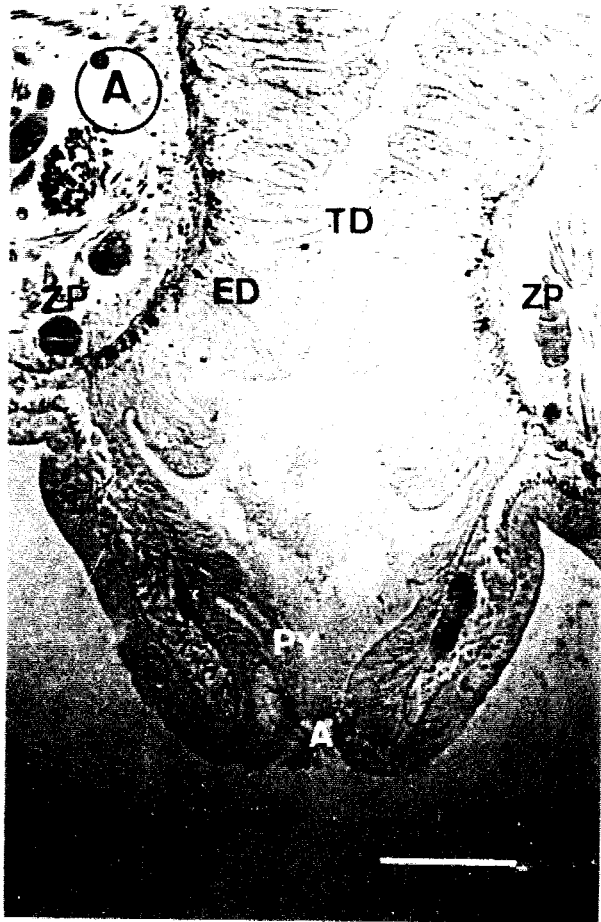
Nous avons parallèlement étudié une zone en régénération dont on sait qu'elle possède les mêmes caractéristiques histologiques qu'une zone en croissance. Il apparaît que le blastème

Planche III : Etude immunohistologique de l'extrémité postérieure du corps normal et en régénération

A à D : Coupes frontales

- A, B - Vue d'ensemble (A) et de détail (B) de l'extrémité postérieure de *Nereis diversicolor*. Les plages immunoréactives (\blacktriangle) envers l'anticorps monoclonal EG11 situées près de la basale du tube digestif (TD) apparaissent nettement au niveau de la zone de prolifération (ZP) mais n'existent pas dans le pygidium (PY).
- C - Extrémité postérieure de *Perinereis cultrifera* : Immunoréactivité de la zone de prolifération (ZP) et du pygidium (PY) envers l'anticorps polyclonal PYA15.
- D - Blastème de régénération une semaine après l'amputation des 20 derniers segments du corps de *Perinereis cultrifera* : Immunoréactivité au niveau du blastème (BL) envers l'anticorps polyclonal PYA15.

A, anus ; CA, cirres anaux ; ED, épithélium digestif ; NCA, nerf du cirre anal ; P, parapode ; VS, vaisseau sanguin.
La barre indique 140 μm .



de régénération présente une immunoréactivité importante envers un anticorps polyclonal anti-nHBGFs (planche IIID). La planche IIIC montre qu'une partie postérieure non lésée présente une immunoréactivité importante, en utilisant ce même anticorps polyclonal, au niveau de la zone de croissance et du pygidium

4 : Discussion

Les premières données obtenues semblent indiquer que les nHBGFs pourraient avoir un rôle important dans les processus de croissance et de régénération. En effet, si des molécules apparentées aux FGFs sont présentes à la fois dans une zone en croissance et dans une zone quiescente il apparaît qu'elles existent en quantité plus importante dans la zone en prolifération que dans la zone quiescente. Par ailleurs, nous pouvons constater une augmentation importante des sites de fixation spécifique à basse affinité dans la zone quiescente par rapport à une zone en croissance. Ce fait pourrait être l'élément majeur qui différencie ces deux zones. En effet, il a été montré que les récepteurs à haute affinité sont également présents dans les zones quiescentes ; cependant, l'intensité des bandes marquées correspondant à la quantité des récepteurs, est plus faible par rapport à ceux d'une zone en croissance. Il est possible qu'il existe un taux liminaire de sites récepteurs dans les zones quiescentes, inaccessibles aux nHBGFs qui seraient stockés au niveau des sites de fixation à basse affinité. Lors d'un traumatisme, tel qu'une amputation, les nHBGFs pourraient être libérés par des processus enzymatiques qui restent à définir. Il y aurait expression des sites récepteurs permettant la prolifération cellulaire et la formation d'un blastème de régénération. Lors de la différenciation tissulaire et l'arrêt des proliférations cellulaires, le phénomène inverse pourrait se produire. Celle-ci pourrait être due à une diminution de l'expression des récepteurs lorsque le taux de nHBGFs disponibles diminue consécutivement à l'augmentation des sites de fixation à basse affinité ayant la capacité de stocker le facteur de croissance. De même, nous avons montré que des fluctuations du taux de sites récepteurs à haute et à basse affinité (Hondermarck et *al.*, 1990) existent au cours du développement placentaire chez la souris. En effet, nous avons observé, dans ce cas, que le nombre de sites de fixation à haute affinité diminue alors que les sites de fixation à basse affinité augmentent fortement. Il est donc possible, dans le cas des

néréidiens, que les données obtenues puissent suggérer un rôle important des sites à basse affinité qui pourraient piéger les nHBGFs et réguler ainsi l'action de ces facteurs.

B : Angiogenèse

Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé une espèce à phase épitoque : *Perinereis cultrifera*. Cette espèce, à l'approche de la reproduction, subit de profondes modifications somatiques notamment au niveau de la musculature (Defretin et Wissocq, 1969), au niveau du réseau sanguin (Lecerf, 1963) où l'on observe une augmentation très importante de la vascularisation et au niveau du tube digestif qui régresse (Durchon et Joly, 1978). Ces modifications morphologiques se traduisent par la transformation de certaines parties du corps. Les parties de l'animal les moins transformées sont les segments antérieurs : du prostomium au 18^{ème} segment pour les femelles et du prostomium au 15^{ème} segment pour les mâles. Dans le but de déterminer si les taux de nHBGFs et celui des sites de fixation fluctuent, nous avons effectué des prélèvements de parties antérieures et de parties postérieures de mâles et de femelles en phase épitoque avancée. Par ailleurs, nous avons choisi comme témoins des *Perinereis cultrifera* encore sexuellement indifférenciées. Dans ce cas, la partie antérieure a été prélevée du prostomium jusqu'au 16^{ème} segment.

1 : Quantification des nHBGFs au niveau des différentes parties du corps de *Perinereis cultrifera*

56 mg de protéines de chacune des deux portions du corps sont passés sur une colonne d'héparine immobilisée de 1 ml. Les molécules affines pour l'héparine, après rinçage de la colonne, ont été éluées par 2 ml de PBS 1.2 M NaCl. Les résultats obtenus par ELISA sont présentés dans la figure 17. Il apparaît, dans tous les cas, que le taux de matériel immunoréactif est plus important dans la partie antérieure que dans la partie postérieure. L'extrait de la partie postérieure des jeunes *Perinereis cultrifera* présente une immunoréactivité de 50% inférieure à celle de la partie antérieure. De plus, on observe une diminution du taux de nHBGFs au niveau de ces deux parties chez des animaux épitoques. Cette diminution est de 10% environ au niveau de la partie antérieure des mâles et de 50% environ chez les femelles. Par ailleurs, une

diminution de 40% de ce taux est observée dans la partie postérieure des mâles épitoques et de 80% chez les femelles par rapport au taux de la partie postérieure des *Perinereis cultrifera* encore sexuellement indifférenciées.

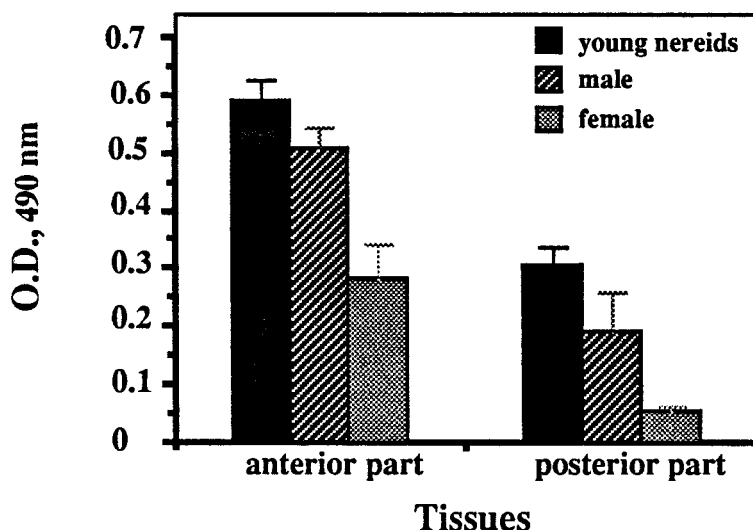


Figure 17 : Fluctuation du taux des nHBGFs immunodétectés par un anticorps anti-FGF basique chez de jeunes *Perinereis cultrifera* (■) chez des mâles en phase épitoque (▨) et chez des femelles en phase épitoque (▩)

Les données obtenues représentent la moyenne \pm l'écart-type de 2 expérimentations

2 : Quantification des sites de fixation du FGF dans les tronçons antérieurs et postérieurs

- Chez les *Perinereis cultrifera* encore sexuellement indifférenciées ou en phase atoque, on observe, comme le montre la figure 18, la présence de deux classes de sites de fixation spécifique à la fois au niveau de la partie antérieure et au niveau de la partie postérieure. La première classe de sites correspondant aux sites de fixation à haute affinité est définie par un Kd de 61 pM et une capacité membranaire de 210 fmoles / mg de protéines membranaires dans la partie antérieure ; ces sites sont caractérisés dans la partie postérieure par un Kd de 51 pM et une capacité de 290 fmoles / mg de protéines membranaires (tableau VI). En ce qui concerne la

