

50376
1990
247

Année 1990

50376
1990
247

N° d'ordre : 643

*UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS*

UFR DE BIOLOGIE

THESE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Didier THOMAS



ONTOGENIE DU "FIBROBLAST GROWTH FACTOR" (FGF) ACIDE ET DE SES RECEPTEURS DANS LE CERVEAU DE SOURIS

Soutenue le **19 Décembre 1990** devant la Commission d'Examen

Président :	M. A. CAPURON
Directeur de thèse :	M. B. BOILLY
Rapporteurs :	M. J.-P. CARUELLE Mme M. SENSENBRENNER
Membres :	M. D. BARRITAUT Mme M. GUMPEL

A mes parents.

A Isabelle.

AVANT-PROPOS

J'exprime ma gratitude à Monsieur le Professeur B. BOILLY qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'accordée.

L'aboutissement de cette thèse me donne l'occasion de remercier très sincèrement Monsieur le Professeur D. BARRITAUULT pour l'accueil chaleureux qu'il m'a toujours réservé au sein de son équipe.

Je remercie Monsieur le Professeur J.-P. CARUELLE qui me fait le plaisir d'être rapporteur de cette thèse et pour l'attention bienveillante qu'il m'a toujours accordée.

Ma gratitude va également à Monsieur le Professeur D. STEHELIN qui m'a permis de travailler dans son laboratoire ainsi qu'à B. VANDENBUNDER et M.-B. RAES qui m'ont initié aux techniques de biologie moléculaire.

Je remercie très chaleureusement Mme le Docteur M. SENSENBRENNER qui a accepté si prestement d'être rapporteur de ce travail. C'est pour moi un grand honneur que d'être jugé par une des "références" en matière^{de} neurochimie.

Je remercie Madame le Docteur M. GUMPEL qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que Monsieur F. LACHAPELLE pour m'avoir si aimablement fourni un matériel biologique précieux : les cerveaux de souris jimpy.

Je remercie Monsieur le Professeur A. CAPURON pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Ceci me donne également l'opportunité de lui exprimer le vif plaisir que j'ai toujours éprouvé en suivant ses cours d'embryologie.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à F. SONCIN avec qui j'ai lié amitié depuis le DEA et sur qui j'ai toujours pu compter lors de mes nombreuses venues à Créteil.

Merci aussi à M. MISKULIN et D. LEDOUX pour leur aide précieuse et pour leur bonne humeur.

Je remercie F. CHUIN et R. LYOEN pour l'entretien des élevages ainsi que F. LALOUX, secrétaire d'élite, pour m'avoir rendu de précieux services.

Je remercie enfin toutes les personnes du Laboratoire de Biologie du Développement qui un jour ou l'autre m'ont apporté leurs conseils.

ABBREVIATIONS.

AcONa : acétate de sodium
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ASB : albumine sérique bovine
BET : bromure d'éthidium
BEK : bacterial expressed kinase
BHK : baby hamster kidney
CEK : chick embryonic kinase
CCL39 : certified cell line 39
cpm : coups par minute
D.O. : densité optique
DMSO : diméthyl sulfoxyde
EDTA : éthylène diamine tetra acétate
EIA : enzymo immunoassay
FLG : fms-like gene
LB : Luria Broth
MEM : mininum essential medium
MOPS : acide 3-(N-Morpholino) Propane-Sulfonique
PBS : phosphate buffer saline
rpm : rotation par minute
SDS : sodium dodécyl sulfate
SSC : standard sodium citrate
SSPE : standard sodium phosphate EDTA
TBS : Tris buffer saline
U.V. : ultra violet

SOMMAIRE.

INTRODUCTION.....	5
GENERALITES.....	9
I) Structures et biosynthèses des FGFs.....	11
A) Structures des FGFs.....	12
B) Les FGFs une famille de facteurs.....	13
C) Biologie moléculaire des FGFs.....	14
D) Biosynthèses des FGFs.	15
1) Le FGF acide.....	15
2) Le FGF basique.....	16
E) Distribution tissulaire et cellulaire des FGFs.....	16
II) Les récepteurs des FGFs.	20
A) Caractéristiques biochimiques.....	20
B) Biologie moléculaire et structure des récepteurs des FGFs.	21
1) Haute affinité.....	21
2) Basse affinité.	25
C) Devenir du ligand et transduction du signal.	25
D) Interactions des FGFs avec l'héparine.	26
III) Activités biologiques des FGFs et leurs rôles au cours de l'angiogenèse et du développement.....	28
A) Cellules cibles.	28
B) FGFs et angiogenèse.....	30
C) FGFs et développement embryonnaire.	31
IV) FGFs et neurogenèse.	37
A) Activités biologiques.....	38
1) Actions des FGFs sur les neurones.	38
a) Etudes réalisées in vitro.....	38
b) Etudes réalisées in vivo.	40
2) Action des FGFs sur les cellules gliales.....	42
a) Effet mitogène	42
b) Effets non mitogènes.....	43
B) Distribution tissulaire et cellulaire des FGFs et de leurs récepteurs dans le système nerveux.	48
MATERIEL ET METHODES.	50
I) Matériel.....	51
II) Méthodes.....	52
A) Préparation et purification des extraits de cerveaux.....	52
B) mesure de l'activité biologique.....	53
1) Culture cellulaire	53
2) Mesure de l'incorporation de thymidine.....	53

	2
C) Mesure des niveaux de FGFa.....	54
D) Détection du FGFa.....	56
1) "Western blot".....	56
2) Immunohistochimie.....	58
a) Préparation du matériel biologique.....	58
b) Immunodétection.....	58
E) Détection des ARN messagers spécifiant le FGFa.	
.....	59
1) Purification des ARN poly A.....	59
2) Electrophorèse et transfert des ARN	
("Northern blot").....	60
3) Hybridation des sondes ARN sur "Northern	
blot".....	62
4) Préparation des sondes ARN.....	63
F) Détection des ARNm spécifiant les récepteurs des	
FGFs.....	70
Préparation des ARN messagers, transfert et	
hybridation.....	70
CHAPITRE 1. Etude de la régulation du FGF acide et de ses	
messagers dans le cerveau de souris au cours du développement.	
.....	73
I) Introduction.....	74
II) Résultats.....	74
A) Evolution de la quantité de FGFa immunoréactif	
dans les extraits purifiés de cerveau de souris au cours	
du développement (E10, E12, E14, E16, E18, PO,	
P3, P5, P9, P11, P14, P18, P30, P60, adulte).....	74
B) Caractérisation du FGFa immunoréactif.....	76
C) Evolution au cours du développement de la	
quantité de transcrits spécifiant le FGFa (Stades E14,	
P5, P11, P14, P18 et adulte).....	79
1) Caractérisation de la taille de la sonde.....	79
2) Evolution des quantités de messagers	
spécifiant le FGFa.....	80
D) Immunolocalisation du FGFa dans le cerveau.....	81
III) Discussion, conclusions.....	82
CHAPITRE 2. Etude de la régulation au cours du développement	
des messagers spécifiant le produit des gènes bek et flg, récepteurs	
putatif des FGFs	89
I) Introduction.....	90
II) Résultats.....	91
III) Discussion, conclusions.....	91
CHAPITRE 3 Effet d'une lésion mécanique sur les niveaux de	
FGFa et de ses récepteurs.....	96
I) Introduction.....	97
II) Résultats.....	98

	3
A) Evolution des niveaux de FGFa immunoréactif.....	99
B) Recherche de FGFaIR in situ. dans les cerveaux bléssés.....	100
C) Niveaux de transcrits spécifiant le FGFa et le produit du gène bek.....	101
III) Discussion, conclusions.....	102
CHAPITRE 4 Effet de la mutation sur les niveaux de FGFa et des ses récepteurs.....	105
I) Introduction.....	106
II) Résultats.....	107
A) Evolution des niveaux de FGFaIR.	107
B) Evolution des transcrits spécifiant le FGFa et le produit du gène bek ("Northern blot").....	108
1) Evolution des transcrits spécifiant le FGFa.	109
2) Evolution des transcrits spécifiant le produit du gène bek.	109
III) Discussion, conclusions.....	110
DISCUSSION GENERALE.	113
ANNEXE TECHNIQUE.	121
BIBLIOGRAPHIE	
	128

INTRODUCTION.

INTRODUCTION.

L'ontogenèse du système nerveux central débute par l'induction du neur ectoderme. Celui ci va ensuite subir une évolution particulièrement importante dont les étapes sont : la prolifération des cellules précurseurs ; la migration de ces cellules vers des zones plus corticales ; l'agrégation de certaines populations de cellules en noyau ; la différenciation qui survient généralement après une dernière mitose ; la synaptogenèse, la synaptolyse et la mort cellulaire programmée de certains neurones. La prolifération débute dans des zones spécialisées du cerveau embryonnaire : la surface des ventricules et plus tard le gyrus denté de l'hippocampe et la couche externe des grains du cervelet. On trouve alors deux types de cellules : des cellules en mitose qui sont les cellules progénitrices du système nerveux central (SNC) et 1 % de cellules différenciées constituant la glie radiale (revue Jacobson, 1978). Les cellules progénitrices vont se multiplier activement ; les neurones apparaissent d'abord puis en deux vagues, la glie : les astrocytes et ensuite les oligodendrocytes. Le tableau 1 résume les périodes de prolifération des précurseurs des principaux types cellulaires du cerveau de rat et de souris.

Les bases moléculaires du contrôle de ces différentes étapes ne sont qu'au début de leur compréhension. Pour tenter d'apporter des éléments de réponses à ce vaste problème, une partie des recherches s'est orientée vers l'isolement à partir d'extraits tissulaires ou cellulaires, de molécules pouvant exercer une action sur la prolifération, la migration et la différenciation des différentes catégories cellulaires du SNC. Parmi ces molécules on trouve des facteurs d'attachement, des composants de la matrice extracellulaire (revue Moonen et coll., 1988) et des facteurs de croissance. Le mieux caractérisé de ces facteurs de croissance est le nerve growth factor (NGF) pour lequel il a été clairement montré un rôle

physiologique au cours du développement et dans la maintenance de neurones périphériques (Levi-Montalcini, 1987) et centraux (Hefti et coll., 1989).

Types Cellulaires	prénatal	postnatal				
		1	2	3	adulte	sénile
Neuroblastes	●(E10) x	●x	●x	●x		
Astrocytes	●(E12) x	●▲x	●▲x	●▲x	●▲x	
Oligodendrocytes	⌘	●▲x	●▲x	●▲x	●▲x	
Cellules subépendymaires	⌘	●x	●x	●x	●x	
Cellules épendymaires	●(E10)	●	●	●		
Epithélium des plexus choroïdes	●(E11)	●	●			
Cellules endothéliales	●(E15)	●▲x	●▲x	●▲x	●▲x	
Microglie et péricytes	●	●	●	●		

- Période de prolifération
- Prolifération accompagnée de mort cellulaire
- ▲ Passage des cellules d'un état de prolifération à un état quiescent
- x Passage des cellules d'un état quiescent à un état de prolifération

Tableau 1 : Périodes de prolifération des précurseurs des principaux types cellulaires du cerveau de rat et de souris. D'après Korr (1980).