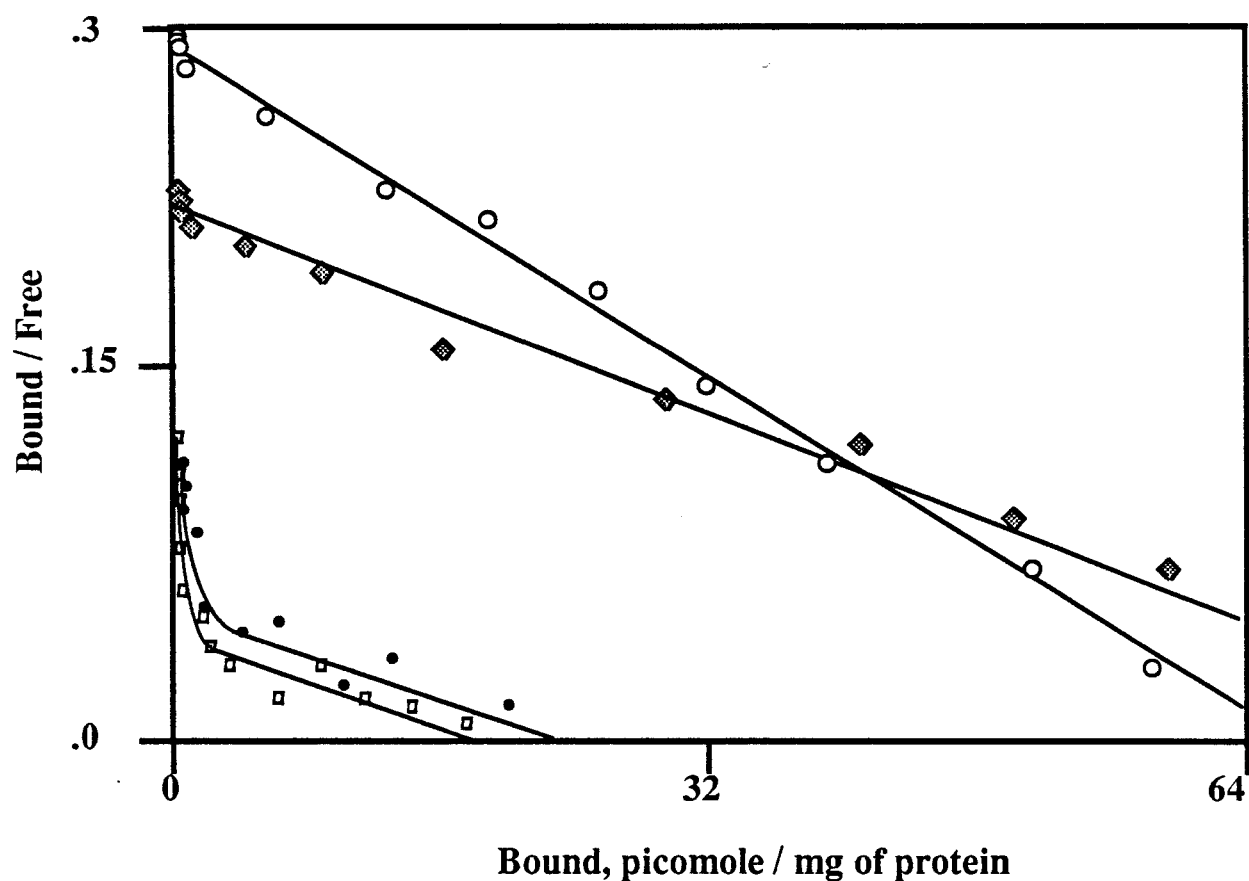


Figure 18 : Analyse de Scatchard des études par compétition entre du FGF basique iodé et du FGF basique non radiomarqué au niveau de préparations membranaires de *Perinereis cultrifera*

- Partie postérieure de *Perinereis cultrifera* en phase atoque (●)
- Partie antérieure de *Perinereis cultrifera* en phase atoque (■)
- Partie antérieure de *Perinereis cultrifera* mâles en phase épitoque (◆)
- Partie antérieure de *Perinereis cultrifera* femelles en phase épitoque (○)

Tissues	High affinity binding sites		Low affinity binding sites	
	Kd (pM)	R1 (fmol/mg)	Kd (nM)	R2 (pmol/mg)
atoque ant. part	61 (20)	210 (160)	2 (1)	25 (15)
atoque post. part	51 (10)	290 (125)	3 (2)	30 (10)
female ant. part (epitoky)	ND	ND	2 (0.5)	71 (20)
female post. part (epitoky)	ND	ND	ND	ND
male ant. part (epitoky)	ND	ND	4 (2)	100 (30)
male post. part (epitoky)	ND	ND	ND	ND

Tableau VI : Données obtenues après linéarisation de Scatchard des études de compétition entre le FGF basique iodé et le FGF basique non radiomarqué au niveau des parties antérieures et postérieures de *Perinereis cultrifera* en phase atoque et en phase épitoke.

- Kd : Constante de dissociation
- R1 : Capacité membranaire des sites de fixation à haute affinité
- R2 : Capacité membranaire des sites de fixation à basse affinité
- ND : non détecté

Les données obtenues correspondent à la moyenne de 4 analyses au niveau d'une détermination ; entre parenthèses l'écart type

seconde classe de sites, elle est caractérisée, respectivement pour les tronçons antérieurs et postérieurs, par un K_d de 2 nM et de 3 nM et par une capacité membranaire de 25 et 30 pmoles / mg de protéines membranaires (tableau VI).

- Chez les femelles en phase épitoque, une seule classe de sites de fixation a pu être détectée au niveau de la partie antérieure (figure 18). Cette classe est définie par un K_d de 2 nM et par une capacité de 71 pmoles / mg de protéines membranaires. Dans les parties postérieures, aucune classe de sites de fixation n'a pu être mise en évidence (tableau VI).

- Chez les mâles en phase épitoque, les sites de fixation spécifique, à l'instar des femelles en phase épitoque, n'ont pas pu être détectés (tableau VI). Au niveau des parties antérieures, une classe de sites à basse affinité a pu être mise en évidence (figure 18). Celle-ci est caractérisée par un K_d de 4 nM et par une capacité de 100 pmoles / mg de protéines membranaires.

3 : Discussion

Nous pouvons constater que, chez les jeunes *Perinereis cultrifera*, la proportion de sites à haute et à basse affinité est comparable entre la partie antérieure et la partie postérieure. Au niveau des mâles et des femelles épitoques, seules les parties antérieures, qui morphologiquement sont les zones les moins transformées et où la néoformation de capillaires est nulle, possèdent encore des sites de fixation à basse affinité alors que les parties postérieures ne présentent plus de sites de fixation. Par ailleurs, le taux de nHBGFs est plus important dans les parties antérieures que dans les parties postérieures tant chez les *Perinereis cultrifera* en phase atoque que chez les individus en phase épitoque terminale. Il est possible qu'au cours de la vie du néréidien, le taux des sites de fixation à basse affinité augmente car celui-ci est relativement faible chez les animaux encore sexuellement indifférenciés alors qu'il est nettement plus important chez les animaux proches de la maturité génitale. La proportion de sites à basse affinité augmenterait donc globalement en fonction de l'âge. Par ailleurs, la corrélation entre un taux de nHBGFs très faible et l'absence de sites de fixation spécifique dans les parties postérieures des *Perinereis cultrifera* en phase épitoque semblerait indiquer qu'au cours des profonds remaniements somatiques, les sites récepteurs à basse affinité disparaissent et doivent

vraisemblablement libérer les nHBGFs. Le ou les rôle(s) de ces nHBGFs, dans ce cas, est (sont) encore à déterminer car cette étude n'a pas permis de définir si les nHBGFs pouvaient avoir un rôle dans le cadre des processus où l'angiogenèse est importante. Il est vraisemblable que les stades que nous avons utilisés et qui correspondent à des néréïs dont l'épitoque est achevée soient trop avancés pour étudier ce problème. Il conviendra à l'avenir d'étudier les stades précoces de l'épitoque afin de mieux cerner ce problème.

DISCUSSION GENERALE - CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence et caractérisé pour la première fois des polypeptides apparentés aux FGFs de vertébrés chez des annélides polychètes marines. Ces polypeptides ont été appelés "nereid heparin-binding growth factors" (nHBGFs) car ils possèdent une affinité pour l'héparine et sont capables de stimuler la prolifération des fibroblastes ATCC CCL39 en culture. Chez *Nereis diversicolor*, deux formes de nHBGFs ont été détectées : l'une possède un poids moléculaire proche de 20 kDa, l'autre un poids moléculaire proche de 19 kDa.

Certains critères semblent indiquer que ces molécules s'apparentent au FGF acide de vertébrés car non seulement elles sont immunodétectées par un anticorps anti-FGF acide de bovin, mais leur affinité pour l'héparine est proche de celle du FGF acide de vertébrés. En effet, les nHBGFs sont élués en présence de 1,2 M NaCl alors que les FGFs acides sont élués de l'héparine-Sepharose entre 0,9 et 1,3 M NaCl. Par ailleurs, tout comme pour le FGF acide de vertébrés (Thomas et al., 1984 ; Ulrich et al., 1986 ; Wagner et Damore, 1986), l'activité mitogène des nHBGFs sur les fibroblastes ATCC CCL39 est potentialisée *in vitro* par l'héparine. Enfin ces molécules ont été caractérisées comme étant des polypeptides possédant un point isoélectrique de 6,4 alors que celui du FGF acide est de 5,6 (Maciag *et al.*, 1979 ; Thomas *et al.*, 1980). Cependant, les nHBGFs, s'ils se rapprochent du FGF acide de vertébrés par les critères précités, possèdent également une parenté immunologique avec le FGF basique car ils sont immunodétectés par un anticorps anti-FGF basique de bovin. En outre, les nHBGFs présentent un poids moléculaire proche de 19-20 kD alors que la forme la plus lourde de FGF acide répertoriée jusqu'à présent est de 18 kDa (Jaye *et al.*, 1986). Par contre, il a été montré qu'une forme de FGF basique à 20 kDa est présente dans les cellules endothéliales normales et transformées (Maier *et al.*, 1990) ; des formes de FGFs basiques possédant des poids moléculaires de 22 et 25 kDa ont été purifiées respectivement chez le rat et le cobaye (Presta et al, 1988 ; Moscatelli et al., 1987). D'autres formes plus lourdes enfin ont été immunodétectées chez le bovin (Grothe et al., 1990), le rat et la souris (Iberg et Klagsbrun, 1990).

Le fait que les nHBGFs présentent à la fois des caractéristiques de FGF acide et de FGF basique de vertébrés ne sera vraiment clarifié que lorsque les séquences en acides aminés des

formes de poids moléculaires proches de 20 et de 19 kDa seront connues. Nous pourrions alors apprécier le degré d'homologie, d'une part, des différents nHBGFs entre eux et d'argumenter en faveur d'un gène unique ou de gènes différents, et d'autre part, avec les FGFs de vertébrés. La purification des nHBGFs a été effectuée dans ce but et leur séquençage sera réalisé dans le laboratoire du professeur R. Bradshaw (Irvine, USA). Cependant, bien que les nHBGFs possèdent des épitopes communs aux FGFs acide et basique de vertébrés, ces molécules sont capables de stimuler la prolifération de cellules de vertébrés et donc d'interagir au niveau de récepteurs spécifiques permettant l'effet biologique. Ce dernier argument semble être en faveur d'une analogie structurale et fonctionnelle. De plus, nous avons montré que les nHBGFs sont capables de déplacer le FGF basique au niveau de sites récepteurs sur des préparations membranaires de *Nereis diversicolor*. Cette étude a permis de définir, d'une part, que des sites d'interaction spécifique au FGF existent chez les néréidiens et, d'autre part, de les caractériser. Il apparaît que le modèle récepteur néréidien est analogue à celui des vertébrés. En effet, deux sites de fixation spécifique ont pu être mis en évidence : des sites de fixation à haute affinité caractérisés par un Kd de 30 pM et une capacité membranaire de 100 fmoles / mg de protéines membranaires correspondant à des formes récepteurs de poids moléculaires de l'ordre de 165, 105 et 55 kDa et des sites à basse affinité caractérisés par un Kd de 5 nM et une capacité membranaire de 30 pmoles / mg de protéines membranaires. Il est pour l'instant admis que la transmission du signal s'effectue via les sites de fixation à haute affinité (Moscatelli, 1987) alors que le rôle des sites de fixation à basse affinité est actuellement mal défini (Moscatelli, 1987).

Si la fonction des FGFs *in vivo* est encore mal connue, il apparaît que ces molécules pourraient intervenir au cours de l'embryogenèse (Mercola et al., 1988), de la régénération tissulaire (Baird et al., 1990; Boilly et al., 1990), de l'angiogenèse (Folkman et al., 1987), de la croissance placentaire (Moscatelli et al., 1986b; Hondermarck et al., 1990a) et de la survie neuronale (Gospodarowicz et al., 1988). Comme les nHBGFs interagissent au niveau des mêmes sites récepteurs que les FGFs, il est possible que les nHBGFs puissent avoir des rôles similaires chez les néréidiens. En effet, si la quantité de nHBGFs varie faiblement entre une zone en prolifération et une zone quiescente, il est à noter que la proportion de sites à basse

affinité est plus importante dans une zone quiescente que dans une zone en croissance dont les capacités membranaires sont respectivement de 102 et 30 pmoles / mg de protéines membranaires. En ce qui concerne les sites à haute affinité, qui correspondent à des formes récepteurs de 165, 105 et 55 kDa, ils apparaissent non seulement au niveau de la zone en croissance ($K_d=60$ pM ; capacité=190 fmoles / mg de protéines membranaires) mais également au niveau de la zone en quiescence. Il est à noter que le nombre de récepteurs est 2 à 3 fois plus faible dans la zone en quiescence que dans une zone en croissance sur la base de l'intensité des complexes radiomarqués après pontage moléculaire. Le fait que les zones en croissance se caractérisent, par rapport aux zones en quiescence, par un taux élevé de sites à haute affinité indique que la prolifération cellulaire (limitée dans les zones quiescentes par rapport aux zones de croissance) serait régulée par les sites de fixation à basse affinité ; cette régulation serait assurée par piégeage au niveau des sites de fixation à basse affinité des nHBGFs dont on sait qu'ils sont présents dans les deux zones.

Tous ces éléments suggèrent que les nHBGFs pourraient intervenir dans la croissance et la régénération chez les *Nereidae*. Il conviendra néanmoins de définir le rôle de ces molécules *in vivo* par l'étude de la croissance, de la régénération et de l'angiogenèse en présence d'un apport de facteurs de croissance et inversement en neutralisant l'activité de ces facteurs par des anticorps monoclonaux. D'autre part, si l'immunohistologie a permis de localiser les nHBGFs en utilisant des anticorps dirigés contre ces molécules, il reste à déterminer les sites de production de ces molécules notamment par hybridation *in situ* et donc de rechercher en premier lieu le ou les gènes de ces polypeptides.

D'autre part, comme la quantité de sites d'interaction à haute et à basse affinité varie en fonction de la position des segments sur l'axe antéro-postérieur et de l'âge des animaux, il serait intéressant de déterminer la structure des sites de fixation à basse affinité afin de mieux comprendre leur rôle chez les néréidiens. Enfin, l'utilisation d'anticorps anti-récepteur aux FGFs (en collaboration avec M. Schelling, Pullman, USA) devraient permettre de localiser les cellules cibles.

Ces études nous permettront d'apprécier le degré d'homologie tant au niveau des structures des HBGFs de vertébrés et d'invertébrés qu'au niveau des modalités d'interaction de ces molécules avec leurs sites de fixation membranaires et d'appréhender leur rôle biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz and Fiddes, J.C. (1986a). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*, 233: 545-548.
- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J.C. (1986b). Human basic fibroblast growth factor : nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*, 5: 2523-2528.
- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A. and Fiddes, J.C. (1986c). Human basic fibroblast growth factor : nucleotide sequence, genomic organization, and expression in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:657-668
- Allen, R.E., Dodson, M.V., Luiten, L.S. (1984). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation by bovine pituitary fibroblast growth factor. *Exp. Cell. Res.* 152 : 154-160
- Baird, A., Esch, F., Böhlen, P., Ling, N., Gospodarowicz, D. (1985a). Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney : homology with basic fibroblast growth factor. *Regul Pept* 12 : 201-213
- Baird, A., Esch, F., Gospodarowicz, D., Guillemin, R. (1985b). Retina and eye-derived endothelial cell growth factors : partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 24:7855-7860
- Baird, A., Culler, F., Jones, K.L. and Guillemin, R. (1985c). Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet*, 2: 563.
- Baird, A., Hsueh, J.W. (1986). Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone : differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul Pept* 16 : 243-250
- Baird, A., Ling, N. (1987). Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro : implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem Biophys Res Commun* 142 : 428-435
- Baird, A., Schubert, D., Ling, N. and Guillemin, R. (1988). Receptor and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2324-2324.
- Baird, A. and Walicke, P. (1989). Fibroblast growth factors. *British Medical Bull.* 45 : 438-452
- Barritault, D., Arruti, C., Courtois, Y. (1981). Is there an ubiquitous growth factor in the eye? Proliferation induced in different cell types by eye-derived growth factor. *Differentiation* 18:29-42
- Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C.M., Folkman, J. and Vlodavsky, I. (1989). Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparinase and heparin-like molecules. *Biochemistry*, 28: 1737-1743.
- Basilico, C., Curatola, A.M., Newman, K., Talarico, D., Mansukhani, A., Ittmann, M., Velcich, A., Delli-Bovi, P. (1989). Expression and properties of the growth factor encoded in the K-fgf oncogene. *J Cell Biochem (Suppl. 13b)* 78

- Bellvé, A.P., Feig, L.A. (1984). Cell proliferation in the mammalian testis: biology of the seminiferous growth factor (SGF). *Recent Prog. Horm. Res.*, 40 : 531-567
- Bertout, M., Dhainaut, A. (1971). Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenèse de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. *Gen Comp Endocr* 17 : 371-387
- Blam, S.B., Tischer, E., Abraham, J.A., Aaronson, S. (1989). Expression of acidic fibroblast growth factor in NIH/3T3 cells with and without the addition of a secretion signal sequence. *J Cell Biochem (Suppl. 13b)* 152
- Blanquet, P.R., Paillard, S., Courtois, Y. (1988). Influence of fibroblast growth factor on phosphorylation and activity of a 34 kDa lipocortin-like protein in bovine epithelial lens. *FEBS Lett* 229:183-187
- Blanquet, P.R., Patte, C., Fayein, N., Courtois, Y. (1989). Identification and isolation from bovine epithelial lens cells of two basic fibroblast growth factor receptors that possess bFGF enhanced phosphorylation activities. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160 : 1124-1131
- Böhlen, P., Baird, A., Esch, F., Ling, N., Gospodarowicz, D. (1984). Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5364-5368
- Böhlen, P., Baird, A., Esch, F. and Gospodarowicz, D. (1985). Acidic fibroblast growth factor (FGF) from bovine brain : amino-terminal sequence and comparison with basic FGF. *EMBO J.*, 4: 1951-1956
- Boilly, B. (1965). Localisation des cellules de régénération chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide polychète). *C. R. Acad. Sc.* 261 : 2009-2011
- Boilly, B. (1974). Mode d'action du cerveau sur la régénération caudale de *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète). *Wilhelm Roux'Archiv* 174:195-209
- Boilly, B., Cavanaugh, C., Thomas, D., Hondermarck, H., Bryant, S. and Bradshaw, R. (1990). Presence of acidic FGF and its binding sites in the axolotl regeneration blastema. (soumis dans *Developmental Biology*)
- Boilly-Marer, Y. (1972). Etude histologique et ultrastructurale du pygidium de néréidiens atoques et épitoques (Annélides Polychètes). *Arch Anat Microsc et Morph. exp* 61:381-402
- Boilly-Marer, Y. (1973). Etude cytochimique et cytologique de l'évolution des cirres parapodiaux au cours de l'hétéronéréidation chez quelques Néréidiens (Annélides Polychètes) : Differentiation de chémorécepteurs sexuels. *J Microscopie* 18:187-206
- Bouché, G., Gas, N., Prats, H., Balsin, V., Tauber, J.P., Teissié, J. and Amalric, F. (1987). bFGF enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing GO-G1 transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6770-6774
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254