D'autres facteurs neurotrophiques ont été recensés ainsi que des facteurs possédant une activité mitogène et/ou différenciatrice et dont la localisation n'est d'ailleurs pas limitée au système nerveux. Par exemple, le platelet-derived growth factor (PDGF) stimule la prolifération des cellules progénitrices O2A qui donnent naissance aux astrocytes de type 2 et aux oligodendrocytes, suggérant ainsi que le PDGF serait le facteur mitogène naturel *in vivo* des cellules O2A (Richardson et coll., 1988). L'insulin-like growth factor de type 1 (IGF-1) semble quant à lui orienter

la différenciation des cellules O2A en oligodendrocytes et le ciliary neurotrophic factor (CNTF) en astrocytes de type 2 (revue Gurney, 1990).

D'autres facteurs de croissance présentent également une activité biologique sur des lignées cellulaires d'origine nerveuse. Parmi ceux ci, les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs) tiennent une place particulière. En effet *in vitro*, et dans certaines conditions *in vivo*, ils agissent sur la multiplication et/ou la différenciation de lignées cellulaires issues du système nerveux ; ils possèdent également des propriétés neurotrophiques sur des neurones d'origine variée. De plus, ils sont de remarquables facteurs angiogènes (voir généralités). La présence de ces facteurs en grande quantité dans le système nerveux central suggère qu'il joue un rôle physiologique important dans ce tissu. Cependant, la signification biologique de la présence de ces facteurs en grande quantité dans les cerveaux matures, où les phénomènes de prolifération sont très limités, demeure difficile à appréhender. C'est pourquoi, l'utilisation de modèles comme le développement du cerveau représente une approche intéressante de l'étude de ce problème.

Nous avons donc dans ce travail, aborder le problème du rôle *in vivo* dans le SNC des FGFs en mesurant les variations de niveaux de la forme acide du FGF et de ses transcrits ainsi que ceux d'une forme de récepteur des FGFs, au cours du développement embryonnaire et postnatal du cerveau de souris (chapitres I et II). Nous avons également abordé ce problème au travers du modèle de la lésion (chapitre III) et de celui d'une dérégulation de la différenciation des oligodendrocytes due à la mutation Jimpy (chapitre IV).

GENERALITES.

GENERALITES.

Avant d'aborder la présentation des facteurs de croissance fibroblastique, nous rappellerons la définition du terme "facteur de croissance".

Etant donné que la majeure partie des connaissances concernant les facteurs de croissance est issue d'expérimentations réalisées *in vitro*, ces facteurs ont d'abord été définis en tant que polypeptides qui ajoutés à des concentrations physiologiques dans un milieu de culture, induisent la prolifération des cellules mises en culture dans ce milieu. Cette définition est simple mais elle limite l'action à une induction de prolifération. Les connaissances devenant plus importantes notamment au niveau du récepteur de ces molécules, James et Bradshaw (1984) proposèrent une définition des facteurs de croissance d'après les critères suivants :

- initiation d'une réponse à l'extérieur de la cellule cible exclusivement par formation de complexes au niveau du récepteur spécifique ;
- la réponse cellulaire spécifique qui peut être hypertrophique ou hyperplasique résulte de la formation du complexe facteur de croissance avec son récepteur ;
- les complexes facteur de croissance/récepteur sont éliminés de la surface cellulaire par endocytose du récepteur ;
- un facteur de croissance doit être produit, transporté et interagir avec des cellules cibles d'une manière physiologique.

Par analogie avec les hormones, trois modes possibles de transport des facteurs de croissance vers leurs cellules cibles ont été proposés : le mode endocrine, le mode paracrine et le mode autocrine (Sporn et

Todaro, 1980), le mode autocrine pouvant être substitué par le mode intracrine.

Les facteurs de croissance les mieux définis sont : l'insuline, les insulin-like growth factors (IGF-I et IGF-II), l'epidermal growth factor (EGF), les transforming growth factors (TGF alpha et TGF beta), le platelet-derived growth factor (PDGF), les fibroblast growth factors (FGFs), les interleukines, les facteurs de croissance hématopoïétiques (CSF), mais aussi le NGF, le ciliary neurotrophic factor (CNTF). Les facteurs de croissance doivent être considérés comme des signaux d'un langage biologique complexe de communication intercellulaire et intracellulaire. Il est probable que d'autres facteurs de croissance restent à découvrir.

I) Structures et biosynthèses des FGFs.

Un mitogène pour des fibroblastes fut initialement partiellement purifié à partir d'extraits de cerveau et d'hypophyse par Gospodarowicz (1974, 1975) qui le nomma fibroblast growth factor. Puis les techniques de purification s'améliorant, deux formes de FGF furent purifiées à homogénéité : une forme acide (pI 5-6) purifiée à partir de cerveau (Thomas et coll., 1984) et une forme basique (pI 9) purifiée à partir d'hypophyse (Böhlen et coll., 1984). A la même époque Shing et coll. (1984) constatent qu'une partie significative de l'activité "FGF-like" d'extraits de tumeurs peut être retenue sur héparine immobilisée. Bientôt il fut reconnu que cette activité "FGF like" correspondait aux deux formes de FGFs. Depuis, la chromatographie d'affinité sur héparine immobilisée constitue l'étape essentielle pour la recherche d'une activité de type FGF dans des extraits tissulaires et cellulaires

A) Structures des FGFs.

Le FGF basique isolé de la glande pituitaire est une simple chaîne de 146 acides aminés ayant une masse moléculaire de 16.500 Da (Esch et coll., 1985, 1986). Une forme étendue de 154 aa a été également isolée (Ueno et coll., 1986a ; Story et coll., 1987). Le FGF acide bovin et humain furent initialement purifiés à partir de cerveau (Thomas et coll., 1984 ; Gimenez-Gallego et coll., 1985, 1986 ; Gautschi-Sova et coll., 1986). C'est une protéine de 140 aa ayant une masse moléculaire de 15.500 Da. Comme pour le FGF basique, la forme de 140 aa s'est avérée n'être en fait que la forme tronquée d'une molécule plus longue du côté aminoterminal : l'ECGF (Jaye et coll., 1986). L'analyse comparée de la structure primaire des FGFa et b a révélé une homologie d'environ 55% (fig. 1).

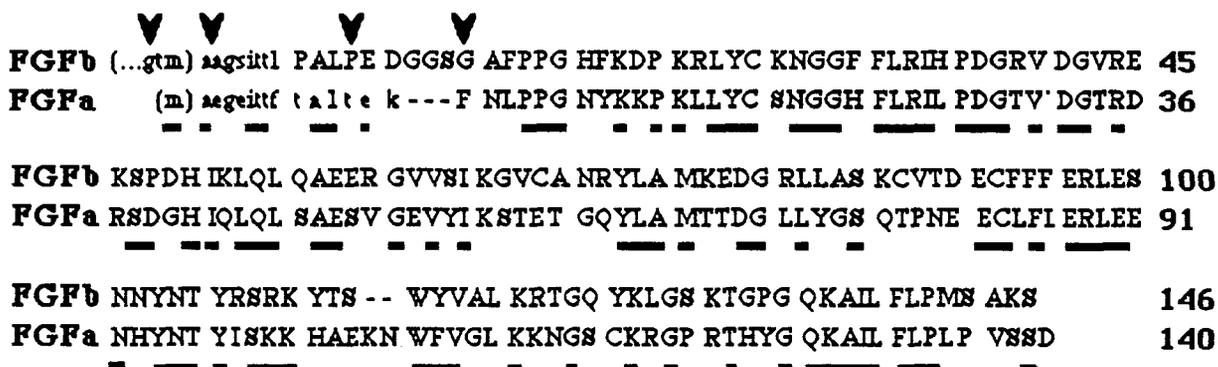


Fig.1 : Structures primaires des FGFs basique et acide humains. Les séquences écrites en lettres capitales correspondent aux protéines isolées par Esch et coll (1985, 1986) et Thomas et coll. (1984). Les séquences écrites en lettres minuscules correspondent aux extensions amino-terminales déduites du clonage des FGFs (Jaye et coll., 1986 ; Abraham et coll., 1986a) ou du séquençage des FGFs (Burgess et coll., 1986 ; Story et coll., 1987 ; Ueno et coll., 1986a). Les séquences entre parenthèses sont codées par les ARNm des FGFs (Jaye et coll., 1986 ; Abraham et coll., 1986a, b) et représentent des formes plus grandes de FGF basique (Sommer et coll 1987). Les flèches indiquent les sites de clivage. Le souligné noir indique les séquences homologues.

Les travaux sur les FGFs se multipliant, plusieurs formes de FGFa et b ont été décrites et ont parfois reçu des noms différents (revue Baird

et Böhlen, 1990). Les différences enregistrées portent exclusivement sur la partie N-terminale. Nous n'entrerons pas dans le détail de ces différentes formes. Nous indiquerons simplement que cette hétérogénéité de cette partie N-terminale, est de nature artéfactuelle et qu'elle est causée par les conditions d'extraction de ces molécules, entraînant une plus ou moins grande dégradation de la partie N-terminale. De plus cette troncature n'affecte en rien l'activité biologique de ces facteurs.

B) Les FGFs : une famille de facteurs.

Très récemment, plusieurs protéines structurellement proches des FGFs prototypes que sont le FGFa et b, ont été découvertes et à l'heure actuelle la famille des FGFs compte cinq autres membres :

- le protooncogène hst (Taira et coll., 1987) homologue du gène KS3 (Delli-Bovi et coll., 1987) ; le produit de ce gène (KS3) est une protéine de 206 aa qui présente une homologie de séquence de 40 % avec le FGFb ;

- le produit de l'oncogène int-2 ; cet oncogène fortement exprimé après induction virale de tumeurs mammaires murines (MMTV), est une protéine de 243 aa (Dickson et Peters, 1987) ;

- le FGF5 (Zhan et coll., 1988) ; ce cinquième membre de la famille est le produit d'un autre oncogène qui code une protéine de 267 aa présentant 50 % avec les FGFa et b ;

- le FGF6 (Marics et coll., 1988) identifié grâce à une sonde hst humaine, il présente en fait 70 % d'homologie avec cet oncogène et possède également des propriétés transformantes sur cellules NIH/3T3 ;

- le KGF (keratinocyte growth factor) (Finch et coll., 1989) ; dernier membre en date de cette famille, la séquence de son ADNc prédit une protéine de 194 aa et une homologie de 38 % avec les FGFs a et b.

Pour l'instant, les études concernant l'activité biologique et les sites récepteurs de ces facteurs sont encore rares en raison des faibles quantités de facteurs disponibles.

C) Biologie moléculaire des FGFs.

Les ADNc des FGFa et b de différentes espèces ont été clonés et séquencés. Les résultats montrent qu'il existe une homologie de séquence et d'organisation génomique très grande. Chez l'Homme, les gènes des FGFa et b sont situés respectivement sur les chromosomes 5 (Jaye et coll., 1986) et 4 (Mergia et coll., 1986).

La structure génique des FGFs constitue une des caractéristiques principales de cette famille de facteurs de croissance (Abraham et coll., 1986b ; Mergia et coll., 1989). Elle est fondamentalement composée de 3 exons séparés par 2 longs introns (fig. 2). Les limites de ces exons s'alignent parfaitement, excepté pour l'exon 1 qui est déplacé de 3 nucléotides. L'homologie de la séquence codante des FGFa et b suggère que les deux gènes dériveraient d'un gène ancestral commun qui se serait dupliqué. L'ADN génomique est transcrit en ARN de 7 et 3,7 Kb (Abraham et coll., 1986a) ; plus rarement deux transcrits supplémentaires de 2,2 et 1,5 Kb ont été observés (Sternfeld et coll., 1988) pour la forme basique. Les transcrits du FGFa ont une taille de 4,8 Kb ou de 4,5 Kb suivant les auteurs (Abraham et coll., 1986a ; Jaye et coll., 1986) Pour ce dernier il a été rapporté récemment l'existence de transcrits minoritaires de 2 et 3,4 Kb dans des tissus fœtaux humains (Wang et coll., 1989) et de 1,3 Kb dans les hépatocytes de rat en régénération (Kan et coll., 1989). Des études plus précises de la transcription du FGFa humain ont révélé l'existence de plusieurs sites de polyadénylation (Crumley et coll., 1989) et de phénomènes d'épissage alternatif au niveau de la région 5' non

codante (Chiu et coll., 1990 ; Crumley et coll., 1990). Ce qui pourrait expliquer pour partie l'hétérogénéité de taille des messagers du FGFa.