- Buckley-Sturrock, A., Woodward, S.C., Senior, R.M., Griffin, G.L., Klagsbrun, M., Davidson, J.M. (1989). Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J Cell Physiol* 138:70-78
- Buntrock, P., Buntrock, M., Marx, I., Kranz, D., Jentzsch, K.D., Heder, G. (1984). Stimulation of wound healing using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. *Exp Pathol* 26:247-254
- Burgess, W. H., Mehlman, T., Friesel, R., Johnson, W. V. and Maciag, T. (1985). Multiple forms of endothelial cell growth factor. Rapid isolation, biological and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.*, 260: 11389-11392.
- Burgess, W.H., Mehlman, T., Marshak, D.R., Fraser, B.A. and Maciag, T. (1986). Structural evidence that endothelial cell growth factor beta is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7216-7220.
- Burgess, W. and Maciag, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *A Rev Biochem.* 58:575-606
- Burrus, L.W., Olwin, B.B. (1989). Isolation of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factor from embryonic chick. *J Biol Chem* 264:18647-18653
- Chambard J.C., Paris S., L'Allemain G., Pouyssegur J. (1987). Two growth factors signalling pathways in fibroblasts distinguished by pertussis toxin. *Nature* 326 : 800-803
- Conn, G., Hatcher, V.B. (1984). The isolation and purification of two anionic endothelial cell growth factors from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124: 262-268
- Connolly, D.T., Stoddard, B.L., Harakas, N.D., Feder, J. (1987). Human fibroblast-derived growth factor is a mitogen and chemoattractant for endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 144:705-712
- Cordeiro, P.G., Seckel, B.R., Lipton, S.A, D'Amore, P.A., Wagner, J. and Madison, R. (1989). Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast. Recons. Surg.*, 83: 1013-1019.
- Coughlin, S.R., Barr, P.J., Cousens, L.S., Fretto, L.J. and Williams, L.T. (1988). Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity in vivo. *J. Biol. Chem.*, 263: 988-993.
- Courty, J., Chevalier, B., Moenner, M., Loret, C., Lagente, O., Böhlen, P., Courtois, Y., Barritault, D. (1985a). Evidence for FGF-like growth factor in adult bovine retina : analogies with EDGF 1. *Biochem Biophys Res Commun* 136:102-108
- Courty, J., Loret, C., Moenner, M., Chevallier, B., Lagente, O., Courtois, Y., Barritault, D. (1985b). Bovine retina contains three growth factor activities with different affinity for heparin : eye-derived growth factor I, II, and III. *Biochimie* 67:265-269
- Courty, J., Loret, C., Chevallier, B., Moenner, M. and Barritault, D. (1987). Biochemical comparative studies between eye and brain-derived growth factors. *Biochimie.*, 69: 511-516.

- Courty, J., Dauchel, M.C., Mereau, A., Badet, J. and Barritault, D. (1988). Presence of basic fibroblast growth factor receptors in bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.*, 263: 11217-11220.
- Crabb, J.W., Armes, G.L., Johnson, C.M., Mc Keehan, W.L. (1986). Characterization of multiple forms of prostatropin (prostate epithelial cell growth factor) from bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 136:1155-1161
- Cuevas, P., Carcella, F., Baird, A., Guillemin, R. (1988). Basic fibroblast growth factor (bFGF) increases peripheral nerve regeneration rate. Seventh general meeting of the society of Neurochemistry, June 12-17 (Abstract)
- Danielsen, N., Pettman, B., Vahlsing, H.L., Manthorpe, M., Varon, S. (1988). Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res* 20:320-330
- Dauchel, M-C., Courty, J., Méreau, A. and Barritault, D. (1989). Modulation of mitogenic activity and cellular binding of basic fibroblast growth factor by basic proteins. *J Cell Biochem* 39 : 411-420
- Davidson, J.M., Klagsbrun, M., Hill, K.E., Buckley, A., Sullivan, R., Brewer, S., Woodward, S.C. (1985). Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J Cell Biol* 100:1219-1227
- Defretin, R., Wissocq, J.C. (1969). La musculature longitudinale, dorsale et ventrale de *Nereis irrorata* Malmgren (Annélide Polychète) atouques et épitoques. *C.R. Acad Sc* 269:2120-2127
- Delli-Bovi, P., Curatola, A.M., Kern, F.G., Greco, A., Ittmann, M. and Basilico, C. (1987). An oncogene isolated by transfection of kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family. *Cell*, 50: 730-737.
- Dhainaut, A. (1970). Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). II Ovogenèse expérimentale en absence d'hormone cérébrale. *Z Zellforsch* 96:390-404
- Dhainaut, A., Porchet, M. (1967) Evolution ovocytaire en l'absence d'hormone cérébrale chez *P. cultrifera*. *C.R. Acad Sci* 264:2807-2810
- Dickson, C. and Peters, G. (1987). Potential oncogene product related to growth factors. *Nature*, 326: 833-835.
- DiMario, J., Buffinger, N., Yamada, S., Strohman, R.C. (1989). Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystropic (mdx) mouse muscle. *Science* 244:688-690
- Dionne, G.A, Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1990). Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factor. *EMBO J.*, 9.
- Durchon, M. (1952). Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. *Ann Sc Nat Zool et Biol Anim* 14:119-206
- Durchon, M. (1956a). Influence du cerveau sur les processus de régénération caudale chez les Néréidiens. *Arch Zool exp et gen* 94:1-9

- Durchon, M. (1956b) Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoïque chez les Néréidiens. *Ann Sc Nat Zool et Biol Anim* 18:269-273
- Durchon, M. (1962). Induction et inhibition expérimentale de l'épitoïque par homogreffes chez les Néréidiens. *Bull Soc Zool Fr* 87:575-582
- Durchon, M., Marcel, R. (1962). Influence du cerveau sur la régénération postérieure chez *N. diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). *C.R. Soc Biol Fr* 156:661-663
- Durchon, M., Joly, P. (1978). *L'endocrinologie des invertébrés*. Ed. PUF ; le biologiste 53-74
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8 : 871-874
- Esch, F., Baird, A., Ling, N., Ueno, N., Hill, F., Denoroy, L., Klepper, R., Gospodarowicz, D., Böhlen, P. and Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6507-6511.
- Esch, F., Ueno, N., Baird, A., Hill, F., Denoroy, L., Ling, N., Gospodarowicz, D. and Guillemin, R. (1986). Primary structure of bovine acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133: 554-562.
- Fausser, B., Baird, A., Hsueh, A. (1988). Fibroblast growth factor inhibits luteinizing hormone-stimulated androgen production by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 123:2935-2941
- Feige, J.J. and Baird, A. (1988). Glycosylation of the basic fibroblast growth factor receptor. The contribution of carbohydrate to receptor function. *J. Biol. Chem.*, 263: 14023-14029
- Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G., Mitchell, R. and Gospodarowicz, D. (1987). Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 5773-5777.
- Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.F., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24 : 5480-5486
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D., Aaronson, S.A. (1989). Human kgf is fgf-related with properties of a paracrine effector of epithelial-cell growth. *Science* 245 : 752-755
- Flaumenhaft, R., Moscatelli, D., Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1989). Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor : matrix as a source of growth factor for long term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J. Cell. Phys. Biol.* 140 : 75-81
- Florkiewicz, R.Z. and Sommer, A. (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non- AUG codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3978-3981.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors, *Science*, 235: 442-447.

- Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., Vlodavsky, I. (1988). Heparin-binding angiogenic protein - basic fibroblast growth factor - is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 130:393-400
- Fredj-Reygrobelle, Plouet, J., Delayre, T., Baudouin, F., Lapalus, P. (1987). Effects of aFGF and bFGF on wound healing in rabbit corneas. *Curr Eye Res* 6:1205-1209
- Friesel, R., Burgess, W.H., Mehlman, T. and Maciag, T. (1986). The characterization of the receptor for the endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. *J. Biol. Chem.*, 261: 7581-7584
- Friesel, R., Burgess, W.H., Maciag, T. (1989). Heparin-binding growth factor stimulates tyrosine phosphorylation in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 9:1857-1865
- Gautschi-Sova, P., Frater-Schroeder, M., Müller, T. and Böhlen, P. (1986a). Chemical and biological characterization of a truncated form of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Eur. J. Biochem.*, 160: 357-361.
- Gautschi-Sova, P., Müller, T. and Böhlen, P. (1986b). Amino acid sequence of human acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140: 874-880.
- Gautschi-Sova, P., Frater-Schroeder, M., Jiang, Z.P. and Böhlen, P. (1987). Acidic fibroblast growth factor is present in non-neural tissue: isolation and chemical characterization from bovine kidney. *Biochemistry*, 26: 5844-5847
- Gensburger, C., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. (1987). Brain basic fibroblast growth factor stimulates proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett* 217:1-5
- Gimenez-Gallego, G., Rodkey, K., Bennet, C., Rios-Candelore, M., Di Salvo, J. and Thomas, K.A. (1985). Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science*, 230: 1385-1388
- Gimenez-Gallego, G., Conn, G., Hatcher, V.B. and Thomas, K.A. (1986a). The complete amino acid sequence of human brain-derived acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 611-617
- Gimenez-Gallego, G., Conn, G., Hatcher, V.B. and Thomas, K.A. (1986b). Human brain-derived acidic and basic fibroblast growth factors : aminoterminal sequences and specific mitogenic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135: 541-548
- Globus, R.K., Patterson-Buckendahl, P., Gospodarowicz, D. (1988). Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factors. *Endocrinology* 123:98-105
- Gonzalez, A.M., Buscaglia, M., Ony, M. and Baird, A. (1990). Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus : localization in the basement membranes of diverse tissues. *J. Cell. Biol.*, 110: 753-765
- Gospodarowicz, D. (1974). Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, 249: 123-129.
- Gospodarowicz, D. (1975). Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, 250: 2515-2520.
- Gospodarowicz, D. (1976). Humoral control of cell proliferation : the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing and neoplastic growth. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 9: 1-19.

- Gospodarowicz, D., Bialecki, H., Greenberg, G. (1978). Purification of fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem* 253:3736-3743
- Gospodarowicz, D., Vlodavsky, I., Savion, N., Tauber, J.P. (1980). Control of the proliferation and differentiation of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor. In : Blomm F (ed) *Peptides : integrators of cell and tissue function*. Raven, New York, pp1-37
- Gospodarowicz D, Mescher AL (1981) Fibroblast growth factor and vertebrate regeneration. In : Riccardi VM, Mulvihill JJ (eds) *Advances in neurology : neurofibromatosis*. Raven, New York, pp 149-171
- Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M., Baird, A., Böhlen, P. (1984a). Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6963-6967.
- Gospodarowicz, D. (1984b). Preparation of extracellular matrices produced by cultured bovine corneal endothelial cells and PF-HR-9 teratocarcinoma cells : Their use in the study of cell proliferation and differentiation. *Cell* 1:275-294
- Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M., Baird, A., Esch, F. and Böhlen, P. (1985). Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117: 2383-2391.
- Gospodarowicz, D. and Cheng, J. (1986a). Heparin protects basic and acidic fibroblast growth factor from inactivation. *J. Cell. Physiol.*, 128: 474-484.
- Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M., Baird, A., Esch, F. and Böhlen, P. (1986b). Isolation of fibroblast growth from bovine adrenal gland: physiochemical and biological characterization. *Endocrinology*, 118: 82-90.
- Gospodarowicz, D., Neufeld, G. and Schweigerer, L. (1987). Fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Endocrin.*, 46: 187-204.
- Gospodarowicz, D. (1989). Fibroblast growth factor. In : Pimental E, Perucho M (eds) *Critical reviews in oncogenesis*. CRC Press: Boca Raton, FL. 1-26
- Grothe, C., Zachmann, K., Unsicker, K. and Westermann, R. (1990). High molecular weight forms of basic fibroblast growth factor recognized by a new anti-bFGF antibody. *FEBS Letters*, 260 : 35-38
- Halaban, R., Ghosh, S., Baird, A. (1987). bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In vitro Cell Dev Biol* 23:47-52
- Halaban, R., Kwon, B., Ghosh, S., Delli Bovi, P. and Baird, A. (1988). bFGF as an autocrine growth factor in human melanomas. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2933-2941.
- Hanneken, A., Luty, G., McLeod, D.S., Robey, F., Harvey, A., Hjelmeland, L. (1989). Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. *J Cell Physiol* 138:115-120
- Hauenschild, C. (1956). Hormonale Hemmung der Geschlechtsreife und Metamorphose bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. *Z. Naturforsch* 11B:125-132

- Hauenschild, C. (1960). Abhängigkeit der Regenerationsleitung von der inneren Sekretion in Protopodium bei *Pl. dumerilii*. Z. Naturforsch 15b:52-53
- Hauschka, P.V., Mavrakos, A.E., Iafrati, M.D., Doleman, S. and Klagsbrun, M. (1986). Growth factors in bone matrix isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. J. Biol. Chem., 261: 12665-12674
- Heath, J.K., Paterno, G.D., Lindon, A.C. and Edwards, D.R. (1989). Expression of multiple heparin-binding growth factor species by murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Development 107 : 113-122
- Hondermarck, H. (1990). Expression des sites de fixation des FGFs acide et basique au cours du développement du cerveau de poulet. Thèse
- Hondermarck, H., Courty, J., Ledoux, D., Blanckaert, V., Barritault, D. and Boilly, B. (1990). Evidence of high and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor in mouse placenta. Biochem. Biophys. Res. Comm. 169 : 272-280
- Hondermarck, H. and Boilly, B. (1990). Characterization of fibroblast growth factor binding in regenerating limb blastemas of axolotl. European conference on tissue and post-traumatic regeneration. Geneva
- Huang, J.S., Huang, S.S., Kuo, M.D., (1986a). Bovine brain-derived growth factor. Purification and characterization of its interaction with responsive cells. J Biol Chem 261:11600-11607
- Huang, S.S. and Huang, J.S. (1986b). Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. J. Biol. Chem., 261: 9568-9571
- Huang, S.S., Kuo, M.D., Huang, J.S. (1986c). Transforming growth factor activity of bovine brain-derived growth factor. Biochem Biophys Res Commun 139:919-625
- Huang, S.S., Tsai, C.C., Adams, S.P. and Huang, J.S. (1987). Neuron localization and neuroblastoma cell expression of brain-derived growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 144: 81-87
- Hunter, W.M., and Greenwood, F.C. (1962). Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194, 495-496
- Iberg, N., and Klagsbrun, M. (1990). Growth factors : From genes to clinical application. eds by Vicki R. Sara et al., Raven Press, NY. 157-165
- Jakobovits, A., Shackelford, G.M., Varmus, H.E. and Martin, G. (1986). Two proto-oncogenes implicated in mammary carcinogenesis, int-1 and int-2, are independently regulated during mouse development. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 83: 78106-7810.
- James, R. and Bradshaw, R.A. (1984). Polypeptide growth factors. Ann. Rev. Biochem., 53: 259-292.
- Janet, T., Mische, M., Pettmann, B., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. (1987). Ultrastructural localization of fibroblast growth factor in neurons of rat brain. Neurosci. Letters 80 : 153-157

- Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. and Drohan, W.N. (1986). Human endothelial cell growth factor : cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science*, 233: 541-545
- Jaye, M., Lyall, R.M., Mudd, R., Schlessinger, J., Sarver, N. (1988). Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J* 7 : 963-969.
- Kan, M., Huang, J., Mansson P.E., Yasumitsu, H., Carr, B. and Mc Keehan, W.L. (1989). Heparin binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor) : a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7432-7436.
- Kardami, E., Spector, D. and Strohman, R.C. (1985). Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8044-8047.
- Kardami, E. and Fandrich, R.R. (1989). Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J. Cell. Biol.* 109 : 1865-1875
- Kato, F.A., Gospodarowicz, D.J. (1984). Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocytes culture maintained in serum-free medium. *J Cell Physiol* 120:354-363
- Kato, Y., Gospodarowicz, D. (1985). Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in presence of fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 100:477-485
- Kimelman, D. and Kirschner, M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF- β and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell*, 51: 869-877.
- Kimelman, D., Abraham, J.A., Haaparanta, T., Palisi, T.M. and Kirschner, M.W. (1988). The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: a role as a natural mesoderm inducer. *Science*, 242: 1053-1056.
- Klagsbrun, M. and Beckoff, M.C. (1980). Purification of cartilage-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, 255: 10859-10866.
- Klagsbrun, M. and Shing, Y. (1985). Heparin-binding affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 805-809.
- Klagsbrun, M., Sasse, J., Sullivan, R., Smith, J.A. (1986). Human tumor cells synthesize an endothelial growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2448-2452
- Klagsbrun, M., Smith, S., Sullivan, R., Shing, Y., Davidson, S., Smith, J., Sasse, J. (1987). Multiple forms of basic fibroblast growth factor : differential amino-terminal cleavages by tumor cell and brain-derived acid proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1839-1843
- Klagsbrun, M. and Folkman, J. (1990). *Angiogenesis*. eds Sporn and Roberts in Springer Verlag tome II : 549-574
- Kohnke-Godt, B., and Gabius, H-J. (1989). Heparin-binding lectin from human placenta : purification and partial characterization and its relationship to basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 28 : 6531-6538

- Kornbluth, S., Paulson E.K. and Hanafusa, H. (1988). Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 5541-5544.
- Kurokawa, T., Sasada, R., Iwane, M., Igarashi, K. (1987). Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. *GEBS Lett* 213:189-194
- Kurokawa, M., Doctrow, S., Klagsbrun, M. (1989). Neutralizing antibodies inhibit the binding of basic fibroblast growth factor to its receptor but not to heparin. *J Biol Chem* 264:7686-7691
- Laemmli, U. (1970). Clivage of structural protein during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685
- Lagente, O., Diry, M. and Courtoy, Y. (1986). Isolation of heparin-binding growth factors from dogfish (*Mustelus canis*) brain and retina. *FEBS Letters* 202 : 207-210
- Landshman, N., Belkin, M., Ben-Hanan, I., Ben-Chaim, O., Assia, E., Savion, N. (1987). Regeneration of cat corneal endothelium induced in vivo by fibroblast growth factor. *Exp Eye Res* 45:805-811
- Lathrop, B., Thomas, K., Glaser, L. (1985a). Control of myogenic differentiation by fibroblast growth factor is mediated by position in the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 101:2194-2198
- Lathrop, B., Olson, E., Glaser, L. (1985b). Control by fibroblast growth factor of differentiation in the BC3H1 muscle cell line. *J Cell Biol* 100:1540-1547
- Lecerf, J-L. (1963). Etude de l'appareil circulatoire de *Perinereis cultrifera* Grübe (Annélide Polychète). Diplôme d'étude supérieure.
- Ledoux, D., Mereau, A., Dauchel, M.C., Barritault, D. and Courty, J. (1989). Distribution of basic fibroblast growth factor binding sites in various tissue membrane preparation from adult guinea pig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159: 290-296.
- Lee, P.L., Jonhson, D.E., Cousens, L.S., Fried, V.A. and Williams, L.T. (1989). Purification and complementary cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*, 245: 57-60.
- Leibovitch, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., Nuseir, N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis alpha. *Nature* 329 : 630-632
- Lemmon, S.K., Bradshaw, R.A. (1983). Purification and partial characterization of bovine pituitary fibroblast growth factor. *J Cell Biochem* 21:195-208
- Libermann, T.A., Friesel, R., Jaye, M., Lyall, R.M., Westermarck, B., Drohan, W., Schmidt, A., Maciag, T. and Schlessinger, J. (1987). An angiogenic growth factor is expressed in human glioma cells. *EMBO J.*, 6: 1627-1632.
- Linkhart, T.A., Clegg, C.H., Hauschka, S.D. (1980). Control of mouse myoblast commitment to terminal differentiation by mitogens. *J Supramol Struct* 14:483-498