Les ARN messagers des FGFa et b ne possèdent pas de séquence consensus codant pour un peptide signal assurant l'excrétion de ces facteurs (Abraham et coll., 1986a ; Jaye et coll., 1986). Cependant la présence des FGFs à l'extérieur des cellules pose le problème de leur mode d'excrétion. Les FGFs ont des potentialités oncogéniques car la transfection de cellules par l'ADNc du FGFb auquel a été greffé le peptide signal de la chaîne lourde des immunoglobulines, permet l'excrétion du FGFb et provoque la transformation des cellules ainsi que l'apparition rapide de tumeurs dans des animaux syngéniques (Rogelj et coll., 1988). Par contre les autres membres de la famille possèdent une séquence signal classique.

D) Biosynthèses des FGFs.

1) Le FGF acide.

L'ARN messager du FGFa code une protéine de 155 aa (Jaye et coll., 1986). Comme il a déjà été mentionné dans la présentation de la structure primaire de ces facteurs, le FGFa est plus communément rencontré sous une forme tronquée. Cependant une forme de 154 aa, correspondant à la molécule de 155 aa ayant perdu sa méthionine terminale, peut être obtenue par des conditions d'extraction inhibant les protéases (Burgess et coll., 1986). Le seul processus postranscriptionnel qui survient est la perte de la méthionine aminotermine et l'acétylation de l'alanine suivante. Sur la base de résultats d'immunoblot, certains auteurs ont signalé l'existence d'une forme supérieure à 155 aa (Lobb et coll., 1986b), mais celle-ci n'a apparemment pas été retrouvée.

2) Le FGF basique.

Comme pour le FGFa, l'ARN messager du FGFb code une protéine de 155 aa sans séquence signal (Abraham et coll., 1986a). Contrairement au FGFa, de nombreux travaux ont relaté l'existence de formes plus longues (Ueno et coll., 1986a ; Presta et coll., 1988 ; Moscatelli et coll., 1987 ; Presta et coll., 1989 ; Sommer et coll., 1987 ; Iberg, 1989 ; Maier et coll., 1990 ; Prats et coll. 1989). Florkiewicz et Sommer (1989) ont montré que la synthèse du FGFb peut être initiée à partir de codon CUG codant pour la leucine, prédisant ainsi des formes allant de 18.000 à 29.000 Da qui ont d'ailleurs été isolées.

E) Distribution tissulaire et cellulaire des FGFs.

La source majeure de FGF basique est l'hypophyse dont on peut en extraire de 0,35 à 0,6 mg/Kg (Gospodarowicz et coll., 1987). En fait le FGFb est détecté à peu près dans tous les tissus normaux et tumoraux d'origine mésodermique et ectodermique (tableau 2) mais avec des rendements 10 à 50 fois plus faibles (Baird et Böhlen, 1990). En ce qui concerne le FGFa, sa source principale est le système nerveux central, rétine comprise (0,4 mg/Kg) (Lobb et Fett, 1984 ; Baird et coll., 1985a). Sa distribution est nettement moins ubiquitaire que celle du FGFb, mais il a été trouvé dans le rein (Gautschi-Sova et coll., 1987), le cœur (Thompson et coll., 1986), l'os (Hauschka et coll., 1986) et aussi dans des lignées de cellules transformées (Lobb et coll., 1986b) et le blastème de régénération d'amphibien (Boilly et coll., soumis).

La présence de FGF dans les liquides circulants, en particulier celle de la forme basique, a également été recherchée. Dans le sérum, une forme immunoréactive de 70 Kda de FGFb a été rapportée (Mormède et coll., 1985) mais il n'existe pas de preuves directes de la présence de FGF

dans le sang, les FGFs ne peuvent donc pas être considérés comme des hormones circulantes. D'autres fluides ont été examinés et des molécules apparentées aux FGFs ont été détectées dans le vitré de l'œil (Baird et coll., 1985c ; Mascarelli et coll., 1987), le liquide synovial (Hamerman et coll., 1987) et les urines de patients atteints de cancer du rein et de la vessie (Chodak et coll., 1986 ; 1988).

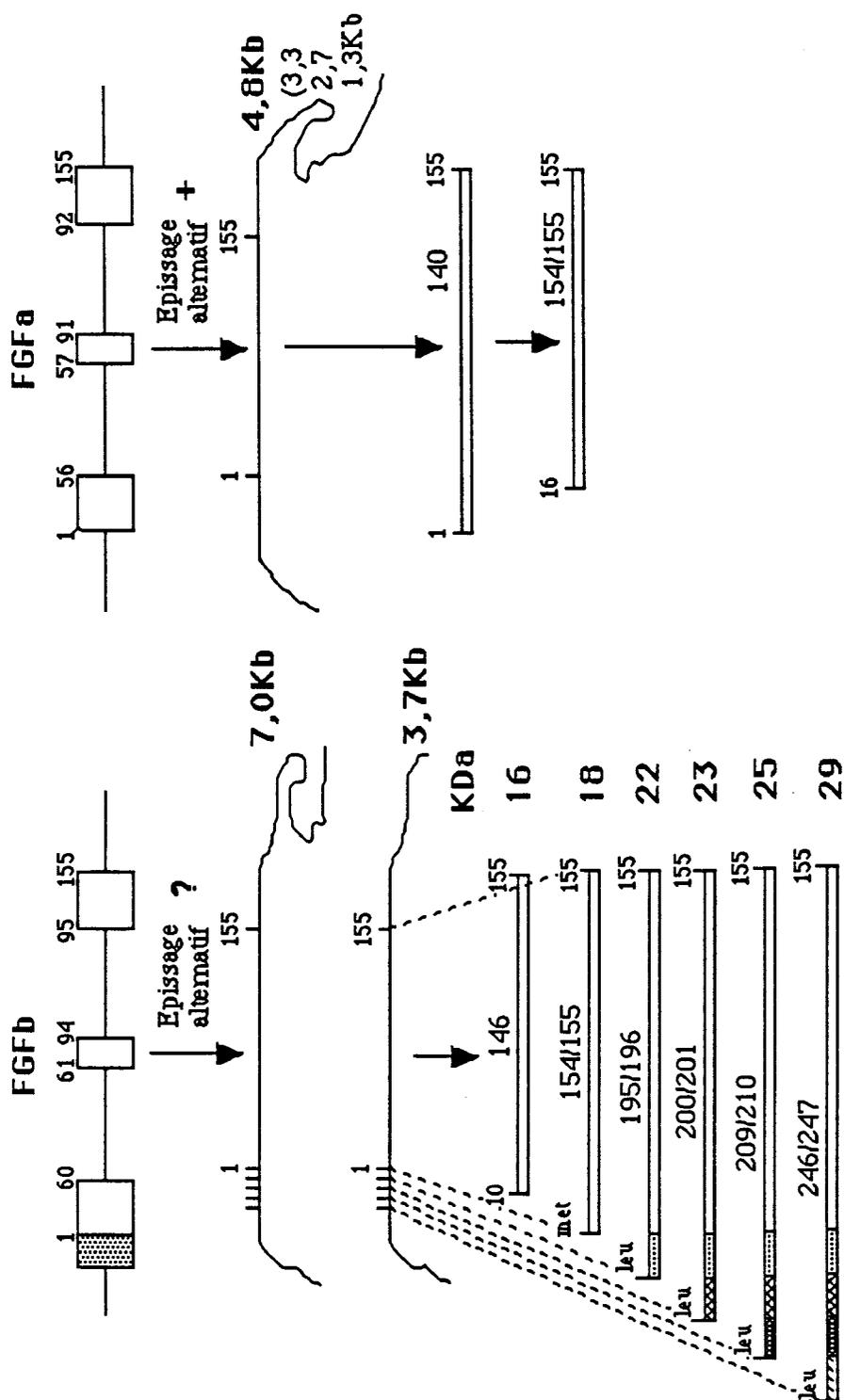


Figure 2: Structure génique et transcription des FGFs acide et basique. D'après Gospodarowicz et coll. (1988) modifié et Baird et Böhlen (1990).

FGF	Localisation tissulaire et cellulaire	Références
FGFa	Tissus Cerveau Rétine Os Cellules musculaires lisses Rein Myocarde Blastème de régénération Chondrosarcome Cellules Satellites Myocytes cardiaques Gliomes Médulloblastome Rhabdomyosarcome	Thomas et coll. (1984) Courty et coll. (1985) ; Baird et coll (1985a) Hauschka et coll. (1986) Winkles et coll. (1987) Gautschi-Sauva et coll. (1987) Thompson et coll. (1986) Boilly et coll. (1990) Shing et coll. (1984) Groux-Muscatelli et coll. (1990) Weiner et Swain (1989) Libermann et coll. (1987) Lobb et coll. (1986b) Lobb et coll. (1986b)
FGFb	Tissus Cerveau Hypophyse Rétine Rein Foie Cœur Muscle squelettique Placenta Surrénale Prostate Os Testicule Cartilage Ovaire Corps jaune Chondrosarcome Mélanome Hépatome Cellules Follicule pituitaire Endothéliale vasculaire Endothéliale capillaire Endothéliale de cornée Corticosurrénale Granulosa Fibroblaste Epithélial pigmentaire rétinien Macrophage Hépatome Rhabdomyosarcome Rétinoblastome	Gospodarowicz (1974, 1975) Böhlen et coll. (1984) Baird et coll. (1985a) Baird et coll. (1985b) Ueno et coll. (1986b) Thompson et coll. (1986) Kardami et coll. (1985) Sommer et coll. (1987) Gospodarowicz et coll. (1986) Story et coll. (1987) Hauschka et coll. (1986) Bellvé et Feig (1984) Klagsbrun et Beckoff (1980) Makris et coll. (1984) Gospodarowicz et coll. (1985) Shing et coll. (1984) Lobb et coll. (1986a) Lobb et coll. (1986a) Ferrara et coll. (1987) Schweigerer et coll. (1987b) Schweigerer et coll. (1987b) Folkman et coll. (1988) Schweigerer et coll (1987a) Neufeld et coll. (1987a) Moscatelli et coll. (1986) Schweigerer et coll. (1987a) Baird et coll. (1985a) Klagsbrun et coll.(1986) Schweigerer et coll. (1987a) Schweigerer et coll. (1987c)

Tableau 2 : Distribution tissulaire et cellulaire des FGF acide et basique.

II) Les récepteurs des FGFs.

A) Caractéristiques biochimiques.