- Lipton, S.A., Wagner, J.A., Madison, R.D., D'Amore, P.A. (1988). Acidic fibroblast growth factor enhances regeneration of processes by postnatal retinal ganglion cells in culture. *Proc Natl Sci USA* 85:2388-2392
- Lobb, R.R. and Fett, J.W. (1984). Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry*, 23: 6295-6299
- Lobb, R.R., Alderman, E.M., Fett, J.W. (1985). Induction of angiogenesis by bovine brain derived class I heparin binding growth factor. *Biochemistry* 24:4969-4973
- Lobb, R.R., Sasse, J., Sullivan, R., Shing, Y., D'Amore, P., Jacobs, J. and Klagsbrun, M. (1986a). Purification and characterization of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J. Biol. Chem.*, 261: 1924-1928.
- Lobb, R.R., Rybak, S.M., StClair, D.K., Fett, J.W. (1986b). Lysates of two established human tumor lines contain heparin-binding growth factors related to bovine acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 861-867.
- Maciag, R., Cerundolo, J., Isley, S., Kelley, P.R., Forand, R. (1979). An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus : identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5674-5678
- Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R., Schreiber, A.B. (1984). Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal mitogen in bovine brain. *Science*, 225: 932-935.
- Magnaldo, I., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Moenner, M., Barritault, D. and Pouyssegur, J. (1986). The mitogenic signaling pathway of fibroblast growth factor is not mediated through phosphoinositide hydrolysis and protein kinase C activation in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 261: 16916-16922
- Maier, J.A.M., Rusnati, M., Ragnotti, G. and Presta, M. (1990). Characterization of a Mr 20,000 basic fibroblast growth factor-like protein secreted by normal and transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, 166: 354-361.
- Makris, A., Ryan, K.J., Yasumizu, T., Hill, C.L. and Zetter, B.R. (1984). The nonluteal porcine ovary as a source of angiogenic activity. *Endocrinology*, 115: 1672-1677
- Mansour, S.L., Martin, G.R. (1988). Four classes of mRNA are expressed from the mouse int-2 gene, a member of the FGF gene family. *EMBO J* 7:2035-2041
- Mansukhani, A., Moscatelli, D., Talarico, D., Levytska, V. and Basilico, C. (1990). A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 87: 4378-4382.
- Marics, I., Adélaide, J., Raybaud, F., Mattei, M.G., Coulier, F., Planche, J., De Lapeyriere, O. and Birnbaum, D. (1989). Characterization of the HST-related FGF.6 gene, a new member of the fibroblast growth factor gene family. *Oncogene*, 4: 335-340
- Matsuo, Y., Nishi, N., Matsui, S., Sansberg, A., Isaacs, J.T., Wada, F. (1987). Heparin binding affinity of rat prostatic growth factor in normal and cancerous prostates : partial purification and characterization of rat prostatic growth factor in Dunning tumor *Cancer Res* 47:188-192

- McKeehan, W.L., Crabb, J.W. (1987). Isolation and characterization of different molecular and chromatographic forms of heparin-binding growth factor-I from bovine brain. *Analyt Biochem* 164:563-569
- Méreau, A., Pieri, I., Gamby, C., Courty, J. and Barritault D. (1989). Purification of basic fibroblast growth factor receptors from bovine brain. *Biochimie* 71 : 865-871
- Mergia, A., Eddy, R., Abraham ,J.A., Fiddes, J.C. and Shows, T.B. (1986). The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 138: 644-651
- Merril, C.R. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels. *Science* 211: 1437-1438
- Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E., Rifkin, D.B. (1989). In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane : requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 108:671-682
- Milner, P.J., Li, Y-S., Hoffman, R.M, Kodner, C.M., Siegel, N.R., Deuel, T.F. (1989). A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N-terminal amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 165 : 1096-1103
- Mioh, H. and Cheng, J.K. (1987). Acidic heparin-binding growth factor transiently activates adenylate cyclase activity in human adult arterial smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 771-776
- Moenner, M., Chevallier, B., Badet, J. and Barritault, D. (1986). Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor, on bovine epithelial lens cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5024-5028
- Moenner, M., Badet, J., Chevallier, B., Tardieu, M., Courty, J. and Barritault, D. (1987a). Eye-derived fibroblast growth factor: receptors and early events studies. In : Rifkin D.B., Klagsbrun M. *Angiogenesis : mechanisms and pathology*. Current communications in molecular biology. Cold Spring Harbor, New York, pp 52-57
- Moenner, M., Magnaldo, I., L'Allemain, G., Barritault, D., Pouyssegur, J. (1987b). Early and late mitogenic events induced by FGF on bovine epithelial lens cells are not triggered by hydrolysis of polyphosphoinositides. *Biochem Biophys Res Commun* 146:32-40
- Montesano, R., Vasalli, J.D., Baird, A., Guillemin, R. and Orci, L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7297-7301
- Morrison, R.S., De Vellis, J., Lee, Y.L., Bradshaw, R., Eng, L.F. (1985). Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes. *J Neurosci Res* 14:167-176
- Moscat, J., Moreno, F., Herrero, C., Lopez, C., Garcia-Barreno, P. (1988). Endothelial cell growth factor and ionophore A23187 stimulation of production of inositol phosphates in porcine aorta endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:659-663
- Moscatelli, D., Presta, M., Joseph-Silverstein, J., Rifkin, D.B. (1986a). Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 129:273-276

- Moscatelli, D., Presta, M., Rifkin, D. (1986b). Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2091-2095
- Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J., Manejias, R. and Rifkin, D.B. (1987a). Mr 25 000 heparin-binding protein from guinea pig brain is a high molecular weight form of basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5578-5582
- Moscatelli, D. (1987b). High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 131: 123-130.
- Moscatelli, D. (1988). Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell. Biol.*, 107: 753-759.
- Munaim, S.I., Klagsbrun, M. and Toole, B.P. (1988). Developmental changes in fibroblast growth factor in the chicken embryo limb bud. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 85: 8091-8093.
- Munson, P.J. and Rodbard, D. (1980). LIGAND : a versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Annal Biochem* 107 : 220-239
- Neufeld, G. and Gospodarowicz, D. (1985). The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 260: 13860-13868.
- Neufeld, G. and Gospodarowicz, D. (1986). Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J. Biol. Chem.*, 261: 5637-5637.
- Neufeld, G., Gospodarowicz, D. (1987a). Protamine sulfate inhibits the mitogenic activities of the extracellular matrix and FGF but potentiates that of epidermal growth factor. *J Cell Physiol* 132:287-294
- Neufeld, G., Gospodarowicz, D., Dodge, L. and Fujii, D. (1987b). Heparin modulation of the neurotrophic effects of acidic and basic fibroblast growth factors and nerve growth factor on PC12 cells. *J. Cell. Physiol.*, 131: 131-140.
- O'Keefe, E.J., Chiu, N.L., Payne, R.E. (1988). Stimulation of growth of keratinocytes by bFGF. *J Invest Dermatol* 90:767-769
- Olwin, B.B. and Hauschka, S.D. (1986). Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. *Biochemistry*, 25: 3487-3492.
- Ortega, S., Soderman, D., Schaeffer, M-T., Linemeyer, D., DiSalvo, J., Gimenez-Gallengo, G., Thomas, K.A. (1988). Superactive forms of human recombinant acid fibroblast growth factor obtained by site-directed mutagenesis at Cys residues. *J Cell Biol (Suppl.)* 107:266a
- Paterno, G.D., Gillespie, L.L, Dixon, M.S., Slack, J.MW. and Heath, J.K. (1989). Mesoderm-inducing properties of int-2 and KFGF: two oncogene-encoded growth factors related to FGF. *Development*, 106: 79-83.
- Pelech, S., Olwin, B.B., Krebs, E.G. (1986). Fibroblast growth factor treatment of Swiss 3T3 cells activates a subunit S6 kinase that phosphorylates a synthetic peptide substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5968-5972.

- Pettmann, B., Weibel, M. and Sensennebrener, M. (1985). Purification of two astroglial growth factors from bovine brain, *FEBS. Lett.*, 189: 102-108.
- Pettmann, B., Labourdette, G., Weibel, M. and Sensenbrenner, M. (1986). The brain fibroblast growth factor (FGF) is localized in neurons, *Neurosci. Lett.*, 68: 175-180.
- Plouët, J., Olivie, M., Courtois, Y. and Barritault, D. (1984). A highly reliable and sensitive assay for the purification of cellular growth factors. *J. Cell. Mol. Biol.*, 30: 105-110.
- Porchet, M. (1976). Données actuelles sur le contrôle endocrine de la maturation génitale des Néréidiens (Annélides Polychètes). *Ann. Biol.*, 7-8 : 329-377
- Prats, H., Kaghad, M., Prats, A.C., Klagsbrun, M., Lélias, J.M., Liauzun, P., Chalon, P., Tauber, J.P., Amalric, F., Smith, J.A. and Caput, D. (1989). High molecular mass form of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 86: 1836-1840.
- Presta, M., Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J. and Rifkin, D.B. (1986). Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 4060-4066.
- Presta, M., Rusnati, M., Maier, J.A.M., Ragnotti, G. (1988). Purification of basic fibroblast growth factor from rat brain: identification of a Mr 22000 immunoreactive form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155: 1161-1172.
- Presta, M., Statuto, M., Rusnati, M., Dell'Era, P. and Ragnotti, G. (1989). Characterization of a Mr 25,000 basic fibroblast growth factor form in adult, regenerating and fetal rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 1182-1189.
- Pruss, R.M., Barlett, P.F., Gavrilovic, J., Lisak, R.P., Rattray, S. (1981). Mitogens for glial cells : a comparison of the response of cultured astrocytes, oligodendrocytes and Schwann cells. *Brain Res* 254:19-35
- Quinkler, W., Massberg, M., Bernotat-Danielowski, D., Lütke, N., Sharma, H.S., Schaper, W. (1989). Isolation of heparin-binding growth factors from bovine, porcine and canine hearts. *Eur. J. Biochem.* 181 : 67-73
- Rauvala, H. (1989). an 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* 8 : 2933-2941
- Reid, H.H., Wilks, A.F. and Bernard, O. (1990). Two forms of the basic fibroblast growth factor receptor-like mRNA are expressed in the developing mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 87: 1596-1600.
- Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1988). Human angiogenin, an organogenic protein. *Br. J. Cancer* 57 : 587-590
- Risau, W., Ekblom, P. (1986). Production of a heparin binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. *J Cell Biol* 103:1101-1107
- Risau, W., Gautschi-Sova, P. and Böhlen, P. (1988). Endothelial cell growth factors in embryonic and adult chick brain are related to human acidic fibroblast growth factor. *EMBO J.* 7: 959-962.



- Rizzino, A., Ruff, E. (1986). Fibroblast growth factor induces the soft agar growth of 2 non-transformed cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 22:749-755
- Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., Fanci, A.S. (1986). Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 4167-4171
- Robertson, E.F., Danelly, H.K., Malloy, P.J .and Reeves, H.C. (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide Minigel System. *Anat. Biochem.* 167 : 290-294
- Rogelj, S., Klagsbrun, M., Atzman, R., Kurokawa, M., Haimovitz, A., Fuks, Z. and Vlodavsky, I. (1989). Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *J. Cell Biol.*, 109: 823-831.
- Rogister, B., LePrince, P., Pettmann, B., Labourdette, G., Sensenbrenner, M., Moonen, G. (1988). Brain basic fibroblast growth stimulates the release of plasminogen activators by newborn rat cultured astroglial cells. *Neurosci Lett* 91:321-326
- Rosengart, T.K., Kupferschmid, J.P., Ferrans, V.J., Casscells, W., Maciag, T., Clark, R.E. (1988b). Heparin-binding growth factor-I (endothelial cell growth factor) binds to endothelium in vivo. *J Vasc Surg* 7:311-317
- Rowe, J.M., Kasper, S., Shiu, R.P., Friesen, H.G. (1986). Purification and characterization of a human mammary tumor-derived growth factor. *Cancer Res* 46:1408-1412
- Ruta, H., Howk, R., Ricca, R., Drohan, G., Zabelshansky, M., Laureys, G., Barton, D.E., Francke, U., Schlessinger, J. and Givol, D. (1988). A novel protein tyrosine kinases gene whose expression is modulated during endothelial cell differentiation. *Oncogene*, 3: 9-15.
- Saksela, O., Moscatelli, D., Rifkin, D.B. (1987). The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105:957-963
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A. and Rifkin, D.B. (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell. Biol.*, 107: 743-751.
- Saneto, R.P., De Vellis, J. (1985). Characterization of cultured rat oligodendrocytes proliferating in a serum-free, chemically defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3509-3513
- Sato, Y., Rifkin, D. (1988). Autocrine activities of basic fibroblast growth factor : regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and NDA synthesis. *J Cell Biol* 107:1199-1205
- Schreiber, A.B., Winkles, M.E., Derynck, R. (1986). Transforming growth factor-alpha : a more potent angiogenic mediation than epidermal growth factor. *Science* 232 : 1250-1253

- Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., Gospodarowicz, D. (1987a). Basic fibroblast growth factor : production and growth stimulation in cultured adrenal cortex cells. *Endocrinology* 120:796-800
- Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., Gospodarowicz, D. (1987b). Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325:257-259
- Schweigerer, L., Neufeld, G., Gospodarowicz, D. (1987c). Basic fibroblast growth factor as a growth inhibitor for cultured human tumor cells. *J Clin Invest* 80:1516-1520
- Senior, R.M., Huang, S.S, Griffin, G.L. and Huang, J.S. (1986). Brain-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts and astroglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141: 67-72.
- Shimasaki, S., Emoto, N., Koba, A., Mercado, M., Shibata, F., Cooksey, K., Baird, A., Ling, N. (1988). Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 152 : 717-723
- Shing, Y., Folkman, J., Murray, M., Klagsbrun, M. (1983). Purification by affinity chromatography on heparin-Sepharose of a growth factor that stimulates capillary endothelial cell proliferation. *J Cell Biol* 97:395a
- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J. and Klagsbrun, M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 223: 1296-1299
- Shing, Y., Folkman, J., Haudenschild, C., Lund, D., Crum, R. and Klagsbrun, M. (1985). Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J. Cell. Biochem.*, 29: 275-287.
- Slack, J-M.W., Darlington, B.G., Heath, J.K., Godsave, S.F. (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326:197-200
- Smith, R., Peters, G., Dickson, C. (1988). Multiple RNAs expressed from the int-2 gene in mouse embryonal carcinoma cell lines encode a protein with homology to fibroblast growth factors. *EMBO J* 7:1013-1022
- Sommer, A., Brewer, M.T., Thompson, R.C., Moscatelli, D., Presta, M. and Rifkin, D.B. (1987). A form of human basic fibroblast growth factor with an extended amino terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144: 543-550
- Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980). Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 303: 878-880.
- Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*, 332: 217-219.
- Story, M.T., Esch, F., Shimasaki, S., Sasse, J., Jacobs S.C. and Lawson, R.K. (1987a). Aminoterminal sequence of a large form of basic fibroblast from human benign prostatic hyperplastic tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145: 702-709.

- Story, M.T., Sasse, J., Jacobs, S.C., Lawson, R. (1987b). Prostatic growth factor : purification and structural relationship to basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 26:3843-3849
- Story, M.T., Sasse, J., Kakuska, D., Jacobs, S.C., Lawson, R.K. (1988). A growth factor in bovine and human testes structurally related to basic fibroblast growth factor. *J Urol* 140:422-427
- Sullivan, R. and Klagsbrun, M. (1985). Purification of cartilage-derived growth factor by heparin affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, 260: 2399-2401.
- Takeyama, Y., Tanimoto, T., Hoshijima, M., Kaibuchi, K., Ohyanagi, H., Saitoh, Y. and Takai, Y. (1986). Enhancement of fibroblast growth factor-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation by colon tumor-promoting bile acid in Swiss 3T3 cells. Different modes of action between bile acid and phorbol ester. *FEBS Lett.*, 197: 339-343
- Thomas, K.A., Riley, M.C., Lemmon, S.K., Baglan, N.C., Bradshaw, R. (1980). Brain fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 255:5517-5520.
- Thomas, K.A., Rios-Cadelore, M., Fitzpatrick, S. (1984). Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 357-361.
- Thomas, K.A., Gimenez-Gallego, G., DiSalvo, J., Linemeyer, D., Kelly, L., Menke, J., Mellin, T., Busch, R. (1987). Structure and activities of acidic fibroblast factor. In : Rifkin DB, Klagsbrun M, (eds) *Angiogenesis mechanisms and pathobiology. Current communications in molecular biology.* Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Labs, pp 9-12
- Thomas, K.A., Gimenez-Gallego, G. (1987). Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1:434-440
- Thompson, R.W., Wadzinski, M.G., Sasse, J., Klagsbrun, M., Folkman, J., Shemin, R.J. and D'Amore, P. (1986). Isolation of heparin-binding endothelial cell mitogens from normal human myocardium. *J. Cell. Biol.*, 203: 300A
- Togari, A., Dickens, G., Kuzuya, H., and Guroff, G. (1985). The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J. Neurosci.* 5: 307-316.
- Tsuda, T., Kaibuchi, K., Kawahara, Y., Fukuzaki, H. and Takai, T. (1985). Induction of protein kinase C activation and Ca²⁺ mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 191: 205-210.
- Ueno, N., Baird, A., Esch, F., Ling, N. and Guillemin, R. (1986a). Isolation of an amino terminal extended form of basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 580-588.
- Ueno, N., Baird, A., Esch, F., Shimasaki, S., Ling, N. and Guillemin, R. (1986b). Purification and partial characterization of a mitogenic factor from bovine liver : structural homology with basic fibroblast growth factor. *Regul. Peptides*, 16: 135-145
- Ulrich, S., Lagente, O., Lenfant, M., Courtois, Y. (1986). Effect of heparin on the stimulation of non-vascular cells by human acidic and basic FGF. *Biochem Biophys Res. Commun.* 137 : 1205-1213

- Unsicker, K., Reichert-Preibsch, H., Schmidt, R., Pettmann, B., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. (1987). Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5459-5463
- Vlodavsky, I., Friedman, R., Sullivan, R., Sasse, J., Klagsbrun, M. (1987a). Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell-associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J Cell Physiol* 131:402-408
- Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Friedman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J. and Klagsbrun, M. (1987b). Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2292-2296
- Wagner JA and D'Amore P (1986). Neurite outgrowth induced by an endothelial cell mitogen isolated from retina. *J. Cell. Biol.* 103 : 1363-1367
- Walicke, P., Cowan, W.M., Ueno, N., Baird, A., Guillemin, R. (1986). Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3012-3016
- Walicke, P.A., Feige, J.-J. and Baird, A. (1989). Characterization of the neuronal receptor for basic fibroblast growth factor and comparison to receptors on mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, 264: 4120-4126.
- Wang, W.P., Lehtoma, K., Varban, M.L., Krishnan, I. and Chiu, I.M. (1990). Cloning of the gene coding for human class 1 heparin-binding growth factor and its expression in fetal tissues. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2387-2395.
- Wilkinson, D.G., Peters, G., Dickson, C. and McMahon, A. (1988) Expression of the FGF-related protooncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO J.*, 7: 691-695.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S. and McMahon, P.A. (1989). Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene int-2 suggest multiple roles in fetal development. *Development*, 105: 131-136.
- Winkles, J.A., Friesel, R., Burgess, W.H., Howk, R., Mehlman, T., Weinstein, R. and Maciag, T. (1987). Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7124-7128.
- Witte, D.P., Nagasaki, T., Stambrook, P. and Lieberman, M.A. (1989). Identification of an acidic fibroblast growth factor-like activity in a mesoblastic nephroma. *Laboratory investigation* 60 : 353-359
- Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases *A Rev Biochem* 57:443-478
- Yoshida, T., Miyagawa, K., Odagiri, H., Sakamoto, H., Little, P.F., Terada, M. and Sugimura, T. (1987). Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7305-7309.

- Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Katoh, O., Sugimura, T., Terada, M. (1989). HST1 oncogene encoding a FGF-related growth factor : its product, expression, clustering and coamplification with int-2. *J Cell Biochem (Suppl. 13b)* 3
- Zhan, X., Bates, B., Hu, X. and Goldfarb, M. (1988). The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3487-3497.

ANNEXE I

PRESENTATION DU MODELE NEREIS.

Les annélides polychètes sont des coelomates segmentés dont le corps se compose de nombreux métamères intercalés entre le prostomium (partie antérieure) et le pygidium (partie postérieure) (Fig. 1 d'après Durchon et Joly, 1978). Ces animaux forment continuellement de nouveaux segments au cours de leur vie à partir d'une zone contigue au pygidium appelée zone de prolifération : des nouveaux segments se forment donc en direction antérieure.