L'activité biologique des FGFs est médiée par des récepteurs spécifiques membranaires. Ces récepteurs ont été identifiés sur un grand nombre de types cellulaires comme les cellules BHK (Moscatelli, 1987 ; Neufeld et Gospodarowicz, 1986), les cellules endothéliales (Friesel et coll., 1986), les cellules épithéliales du cristallin (Moenner et coll., 1986), les fibroblastes (Olwin et Hauschka, 1986 ; Huang et Huang, 1986), les cellules PC12 (Neufeld et coll., 1987b) ainsi que sur des cellules transformées (Moscatelli, 1987). Le récepteur a pu être purifié à partir de cerveau de rat (Imamura et coll., 1988) et a été cloné par différentes équipes. Il a été montré en outre que l'activation du récepteur par la fixation du facteur induit l'autophosphorylation du récepteur au niveau de ses résidus tyrosyl (Huang et Huang, 1986). Les dosages radiorécepteurs par compétition montrent qu'il faut distinguer deux types de sites de fixation des FGFs : Les sites de haute affinité et les sites de basse affinité. Les premiers, qui transmettent le signal (Moscatelli, 1987 ; 1988), fixent les FGFs avec un Kd compris entre 10 et 80 pM (2000 à 80.000 sites récepteurs par cellule). L'affinité de ces récepteurs est plus forte pour le FGFb que pour le FGFa. Cette observation pourrait expliquer le fait que le FGFa en absence d'héparine est 30 à 100 fois moins actif que le FGFb. Des expériences de pontage moléculaire ont révélé l'existence d'une forme de 110 KDa et d'une forme à 130 KDa sur des cellules BHK (Neufeld et Gospodarowicz, 1985, 1986). Les résultats de compétition indiquent que la forme 130 KDa est plus affine pour le FGFb alors que la forme 110 Kda l'est plus pour la forme acide, suggérant ainsi l'existence de deux types de récepteur pour les FGFs (Neufeld et Gospodarowicz,

1986). Cependant d'autres travaux plus récents n'ont pas confirmé l'existence d'une telle dualité (Moscatelli, 1987). Jusqu'à présent on ignore si les sites de fixation spécifique d'int-2, hst, FGF5, FGF6 et KGF sont communs ou différents. Néanmoins, il semblerait que l'utilisation d'antagoniste pour le FGFb inhibe l'effet de hst (Halaban et coll., 1988) suggérant fortement que ce protooncogène agit au niveau des récepteurs des FGFs. Enfin, ces sites de haute affinité possèdent une partie glycanique de 10 à 25 Kda. Les sucres sont reliés au corps protéique de la molécule par des liaisons N-glycosidiques, ils ne sont pas apparentés à l'héparine et sont nécessaires à la fixation du ligand (Feige et Baird, 1988).

Les sites de basse affinité qui ne transmettent pas le signal à la cellule (Moscatelli, 1987) ont une affinité d'environ 100 nM pour leur ligand et sont présents en grande quantité dans les basales. La spécificité de la liaison des FGFs au site de basse affinité est assurée par la partie polysaccharidique de nature sulfate d'héparane. La fonction de ces sites de basse affinité est encore inconnue.

B) Biologie moléculaire et structure des récepteurs des FGFs.

1) Haute affinité.

Le récepteur du FGFb a été récemment cloné par Lee et coll. (1989). La stratégie de clonage de ce récepteur peut être brièvement résumée. Un récepteur putatif de ce facteur a d'abord été isolé par chromatographie d'affinité sur FGFb immobilisé. La digestion trypsique de la protéine et la séquence des fragments obtenus a permis la synthèse de sondes oligonucléotidiques qui furent utilisées pour le tri d'une cDNAtèque d'embryon de poulet de 6 jours. L'ADNc du récepteur du FGFb de poulet a donc ainsi été cloné. Il code une protéine de 91,7 Kda,

contenant un seul domaine transmembranaire, une séquence signal du côté NH₂, 3 domaines extracellulaires immunoglobuliniques comportant 11 sites de glycosylation et un domaine cytoplasmique tyrosine kinase présentant une forte homologie avec les domaines kinases des récepteurs des PDGF, de l'EGF et de l'IL-1 (fig. 3). Le récepteur du FGFb présente néanmoins une région juxtamembranaire plus longue. Une tyrosine kinase très homologue (cek 1¹) a été au même moment clonée chez le poulet par Pasquale et Singer (1989).

La séquence primaire du récepteur du FGFb de poulet présente une forte homologie avec une tyrosine kinase de souris (bek) (Kornbluth et coll., 1988) et le produit du gène FLG humain (Ruta et coll., 1988). Par la suite Ruta et coll. (1989) ont montré que le produit du gène FLG est un récepteur putatif du FGFa étant donné que :

- un antipeptide dirigé contre FLG immunoprécipite le ¹²⁵I-FGFa et le ¹²⁵I-FGFb pontés de manière covalente à des protéines de 130 et 150 KDa issues d'un rhabdomyosarcome ;

- l'antipeptide FLG immunoprécipite des protéines de taille similaire qui sont phosphorylées spécifiquement après traitement avec le FGFa et b ;

- les protéines immunoprécipitées avec l'antipeptide FLG et provenant d'un lysat cellulaire traité avec le FGFa, sont phosphorylées au niveau des tyrosines *in vitro*.

L'ensemble de ces résultats indiquent que FLG serait l'équivalent humain du récepteur au FGFb du poulet et que FLG est un récepteur commun aux FGFa et b. Safran et coll. (1990) ont cloné chez la souris l'ADN codant pour un gène homologue à FLG. Indépendamment, une autre équipe est parvenue à cloner deux messagers codant une forme à

¹ Par convention, le sigle désignant un gène non humain est écrit en minuscules et celui désignant l'homologue humain, en majuscules. Ex : bek et BEK, flg et FLG

deux boucles immunoglobulines et une forme à 3 boucles du récepteur du FGFb, toutes deux homologues de FLG humain (Reid et coll., 1990). En utilisant une sonde bek, Mansukhami et coll. (1990) ont cloné un récepteur du FGFb et du K-FGF (KS/hst), présentant une analogie de 90% avec le récepteur cloné par Lee et coll. (1989) et FLG humain (Ruta et coll., 1989) mais ne possédant pas le premier domaine immunoglobuline.

Les séquences de bek (Kornbluth et coll., 1988) et FLG (Ruta et coll., 1988) sont très homologues mais diffèrent au niveau de l'insert du domaine tyrosine kinase (50% d'identité) ainsi qu'au niveau de la partie COOH terminale. Bien que de telles différences puissent être dues à l'éloignement interspécifique, il existe au niveau de l'insert du domaine kinase du récepteur au PDGF humain et murin une homologie de 85 %, suggérant que bek est en fait le produit d'un gène proche mais différent de flg. L'hypothèse selon laquelle flg et bek ne seraient pas des gènes alléliques fut posée par Safran et coll. (1990) et vérifiée par Dionne et coll. (1990) qui ont réussi à cloner à partir d'une cDNAthèque humaine les ARNm de FLG et de BEK qui codent deux récepteurs membranaires proches mais distincts. FLG et BEK codent le corps protéique de glycoprotéines de 150 et 135 KDa respectivement. Les expériences de fixation et compétition de FGFa et b indiquent que ces deux récepteurs fixent leur ligand avec un Kd compris entre 2 et $15 \cdot 10^{-11}$ M.

L'existence de deux gènes codant pour 2 récepteurs de haute affinité pour les FGFa et b est donc indiscutable, mais l'ensemble des résultats actuels n'indiquent pas l'existence de récepteurs spécifiques pour chacune des formes de FGF. Il semble de plus que des phénomènes d'épissage alternatif puissent être à l'origine de formes de récepteurs plus petites (Dionne et coll., 1990) et donc d'une certaine diversité. En outre, la probabilité de l'existence d'autres gènes codant pour des récepteurs

fonctionnels des FGFs est très forte et les résultats récents obtenus par Pasquale (1990) qui mettent en évidence chez le poulet deux nouvelles tyrosine kinases homologues de FLG et BEK (cek 2 et cek 3), suggèrent qu'il existe bien une famille de récepteurs des FGFs.

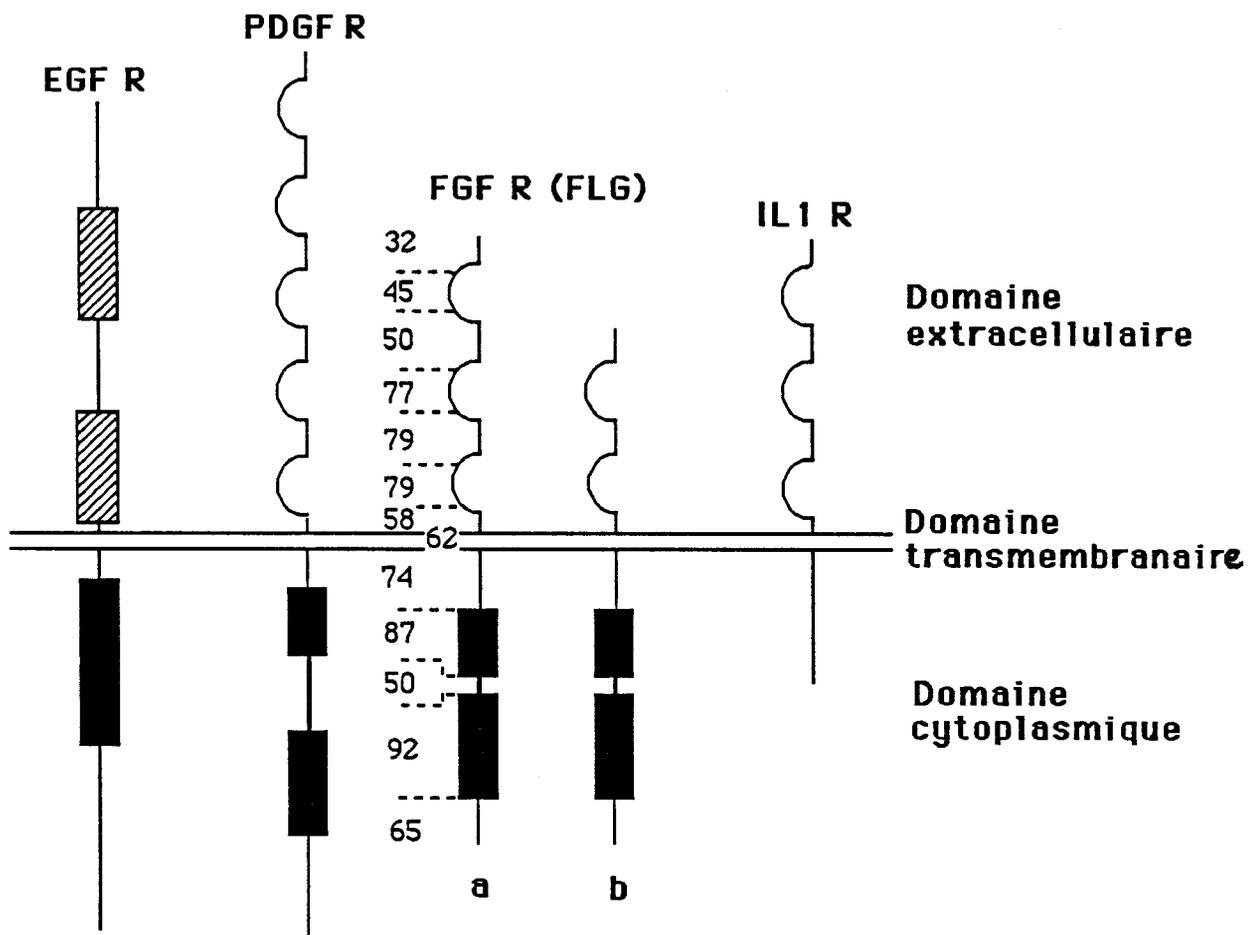


Figure 3 : Comparaison de la structure des récepteurs putatifs des FGFs (FLG ; a, forme à 3 domaines immunoglobulines ; b, forme à 2 domaines immunoglobulines) avec celles des récepteurs du PDGF, de l'EGF et de l'IL-1 d'après Safran et coll. (1990) modifié. Les rectangles noirs représentent le domaine kinase. Les chiffres indiquent le pourcentage d'homologie avec BEK pour les différentes parties du récepteur selon Dionne et coll. (1990).