Les néréidiens constituent une famille d'annélides polychètes marines possédant un pouvoir de régénération caudal très important et dont certaines espèces subissent des transformations somatiques (épiteoïque) au terme de leur vie à l'approche de la reproduction (Fig. 1).

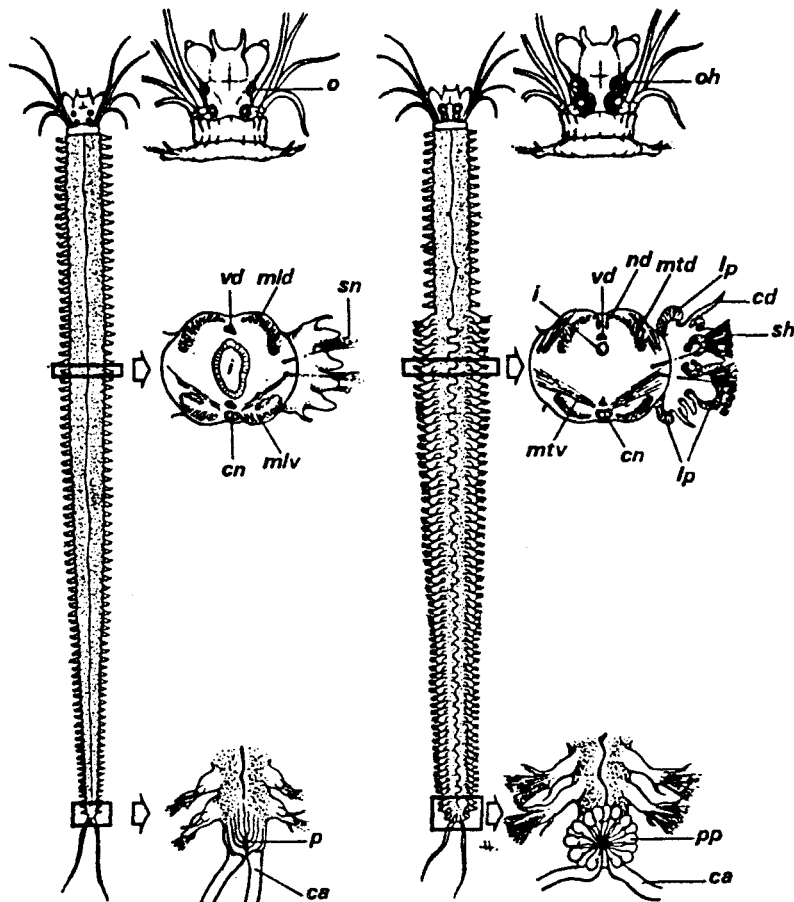


FIG. 1 — Modifications morphologiques et anatomiques d'une *Nereis* (à gauche) en *Heteronereis* (à droite). Les yeux (*o*) subissent une hypertrophie (*oh*) ; les parapodes différencient les lamelles parapodiales (*lp*) ; les soies néréidiennes (*sn*) sont remplacées par des soies hétéronéréidiennes (*sh*). Chez les mâles, les cirres dorsaux (*cd*) deviennent crénelés et le pygidium (*p*) développe des papilles (*pp*). Dans chaque segment transformé les muscles longitudinaux dorsaux (*mld*) et ventraux (*mlv*) subissent une histolyse suivie d'une histogénèse. Une néoformation musculaire dorsale (*nd*) se développe, repoussant le vaisseau dorsal (*vd*) dans le coelome. Des muscles transverses dorsaux (*mtd*) et ventraux (*mtv*) se différencient. L'intestin (*i*) s'histolyse. *ca*, cirre anal ; *cn*, chaîne nerveuse.

I : Régénération

La régénération caudale s'effectue après amputation par la mise en place d'un pygidium et d'une zone de prolifération. Celle-ci assurera la régénération des segments amputés (Fig. 2). Ce type de régénération est sous le contrôle endocrine des ganglions cérébroïdes ; ceux-ci contrôlent le fonctionnement de la zone de prolifération, c'est-à-dire la mise en place des nouveaux métamères.

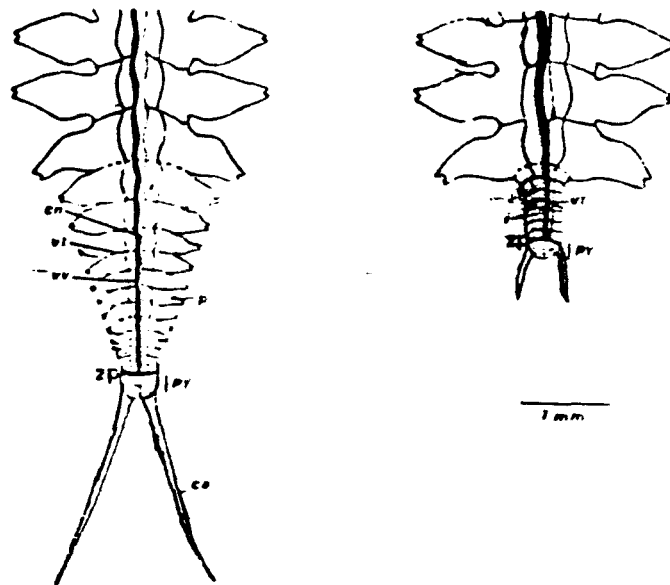


Fig.2 : Pygidium de *Nereis diversicolor* normales et en régénération

ca : cirre annal ; cn : chaîne nerveuse ; i : intestin ; p : parapode ; r : régénérat ;
vt : vaisseau sanguin transversal ; vv : vaisseau sanguin ventral ; py : pygidium
zp : zone de prolifération

II : L'épitoquie

A l'approche de la maturité génitale, certaines espèces comme *Perinereis cultrifera* (Fig. 1) présentent des transformations somatiques importantes alors que d'autres ne présentent pas ces caractéristiques (*Nereis diversicolor*) (Durchon et Joly, 1978). Ces transformations sont à la fois morphologique et anatomique et se situent au niveau de certains segments.

Ces transformations se traduisent dans les zones postérieures par la différenciation au niveau de lamelles très vascularisées et de soies des parapodes qui deviennent des palettes natatoires (Fig. 3 d'après Durchon et Joly, 1978) alors que la musculature subit des remaniements très importants. Cet ensemble permet la danse nuptiale lors de l'essaimage. En outre, des chémorécepteurs se différencient au niveau des crénelures qui se développent sur les cirres parapodiaux dorsaux de la région postérieure des mâles (Fig. 3). De plus, de très nombreux vaisseaux se différencient dans la paroi du corps permettant un apport sanguin supplémentaire probablement en relation avec les dépenses énergétiques considérables lors de la reproduction.

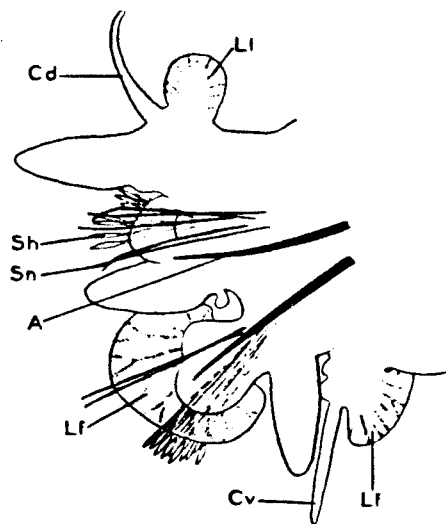


Fig. 3 — Parapode gauche du tronçon postérieur (45^e de l'individu entier), correspondant au tronçon antérieur de la figure 8, un mois et demi après l'opération. Présence des lamelles foliacées et des soies pélagiques, caractéristiques de l'épitoque. Stade 3 avancé.

A, acicule ; Cd, cirre dorsal ; Cv, cirre ventral ; Ll, lamelles foliacées ; Sh, soies hétéronéréidiennes ; Sn, soies néridiennes.

Dans la partie antérieure, seuls les cirres parapodiaux se transforment, ils développent chez les mâles (15 premiers segments) et les femelles (18 premiers segments) un renflement qui correspond comme pour les crénelures, à la différenciation de chémorécepteurs (Fig. 4 d'après Durchon et Joly, 1978).

Ces transformations hétéronéréidiennes sont sous le contrôle endocriné des ganglions cérébroïdes qui inhibe ces mécanismes.

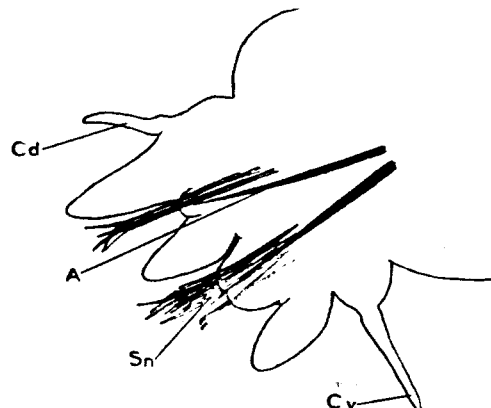


Fig. 4 — Parapode gauche d'un tronçon antérieur de *P. cultrifera*, un mois et demi après l'opération. Aucune transformation.

A, acicule ; Cd, cirre dorsal ; Cv, cirre ventral ; Sn, soies néridiennes.

ANNEXE II

Codes de trois et une lettres correspondant aux différents acides aminés

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

ANNEXE III

Sigles et abréviations

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

HEPES : N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PB : phosphate buffer

PBS : phosphate buffer saline

SDS : sodium dodecyl sulfate

TFA : trifluoroacetic acid



ERRATA

Au niveau de la figure 16 page 70 : lire :

Figure 16 : Pontage moléculaire de FGF basique iodé sur des préparations membranaires (500 µg) de zone de croissance (piste 1 à 3) et de zone en quiescence de *Nereis diversicolor* femelles.

- A : Autoradiographie après migration électrophorétique de membrane
- piste 1-4 : FGF basique iodé (1.2 nM)
 - piste 2-5 : déplacement par un excès molaire (x500) de FGF basique froid
 - piste 3-6 : déplacement par un excès molaire (x500) des nHBGFs contenus dans la fraction 0.7 M MS

B : Analyse densitométrique des pistes 1 et 4 aux moyens de l'analyseur d'images SAMBA 2005

Au niveau de la figure 16 B : remplacer le chiffre 3 par le chiffre 4