2) Basse affinité.

Il a été annoncé par Courtois (1990) un travail d'une équipe qui a isolé un protéohéparane sulfate responsable de la fixation de basse affinité (Kiefer et coll., 1990). La méthodologie qui a été employée est basée sur la transfection de cellules lymphoïdes n'exprimant pas le récepteur des FGFs par de l'ADNc provenant d'une cDNAthèque de cellules BHK 21, une lignée cellulaire qui exprime très fortement ce récepteur. Les clones transfectés ont été repérés par leur aptitude à s'attacher dans le fond de boîtes de cultures recouvertes de FGF. Ce protéoglycan s'avère être homologue au Syndecan précédemment cloné (Saunders et coll., 1989).

C) Devenir du ligand et transduction du signal.

Après fixation à son récepteur, les FGFa et b sont internalisés et dégradés en fragment de 10 et 15 KDa (Moenner et coll., 1987). De plus, il a été montré en culture que du FGFb exogène peut être internalisé et accumulé au niveau du nucléole (Bouché et coll., 1987). La signification biologique de ce clivage et de cette localisation nucléolaire n'est pas encore connue.

Il n'existe pas pour l'instant de schéma général du système de transduction du signal des FGFs. On sait qu'il peut y avoir induction de l'adénylate cyclase (Tsuda et coll., 1986 ; Mioh et Cheng, 1987), stimulation de phospholipases impliquées dans la génération de deuxième messenger de type diacylglycérol et activation de la protéine kinase C (Tsuda et coll., 1985 ; Takayema et coll., 1986) et influx de calcium intracellulaire (Tsuda et coll., 1985 ; Magnaldo et coll., 1986). La fixation des FGFs à leurs récepteurs entraîne une augmentation de la phosphorylation de protéines (Magnaldo et coll., 1986 ; Mioh et Cheng, 1987 ; Coughlin et coll., 1988) ainsi que l'activation de la S6 kinase

(Pelech et coll., 1987). Sur des cellules 3T3, les FGFs induiraient spécifiquement la phosphorylation d'une protéine de 90 Kda (Coughlin et coll., 1988). Il a été observé également une activation de l'antiport Na^+/H^+ (Magnaldo et coll., 1986) ainsi que des canaux potassiques (Panet et coll., 1986 ; Halperin et Lobb, 1987 ; Lazkovits et coll., 1988). De plus comme pour d'autres facteurs de croissance, l'expression de c-myc et de c-fos est rapidement induite après fixation des FGFs à leurs récepteurs (Tsuda et coll., 1986 ; Magnaldo et coll., 1986 ; Zeytin et coll., 1988a ; Müller et coll., 1989).

D) Interactions des FGFs avec l'héparine.

Shing et coll. (1984) ont remarqué qu'une partie significative de l'activité "FGF-like" présente dans des extraits de tumeurs, pouvait être retenue sur colonne d'héparine immobilisée. En fait il s'est avéré très vite que cette activité était due effectivement aux FGFs. Depuis, la chromatographie d'affinité sur héparine immobilisée est l'étape essentielle d'une extraction de FGF dans un extrait tissulaire ou cellulaire (Lobb et Fett, 1984 ; lobb et coll., 1986a ; Klagsbrun et Shing, 1985 ; Maciag et coll., 1984 ; Conn et Hatcher, 1984 ; D'amore et Klagsbrun, 1984 ; Courty et coll., 1985 ; Hauschka et coll., 1986 ; Sullivan et Klagsbrun, 1985 ; Gospodarowicz et coll., 1984 ; Pettmann et coll., 1985). Ce critère de caractérisation mena Lobb et coll. (1986a) à proposer de rebaptiser les FGFs sous le sigle d'HBGFs (heparin-binding growth factor). Bien que cette nomenclature qui consisterait à faire suivre "HBGF" par un numéro d'ordre est intéressante dans son souci de simplification, elle peut engendrer une certaine confusion pour des facteurs de croissance affins pour l'héparine mais biochimiquement différents des FGFs comme la protéine P18 découverte récemment par Rauvala (1989).

Après fixation sur une colonne d'héparine immobilisée, le FGFa est élué à 1 M NaCl et le FGFb à 1,5 M NaCl (Shing et coll., 1984). L'héparine potentialise l'activité biologique du FGFa sur de nombreux types cellulaires de 30 à 100 fois (Thornton et coll., 1983 ; Gimenez-Gallego et coll., 1986b), ce qui le rend aussi actif que le FGF basique. Cette potentialisation peut être interprétée comme résultant d'une protection de l'héparine contre une dénaturation ou une dégradation (Gospodarowicz et Cheng, 1986 ; Saksela et coll., 1988) ou par une diminution du Kd au niveau du récepteur (Schreiber et coll., 1985). L'utilisation de peptides synthétiques a permis d'identifier pour le FGFb deux domaines fonctionnels pour la fixation de ce facteur à l'héparine et au récepteur ; ils correspondent aux parties (24-68)-NH₂ et (106-115)-NH₂ du FGFb (Baird et coll., 1988). Pour le FGFa, il semble que la Lysine-118 joue un rôle important car la méthylation de cet acide aminé réduit fortement l'affinité du FGFa pour l'héparine (Harper et Lobb, 1988). Cette interaction forte avec l'héparine ainsi que la modulation possible de l'activité biologique de ces facteurs par cette molécule, indique que l'héparine peut constituer une voie de régulation de l'activité biologique des FGFs. En effet, plusieurs travaux sont venus étayer cette hypothèse. Le FGFb qui est synthétisé par des cellules endothéliales *in vitro* se retrouve associé avec la matrice extracellulaire que produisent ces mêmes cellules (Vlodavsky et coll., 1987 ; Baird et coll., 1987 ; Schweigerer et coll., 1987b). Il a été montré en outre que le FGFb est associé à la membrane de Descemet qui est une basale déposée par les cellules endothéliales de la cornée (Folkman et coll., 1988). Certains auteurs ont de ce fait proposé que l'excrétion des FGF a et b se ferait sous la forme d'un complexe avec les glycosaminoglycanes (GAG). Le FGF stocké dans les matrices peut en être libéré par déplacement avec l'héparine ou par dégradation de cette matrice à l'aide d'enzymes de types

héparinase ou héparanase (Vlodavsky et coll., 1987 ; Baird et coll., 1987 ; Bashkin et coll., 1989). Le fait qu'*in vitro* et *in vivo* les FGFs sont trouvés en association avec les membranes basales contenant des GAG sulfatés de type sulfates d'héparanes, suggère que ces composants de la matrice constituent un compartiment de stockage de ces facteurs et que les FGFs piégés mais protégés dans la matrice extracellulaire pourraient être libérés localement par des enzymes de type héparanase et des protéases (Klagsbrun et coll., 1986 ; Jeanny et coll., 1987 ; Folkman et coll., 1988 ; Thompson et coll., 1988). A ce sujet il est intéressant de constater que certaines tumeurs où se met en place une vascularisation importante, présentent un niveau élevé d'héparanases (Motowono et coll., 1988).

III) Activités biologiques des FGFs et leurs rôles au cours de l'angiogenèse et du développement.

A) Cellules cibles.

Actuellement la très grande partie des connaissances concernant les cellules cibles et leur réponse vis à vis des FGFs sont issues d'études réalisées *in vitro*. La famille des FGFs est remarquable par son large spectre d'action et la variété des réponses cellulaires qu'ils induisent ainsi que par les faibles doses requises pour leurs activités. Les FGFs stimulent la prolifération d'un grand nombre de lignées cellulaires d'origine mésodermique et neurectodermique comme : les fibroblastes (Gospodarowicz, 1974), les cellules endothéliales vasculaires (Gospodarowicz et coll., 1976) et capillaires (Gospodarowicz et coll., 1984), les cellules musculaires lisses de vaisseau (Winkles et coll., 1987), les mélanocytes (Halaban et coll., 1987), les cellules de la granulosa (Gospodarowicz et coll., 1985), les chondrocytes (Kato et

Gospodarowicz, 1984), les myoblastes (Linkhart et coll., 1980), les cellules épithéliales de cornée (Thompson et coll., 1982) et de cristallin (Cuny et coll., 1986), les cellules gliales et les précurseurs neuronaux (voir plus loin). Les FGFs provoquent également des réponses non mitotiques comme la stimulation de la mobilité des fibroblastes (Senior et coll., 1987) et de cellules endothéliales (Presta et coll., 1986). En outre le FGFb agit sur la production d'activateur du plasminogène dans des cellules endothéliales (Presta et coll., 1986), active la synthèse de protéoglycans sulfatés par les chondrocytes (Kato et Gospodarowicz, 1985), stimule la sécrétion de prolactine et de thyrotropine par des cellules de l'hypophyse (Baird et coll., 1985) et agit sur la stabilisation des ARNm de cellules neurosécrétrices (Zeytin et coll., 1988b). Nous reviendrons plus en détail sur les effets des FGFs sur les types cellulaires issus du système nerveux.

In vivo, l'administration de FGFs exogènes notamment au niveau de plaie entraîne une accélération des processus de cicatrisation. Les FGFs stimulent la cicatrisation de l'épithélium de cornée (Fredj-Reygrobellet et coll., 1987 ; Petroutsos et coll., 1984 ; Müller et coll., 1985) et la régénération du cartilage (Cuevas et coll., 1988). L'effet le plus spectaculaire de l'application *in vivo* des FGFs est certainement la formation de néovascularisations ce qui fera l'objet du paragraphe suivant.

FGF acide et basique partagent les mêmes effets biologiques aux niveaux des mêmes cellules cibles et on peut affirmer que ce que l'un "sait faire", l'autre le peut également. Quelques rares travaux décrivant une réponse spécifique à une forme de FGF ont été cependant rapportés (Halaban et coll., 1987 ; Lipton et coll., 1988 ; Vallès et coll., 1990). Ils suggèrent dans ce cas, l'existence de formes spécifiques de récepteurs des FGFs.

B) FGFs et angiogenèse.

L'effet le plus spectaculaire *in vivo* de l'application locale de FGF est certainement l'induction d'une néovascularisation. Cette capacité angiogène est compatible avec les données provenant d'expériences menées *in vitro* qui montrent que les FGFs sont mitogènes pour les cellules endothéliales vasculaires (Gospodarowicz et coll., 1976 ; Gospodarowicz et coll., 1984), chémotactiques pour ces mêmes cellules (Presta et coll., 1986) et activent l'excrétion d'enzymes de dégradation de la matrice comme la collagénase (Presta et coll., 1986 ; Chua et coll., 1987) et l'activateur du plasminogène (Presta et coll., 1986 ; Moscatelli, 1987; Montesano et coll., 1986), enzymes dont la présence est nécessaire *in vivo* à la migration des cellules endothéliales. *In vivo* les modèles de la membrane chorioallantoïdienne et de la cornée ont été utilisés pour démontrer l'activité angiogène de ces facteurs (Shing et coll., 1985 ; Folkman et Klagsbrun, 1987 ; Lobb et coll., 1985 ; Abraham et coll., 1986a ; Thomas et Gimenez-Gallego, 1986 ; Esch et coll., 1986). D'autres situations suggèrent fortement que les FGFs sont des facteurs angiogéniques naturels *in vivo*. Ainsi les FGFa et b sont exprimés au cours du développement dans le cerveau (Risau, 1986) et le rein (Risau et Ekblom, 1986) au moment où la vascularisation de ces organes est intense. C'est aussi le cas chez l'adulte lors de la formation du corps jaune où une activité angiogénique et une prolifération importantes des cellules endothéliales ont lieu en présence de FGFb (Gospodarowicz et coll., 1985; Shimazaki et coll., 1988) qui est synthétisé par les cellules de la granulosa (Neufeld et coll., 1987a). Enfin les FGFs sont produits par des tumeurs solides dont la croissance nécessite la mise en place d'une vascularisation (revu dans Folkman et Klagsbrun, 1987).

C) FGFs et développement embryonnaire.

L'implication des FGFs au cours des phases du développement embryonnaire paraît de plus en plus évident, mais la véritable fonction de ces facteurs est difficile à cerner tant ces facteurs sont multifonctionnels (Sporn et Roberts, 1988). Des approches descriptives et expérimentales ont été employées pour tenter d'apporter des éléments de réponse à ce problème passionnant.

La présence de ces facteurs a été recherchée dans divers organes embryonnaires. Les FGF a et b ont été mis en évidence dans le cerveau, la rétine et l'humeur vitrée d'embryon de poulet de 11 jours (Mascarelli et coll., 1987). Le FGF sans distinction de forme, a été trouvé dans l'albumen dans le jaune d'œuf ainsi que dans l'embryon et le bourgeon d'aile de poulet de 2,5 jours (Seed et coll., 1988). Il apparaît également que le niveau de FGF dans l'embryon entier est constant entre les jours 2,5 et 6 mais s'accroît ensuite jusqu'au 13^{ème} jour. En revanche le niveau de FGF dans le bourgeon d'aile est plus élevé que dans le reste du corps jusqu'au jour 5 puis décroît entre 6 et 7 jours pour s'accroître à nouveau ensuite mais reste cependant à un niveau plus faible que dans le reste de l'embryon. Le FGFb a été quantifié dans le bourgeon d'aile de poulet (Munaim et coll., 1988). Les résultats de cette étude montrent que dans le bourgeon d'aile de 3 jours, le niveau de FGFb est 3 à 4 fois plus important qu'à 4, 5 et 6 jours. Le développement et la morphogenèse de l'aile d'oiseau est sous le contrôle de la zone d'activité polarisante ou ZPA (Saunders et Gasseling, 1968). Il semble qu'*in vitro*, l'effet de cette zone sur la croissance des autres parties du bourgeon d'aile mis en coculture, puisse être mimé en partie par la présence de FGFb dans le milieu de culture (Aono et Ide, 1988), suggérant ainsi que le FGFb est un des facteurs sécrétés par la ZPA.

Dans le cerveau de poulet embryonnaire, Risau (1986) a montré que l'activité mitogène d'extraits de cerveau sur des cellules endothéliales varie au cours du développement et présente un maximum aux environs du 16^{ème} jour de développement. Une étude ultérieure (Risau et coll., 1988) montre que cette activité (embryonic brain angiogenic factor ou EBAF) peut être au moins en partie attribuée au FGFa. Nous avons confirmé ces résultats par RIA pour le FGFa (Thomas, 1987). Nous avons montré que la concentration du FGFa est faible dans les cerveaux d'embryons de 7 jours et augmente ensuite pour atteindre un plateau entre 14 et 17 jours. Un autre facteur de croissance (l'embryonic kidney-derived growth factor ou EKdAF) proche sinon identique au FGFa, a également été détecté dans le rein embryonnaire de souris de 14 et 17 jours (Risau et Ekblom, 1986). Comme ces facteurs sont présents au moment où la vascularisation débute dans ces organes, il a été envisagé qu'ils pourraient avoir un rôle angiogène au cours du développement (Risau, 1986 ; Risau et Ekblom, 1986). Le FGFb a également été détecté par immunohistochimie dans de nombreux organes d'embryon de souris de 12 jours (Gonzalez et coll., 1990) confirmant ainsi l'observation antérieure de la présence de messagers pour ce facteur (Abraham et coll., 1986a). Chez le fœtus humain, Wang et coll. (1989) ont détecté à 13 semaines par "Northern blot" la présence d'ARNm du FGFa dans le cerveau et le rein embryonnaire mais pas dans le foie ni le placenta. Chez l'embryon de poulet, une immunoréactivité vis à vis du FGFb a été détectée dans le cytoplasme de cellules neuroépithéliales d'embryon de 2 jours mises en culture. *In situ* cette immunoréactivité apparaît plus tardivement dans les neurones et les fibres nerveuses de la moelle épinière de 6 jours et de manière très intense à 10 jours (Kalcheim et Neufeld, 1990). Grâce à un RIA ces mêmes auteurs montrent que le FGFb est

présent dans la moelle épinière dès le 3ème jour à un niveau bas mais que celui ci augmente par la suite.

La présence de FGFs ou de leurs ARNm a été rapportée pour des stades embryonnaires très précoces. En effet, des transcrits codant pour une molécule très proche du FGFb sont présents dans les œufs fertilisés de xénope et plus particulièrement dans les blastulas (Kimmelman et Kirschner, 1987). Le FGFb a été par la suite isolé dans des œufs (Kimmelman et coll., 1988 ; Slack et Isaacs, 1989) ainsi que dans les blastulas de xénope (Slack et Isaacs, 1989). Chez les mammifères des données de ce type sont plus rares, probablement en raison de la moindre disponibilité du matériel biologique. Le carcinome embryonnaire constitue une alternative intéressante car il est composé de cellules multipotentes, rappelant de ce fait les premières phases du développement embryonnaire des mammifères. Il s'avère que des cellules de carcinome embryonnaire de souris produisent une protéine immunologiquement proche du produit de l'oncogène K-FGF (hst) et une autre apparentée aux FGFs mais distincte des formes acide et basique (Heath et coll., 1989). Il est probable que la technique de la "polymerase chain reaction" (PCR) permettra prochainement de détecter des messagers codant pour les FGFs dans les embryons de mammifères.

Un autre protooncogène de la famille des FGFs, int-2, est exprimé sélectivement chez l'embryon. En effet, cet oncogène n'est pas détecté dans les tissus normaux adultes (Dickson et coll., 1984) mais l'a été par "Northern blot" dans les embryons de souris avant 7,5 jours (Jakobovitz et coll., 1986). Par hybridation *in situ*, les transcrits de ce protooncogène ont été détectés dès le stade de la gastrulation et plus tard dans les cellules somitiques en migration, dans les cellules neuroépithéliales de la partie postérieure du cerveau et dans les poches pharyngiennes (Wilkinson et coll., 1988). Ce même oncogène est exprimé plus tard chez l'embryon de

14,5 jours au niveau des cellules de Purkinje du cervelet, dans la rétine, le mésenchyme de la dent et dans l'oreille interne (Wilkinson et coll., 1989). Hébert et coll. (1990) ont montré que les ARNm des FGFa, b et 5 sont exprimés dans la plupart des tissus embryonnaires de souris, contrairement à ceux du K-FGF qui ne sont exprimés que dans des cellules de teratocarcinome indifférencié.

Les sites de fixation spécifiques ont été plus tardivement recherchés dans les tissus embryonnaires. Chez l'embryon de poulet, Olwin et Hauschka (1990) identifient pour le FGFa deux récepteurs putatifs et montrent que la fixation spécifique de FGFa est plus forte sur les préparations de membranes d'embryon de 2 à 7 jours mais qu'elle décroît ensuite d'un facteur 5 entre le 7ème et le 13ème jours, la présence de sites de fixation ne demeurant détectable à 19 jours que dans le cerveau, l'œil et le foie. Dans notre laboratoire, une étude similaire a montré que la fixation spécifique de FGFa et b sur des préparations membranaires de cerveau d'embryon de poulet, suit une évolution parallèle ; maximum à 7 jours, le nombre de sites de fixation de haute affinité décroît de moitié dès 10 jours, conserve ce niveau jusqu'à l'éclosion et diminue fortement dans le cerveau adulte (Hondermarck, 1990). Des ARN messagers codant pour une forme de récepteur du FGF ont été détectés dans le cerveau de souris à E14¹, E19 et P14² (Reid et coll., 1990). Dans l'œil (Fayein et coll., 1990), des sites de fixation à basse affinité pour le FGFb et sensibles à l'héparinase, ont été détectés par fixation de facteur iodé dès 9 jours au niveau de la lame basale qui enveloppe la vésicule optique ; plus tard, des sites de haute affinité non sensibles à l'héparinase apparaissent dans la rétine des embryons de 17-18 jours au niveau de l'épithélium pigmentaire et entre les couches cellulaires, lieu d'une synaptogenèse intense.

¹ Quatorzième jour du développement embryonnaire.

² Quatorzième jour du développement postnatal.

Dans une approche expérimentale, Slack et coll. (1987) ont constaté que le FGFb est capable d'induire la différenciation mésodermique des cellules du pôle animal de blastula d'amphibien. Cet effet semble spécifique puisque l'EGF, le PDGF, l'insuline, la gonadotrophine chorionique, l'interleukine alpha et beta, l'IL3, l'interféron 2 et Gamma, le tumor necrosis factor (TNF), le TGF β , le G-CSF, le GM-CSF n'ont aucun effet. Kimmelman et Kirschner (1987) ont confirmé l'effet inducteur du FGFb mais constatent que l'induction par ce facteur de l'expression d'actine (marqueur de différenciation mésodermique utilisé par ces auteurs) est relativement limitée mais qu'elle peut être potentialisée par le TGF β qui seul est inefficace. Ces résultats ainsi que ceux montrant la présence de FGFb (Slack et Isaacs, 1989), de ses transcrits (Kimmelman et Kirschner, 1987) et de sites de fixation spécifique de haute affinité pour les FGFs (Gillespie et coll., 1989) dans les jeunes embryons d'amphibiens, suggèrent très fortement que les FGFs sont des inducteurs naturels du feuillet mésodermique. D'autres facteurs de la famille des FGFs comme hst/KS et dans une moindre mesure int-2 possèdent également des capacités inductrices (Paterno et coll., 1989). Dans une étude plus récente comparant les effets inducteurs du FGFb de xénope et du XTC-MIF (mesoderm inducing factor), une molécule apparentée au TGF β et purifiée à partir d'une lignée cellulaire de xénope, Green et coll. (1990) ont montré que le XTC-MIF est 40 fois plus actif dans l'induction de muscle que le FGFb. Il apparaît en outre des différences entre les types de structures induites par ces deux facteurs ; XTC-MIF induit préférentiellement en plus du muscle, du tissu nerveux, de la corde et du pronéphros alors que le FGFb induit seulement du muscle. Ce travail semble donc minimiser le rôle inducteur du FGFb et suggère que le FGFb ne peut être le seul inducteur mésodermique *in vivo*.

Il suggère aussi que XTC-MIF serait un inducteur du mésoderme antérodorsal et le FGFb un inducteur du mésoderme postéroventral.

L'hypothèse de la participation du FGFb dans l'induction mésodermique chez les vertébrés supérieurs a été étayée récemment par la mise en évidence du FGFb et ses ARNm dans des stades prégastruliens d'embryon de poulet et d'un effet inhibiteur de l'induction par l'héparine et la suramine (Mitrani et coll., 1990).

Les travaux concernant l'action des FGFb sur la croissance et la différenciation cellulaire des tissus embryonnaires se multiplient. Richman et Crosby (1990) ont montré qu'en culture, le FGFb agit sur la croissance cellulaire et la différenciation cartilagineuse d'explants faciaux issus du massif fronto-nasal d'embryon de poulet mais pas sur les massifs mandibulaires et maxillaires, suggérant ainsi que le FGFb pourrait contrôler différenciellement la croissance des ébauches faciales. Dans une étude similaire, Hyldahl et coll. (1990) ont montré que le FGFb stimule la synthèse d'ADN de cellules endothéliales de cornée d'embryon humain de 10-12 semaines et que ce facteur est produit dans les régions postérieures du globe oculaire, suggérant qu'*in vivo* la production locale du FGFb stimule la prolifération des cellules endothéliales de la cornée.

La myogenèse est un processus dans lequel le FGF joue probablement un rôle important. En effet, plusieurs travaux ont montré que le FGF est mitogène pour des myoblastes d'origines variées (Gospodarowicz et coll., 1976 ; Linkhart et coll., 1980 ; Kardami et coll., 1985). Il semble cependant qu'il existe pour des myoblastes issus de bourgeons d'aile d'embryon de poulet de 4-12 jours des sous-classes de cellules pour lesquelles le FGFb diffère la différenciation et d'autres pour lesquelles le FGFb est nécessaire à la différenciation (Seed et Hauschka, 1988). Un travail récent montre que le muscle embryonnaire exprime les ARNm du FGFa et du FGFb, que cette expression décroît

après la naissance et qu'*in vitro* les ARNm de ce facteur disparaissent lors de la différenciation des cellules satellites en myotubes (Alterio et coll., 1990). Groux-Muscatelli et coll. (1990) ont confirmé que le niveau de FGFa coïncide avec le niveau de ces messagers lors de la différenciation des cellules satellites en myotubes.

De manière fort élégante, Liu et Nicoll (1988) ont montré que le FGF endogène a un rôle dans la différenciation des embryons de mammifères. En infusant, de manière continue un anticorps dirigé contre le FGFb, au niveau d'embryons de rat implantés dans la capsule rénale d'animaux adultes syngéniques, il est possible de retarder la croissance et la différenciation de l'endoderme et du mésoderme.

IV) FGFs et neurogenèse.

Beaucoup de facteurs, ayant une action sur la prolifération et/ou la différenciation de lignées cellulaires dérivées du système nerveux, ont été identifiés. La localisation de ces facteurs n'est d'ailleurs pas limitée au système nerveux. Citons par exemple le NGF, le PDGF, l'EGF et les FGFs. Ces derniers tiennent un place tout à fait remarquable parmi les facteurs de croissance car ils agissent à la fois sur la prolifération et la différenciation d'un éventail extrêmement large de cellules d'origine mésodermique et neurectodermique. Notre travail s'inscrivant dans l'étude du rôle possible de ces facteurs dans le tissu nerveux, nous allons nous attarder plus longuement sur les effets des FGFs au niveau des cellules nerveuses.

A) Activités biologiques.

Nous verrons d'abord les effets des FGFs sur les neurones puis sur les cellules gliales.

1) Actions des FGFs sur les neurones.

L'activité neurotrophique des FGFs a été examinée *in vitro* et *in vivo*.

a) Etudes réalisées *in vitro*.

Les premiers indices concernant une action neurotrophique des FGFs sont issus de travaux sur des cellules de pheocromocytome PC12 qui avait déjà été utilisée pour le NGF. Ainsi en présence de NGF, les PC12 s'arrêtent de proliférer, deviennent excitable et produisent des neurites fonctionnels (Greene et Tischler, 1982). Comme pour le NGF, le FGFb induit sur les PC12 l'arrêt de la prolifération et la poussée de neurites (Togari et coll., 1983 ; 1985 ; Wagner et D'Amore, 1986 ; Neufeld et coll., 1987 ; Rydel et Greene, 1987). Jusqu'à présent aucune action différente de celles exercées par le NGF n'a pu être décelée.

En culture et en absence de sérum, les FGFs sont capables d'assurer la survie de neurones fœtaux et néonataux d'origine variée comme ceux de l'hippocampe (Walicke et coll., 1986, 1988), du néocortex (Morrison et coll., 1986), du mésencéphale (Ferrari et coll., 1989), du septum (Grothe et coll., 1989), des ganglions ciliaires (Unsicker et coll., 1987 ; Lipton et coll., 1988), du cervelet (Hatten et coll., 1988). De plus les FGFs stimulent la prolifération de neuroblastes (Gensburger et coll., 1987). En général la FGFb est plus actif que le FGFa. Une seule étude fait état d'une réponse spécifique de neurones ganglionnaires rétiniens au FGFa en culture (Lipton et coll., 1988).

In vitro, l'association de FGFb à des matrices artificielles composées d'héparine ou de chondroïtine sulfate, augmente l'adhésion, l'agrégation et la poussée de neurites des neurones mis en culture (Schubert et coll., 1987 ; Walicke, 1988 ; Rogelj et coll., 1989). Ce qui suggère qu'*in vivo* les FGFs stockés dans la matrice extracellulaire pourraient contrôler le développement neuronal.

Les FGFs induisent l'activité choline acétyltransférase (Unsicker et coll., 1987 ; Grothe et coll., 1989) et l'excrétion de protéines (Knusel et coll., 1990). Mattson et coll. (1989) ont montré que le FGF peut abolir en prétraitement l'effet toxique du glutamate sur des neurones pyramidaux ainsi que son effet négatif sur la poussée de neurites. L'obtention de cultures virtuellement pures en neurones et l'observation du maintien des effets neurotrophiques dans de telles cultures permet d'envisager sérieusement une action directe des FGFs sur les neurones, non médiée par les cellules gliales (Walicke et Baird, 1988). Cette action directe a été confirmée sur des cultures de neurones septaux (Knusel et coll., 1990). Cette dernière étude semble indiquer également que cette action directe s'exerce plus particulièrement sur les neurones cholinergiques du septum. Il a été montré que le FGFa stimule l'augmentation du niveau d'opsine dans des cultures de photorécepteurs rétiniens et prolonge la survie de ces cellules (Hicks et Courtois, 1988).

La transduction du signal provoquant la différenciation et l'induction de neurites de neurones a été étudiée, il apparaît que l'activation de la PKC n'est pas nécessaire à l'induction de neurites (Posypanova et coll., 1990 ; Morrison et coll., 1988 ; Damon et coll., 1990). De plus, l'AMPc n'est pas non plus le second messager nécessaire aux changements morphologiques (Damon et coll., 1990).

Une protéine est dite neurotrophique si elle assure la survie des neurones en culture, stimule la poussée de neurites et induit la synthèse de

neurotransmetteurs. L'ensemble des résultats apportés par les différentes études réalisées *in vitro* sur des cultures de neurones, permet de classer les FGFs parmi les facteurs neurotrophiques car ils répondent à cette triple exigence.

b) Etudes réalisées *in vivo*.

L'effet neurotrophique des FGFs a été également testée *in vivo* notamment après lésion du système nerveux central ou périphérique. Ainsi, l'administration exogène de FGFb à proximité d'une lésion du SNC permet d'augmenter la survie de neurones cholinergiques du septum médian après section de la fimbria (Anderson et coll., 1988 ; Otto et coll., 1989), de limiter la perte d'activité acétylcholine transférase (Barotte et coll., 1989) et fait réapparaître l'activité tyrosine hydroxylase après lésion chimique du striatum (Otto et Unsicker, 1990). Lors de la section du nerf optique, un implant de FGFa permet d'obtenir une réduction de la perte de neurones ganglionnaires (Sievers et coll., 1987). Rappelons qu'en culture, seule la forme acide est active sur la régénération axonale de ces mêmes neurones ganglionnaires (Lipton et coll., 1988). Chez l'embryon de poulet, l'administration de FGFb au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne suffit à réduire la mort des neurones cholinergiques du ganglion ciliaire qui survient normalement au cours du développement embryonnaire de poulet entre E8 et E14. Récemment, il a été montré que la dégénérescence des photorécepteurs provoquée par une dystrophie rétinienne héréditaire, peut être retardée par injection au niveau de la rétine de FGFb (Faktorovich et coll., 1990). Le modèle de la lésion du nerf sciatique a été plus récemment utilisé. Il consiste pour l'essentiel à enlever un petit tronçon de ce nerf et à relier les deux extrémités du nerf ainsi amputé par un tube en silicone dans lequel on injecte la substance à tester. De cette manière il a été montré que le FGFb permet une réduction de la mort des neurones ganglionnaires de la racine dorsale de

la moelle épinière ainsi que la régénération du nerf sciatique (Otto et coll.,1987 ; Danielsen et coll., 1988). Il faut cependant demeurer prudent quant à l'interprétation de ce résultat car la chambre de régénération est le siège d'une vascularisation et de la prolifération de cellules de Schwann qui on le sait sont nécessaires à la régénération des nerfs périphériques. Le FGFb étant un puissant agent angiogène, il est difficile d'apprécier alors le rôle direct de ce facteur dans la régénération du nerf sciatique. De même le FGFa provoque une augmentation du nombre de fibres myéliniques qui régénèrent dans la chambre ainsi que le nombre d'axones provenant de neurone moteurs ou sensoriels (Cordeiro et coll.,1989).

L'ablation d'un organe cible du tissu nerveux constitue également un modèle intéressant pour évaluer les potentialités neurotrophiques d'une substance. De cette manière Blottner et coll. (1989) ont montré que le FGFb est présent dans les cellules chromaffines et que l'implantation de FGFb en lieu et place d'une médullosurrénale préalablement détruite, permet la maintenance de neurones intermédiolatéraux de la moelle épinière qui viennent innerver cette glande par le nerf splanchnique. Dans un second travail, Blottner et Unsicker (1990) montrent en utilisant le même système que le maintien de l'innervation est absolument nécessaire à la survie des neurones. Vaca et coll. (1989) ont montré que le muscle squelettique contient une activité stimulatrice de la cholineacétyl transférase et de la synthèse d'acétylcholine qui peut être attribuée au FGFb. Ces résultats suggèrent une action rétrograde d'un agent trophique et que le FGFb présent dans des organes en développement ou matures, pourrait contribuer au développement et à la maintenance de l'innervation de ces organes. Cependant rien ne permet d'attribuer aux FGFs cette action, car jusqu'à présent le transport rétrograde des FGFs vers des neurones n'a pas encore été relaté.

L'ensemble de ces résultats ne permettent pas de faire la part entre l'action directe des FGFs sur les neurones, clairement démontrée *in vitro*, et une éventuelle action indirecte de ces facteurs via la glie environnante. Néanmoins, quel que soit leur mode d'action, les possibilités d'une utilisation thérapeutique dans des situations de déficit nerveux post-traumatiques ne peut pas être négligée.

Par ailleurs, l'analyse des résultats obtenus aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, fait apparaître une action privilégiée des FGFs sur la maintenance et la poussée de neurites de neurones cholinergiques. Enfin, leur action *in vitro* sur la prolifération de neuroblastes et la présence de ces facteurs en grande quantité dans les tissus nerveux adultes suggèrent un rôle possible de ces facteurs lors de la neurogenèse et la maintenance des neurones dans le système nerveux central adulte.

2) Action des FGFs sur les cellules gliales.

Nous évoquerons les effets mitogènes puis les effets non mitogènes sur les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann.

a) Effet mitogène.

Les FGFa et b sont mitogènes pour des cultures primaires d'astrocytes immatures (astroblastes) en milieu défini (Morrison et De Vellis, 1981 ; Pettmann et coll., 1985). Le FGFb est actif sur ces cellules à des doses comparables à celles requises pour les neurones. Il a également été montré que le FGF est capable de stimuler des astrocytes quiescents à réentrer dans le cycle cellulaire (Kniss et Burry, 1988) mais seule une dose importante permet d'obtenir cet effet. Perraud et coll. (1988) montrent que l'héparine potentialise de la même manière l'effet mitogène des FGFa et b. Les auteurs interprètent ce résultat comme un

élément en faveur d'un récepteur commun pour les FGFa et b au niveau de la membrane des astroblastes.

Les FGFs ne sont pas les seuls facteurs de croissance actifs sur la prolifération des astrocytes. L'EGF est un mitogène encore plus puissant pour ce type cellulaire. De manière intéressante, il a été constaté qu'un prétraitement d'une culture d'astrocytes par du FGF entraîne une inhibition de l'effet mitogène de l'EGF (Huff et Schreier, 1990). Le TGF β 1 quant à lui, potentialise l'effet mitogène du FGFb sur les astroblastes (Labourdette et coll., 1990).

L'effet mitogène *in vitro* des FGFs sur des oligodendrocytes immatures provenant de rat néonataux a été démontré (Saneto et De Vellis, 1985 ; Eccleston et Silberberg, 1985). Les FGFa et b sont aussi efficaces sur la prolifération des oligodendrocytes (Delaunoy et coll., 1988) alors que sur d'autres types cellulaires non nerveux, une stimulation plus intense du FGFb est toujours observée. En outre, l'effet mitogène du FGF basique peut être potentialisé *in vitro* par de faibles doses de TGF β ; par contre de fortes doses de ce facteur sont partiellement inhibitrice (Besnard et coll., 1989a).

Un travail récent montre que la stimulation par les FGFs de la prolifération de cellules de Schwann issues du nerf sciatique est possible à la condition d'ajouter au milieu de culture de la forskoline ou de la toxine cholérique ou en encore du dbAMPc (Davis et Stroobant, 1990). Ce résultat suggère que le signal commandant la prolifération de ces cellules par le FGF, nécessite une augmentation de l'AMPc intracellulaire.

b) Effets non mitogènes

Les effets non mitogènes sur les astrocytes sont essentiellement de trois types : effet chémotactique, effets sur la morphologie et effets métaboliques.

Effet chémotactique.

Le FGFa agit sur la migration des astrocytes et est chemoattractant sur ces cellules *in vitro* (Senior et coll., 1986). Jusqu'à présent on ne sait pas si l'effet chemotactique est médié par le même récepteur que l'effet mitogène.

Effets sur la morphologie des astrocytes.

Les effets des FGFs ont été observés sur la morphologie de la cellule ainsi que sur son ultrastructure. Au niveau morphologique, la présence des FGFs dans le milieu de culture dépourvu de sérum modifie la morphologie initiale des astroblastes. Ils acquièrent une forme étoilée typique de l'astrocyte mature. Si la culture est prolongée, les différences par rapport aux cultures témoins s'accroissent, les astrocytes prennent un allure très fibreuse et les prolongements cellulaires forment un réseau dense. Il semble que le FGFa ne puisse pas entraîner ces transformations sur la totalité des cellules dont certaines gardent une allure immature (Perraud et coll., 1988b). Au niveau ultrastructural, le FGFa provoque préférentiellement l'apparition de filaments intermédiaires. Par contre le FGFb favorise plus l'apparition de microtubules alors que les filaments intermédiaires restent rares en présence de ce facteur. Le FGFa active aussi l'apparition de desmosomes (Perraud et coll., 1988b). Ces résultats indiquent que les effets du FGFa et b ne sont pas tout à fait équivalents contrairement à l'effet mitogène.

Modification biochimique et synthèse de protéine.

La protéine S6 est une protéine de la petite sous-unité du ribosome dont la phosphorylation est supposée intervenir dans le contrôle de la synthèse de certaines protéines. Pelech et coll. (1986) ont montré que de cellules 3T3 traitées par les FGFs présentent une activation de la kinase S6. Plus récemment, Gavaret et coll. (1989) ont mis en évidence une

activation par le FGFa et b de la kinase S6 dans des astrocytes et ce, sans différence d'efficacité entre les deux facteurs.

La 5'-déiodinase catalyse l'activation métabolique de la T4 en T3 et tient un rôle clé dans le métabolisme de la iodothyronine dans le cerveau. Courtin et coll. (1990) ont montré que le FGFa est un inducteur puissant de l'activité 5'-deiodinase d'astrocytes en cultures tandis que le FGFb est moins efficace.

La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), un marqueur de la différenciation astrocytaire, est une protéine synthétisée par les astrocytes qui se polymérise pour former des filaments intermédiaires ; il semble que ce soit le FGFa qui stimule la production de GFAP et non le FGFb (Morrison et coll., 1985), confirmant ainsi le fait que le FGFa stimule l'apparition de filaments intermédiaires (Perraud et coll., 1988a).

La protéine S100 est une protéine membranaire qui stimule l'extension de neurites. A l'aide d'une préparation de FGFs, Weibel et coll. (1985) ont montré que la présence de ces facteurs permettait d'obtenir des cultures d'astrocytes deux fois plus riches en protéine S100.

L'activité glutamine synthétase est fortement stimulée par les FGFa et b (Weibel et coll., 1985 ; Perraud et coll., 1988a). De plus il semble que pour cette activité, les deux formes de FGF sont aussi actives l'une que l'autre (Perraud et coll., 1988a). Ces mêmes auteurs (1990) ont d'autre part montré que l'immunoréactivité anti-glutamine synthétase diffère en fonction l'origine des astrocytes.

L'excrétion de l'activateur du plasminogène dans un milieu de culture d'astroblastes, est stimulée par la présence de FGFb ; cette activité est corrélée avec l'activité mitogène de ces cellules pour de faibles doses de FGFb (Rogister et coll., 1988).

L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle des protéines synthétisées par des astroblastes en culture, montre que les FGFa et b

affectent de manière identique la synthèse d'une cinquantaine de protéines non identifiées (Loret et coll., 1989).

Au niveau des oligodendrocytes, le FGFb induit un allongement et généralement la formation de deux prolongements (Delaunoy et coll., 1988). Les FGFs entraînent également des modifications sur le métabolisme de ces cellules au niveau de:

- l'activité CNP (2'3'-cyclic nucléotide 3' phosphohydrolase) ; après 13 jours de culture, la présence de FGFa et b diminue fortement l'activité de cette enzyme par rapport aux cultures contrôles (Besnard et coll., 1989) ;

- la protéine basique de la myéline (MBP) ; protéine produite par les oligodendrocytes matures et constituant un des composants essentiels de la gaine de myéline, le FGF entraîne une diminution des populations MBP positives (Besnard et coll., 1989) ;

- l'anhydrase carbonique ; la production de cette enzyme caractéristique des oligodendrocytes est stimulée par le FGFb ; de plus, la présence de précurseurs communs aux oligodendrocytes et aux astrocytes qui sont GFAP et CA positifs, est prolongée *in vitro* sous l'action du FGFb qui stimule en outre leur prolifération (Delaunoy et coll., 1988).

L'ensemble des résultats concernant l'action des FGFs sur les cellules gliales fait apparaître des différences fondamentales entre la lignée astrocytaire et la lignée oligodendrocytaire. Les prolifération des astrocytes immatures est stimulée par les FGFs mais sous l'influence prolongée de ces facteurs, ceux-ci finissent par acquérir un phénotype correspondant aux astrocytes matures c'est à dire des cellules de forme étoilée produisant de la GFAP. En ce qui concerne les oligodendroblastes, les réactions sont comparables pour la stimulation de la prolifération mais

certains travaux montrent qu'une exposition prolongée aux FGFs retardent l'acquisition du phénotype différencié. Ces comportements sont importants à souligner dans le cadre du rôle possible des FGFs sur la glie au cours de l'ontogenèse. Enfin, certains des travaux que nous avons évoqués, relatent l'existence d'effets non mitogènes spécifiques pour le FGFa et le FGFb, notamment sur la lignée astrocytaire. D'autres, rapportent une activité mitogène similaire entre FGFa et FGFb, ce qui crée une différence importante entre les cellules gliales et les lignées cellulaires d'origine mésodermique.

Au terme de ce survol des activités biologiques sur les cellules nerveuses, il est intéressant de signaler que ces facteurs peuvent agir sur le comportement, notamment sur la prise de nourriture. En effet, Hanay et coll. (1989) ont montré qu'une augmentation d'une activité similaire à celle du FGFa survient dans le liquide céphalorachidien de rat après une prise de nourriture et que l'injection intraventriculaire de ce facteur (environ 200 ng) supprime la prise de nourriture ; d'autre part ces auteurs ont constaté que l'application électrophorétique de FGFa au niveau de l'aire hypothalamique latérale (site important du contrôle de la prise de nourriture) supprime l'activité électrique de 75 % des neurones glucose-sensibles. Ces résultats suggèrent que le FGFa pourrait agir dans le SNC sur le contrôle du centre de la satiété. Toutefois, cette action n'est pas spécifique du FGFa puisque le FGFb, l'interleukine-1, les IGFs, l'EGF, le PDGF et le TGF alpha présentent des effets analogues (Plata-Salaman, 1989).

B) Distribution tissulaire et cellulaire des FGFs et de leurs récepteurs dans le système nerveux.

Nous avons déjà évoqué l'abondance des FGFs au niveau du SNC et leur présence dans le SNC embryonnaire. L'obtention d'anticorps dirigés contre les FGFs a permis une approche de la distribution cellulaire de ces facteurs. Malheureusement, ce type de travaux est encore rare. Les premiers résultats sur l'immunolocalisation des FGFs dans le système nerveux ont été rapportés par Pettmann et coll. (1986) qui grâce à un anticorps monoclonal reconnaissant à la fois le FGFb et le FGFa, ont montré une localisation exclusivement neuronale du FGF et ce dans presque tous les neurones du cerveau de jeunes rats. Un autre travail a également rapporté la présence d'une forme de FGFa dans les neurones de cerveau de bœuf (Huang et coll., 1987). En utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la partie 1-21 du FGFb et qualifié de monospécifique par les auteurs, il a été montré une distribution plus restreinte du FGFb dans les neurones de l'hippocampe, les amygdales, le cortex piriforme, le septum, l'hypothalamus, les tubercules olfactifs, le noyau strié, le noyau thalamique antérieur alors que les neurones du néocortex sont dépourvus de toute immunoréactivité. (Finklestein et coll., 1988). Selon ces auteurs, une forte immunoréactivité apparaît aussi sur la bordure d'une lésion pratiquée au niveau du cortex une semaine auparavant, en relation avec l'accumulation à ce niveau de cellules immunoréactives de type astrocytaire. Plus récemment, le FGFb a pu être localisé dans les astrocytes et les neurones du cortex frontal et de façon plus marquée dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, particulièrement dans les plaques séniles (Stopa et coll., 1990). Dans le système nerveux central embryonnaire une immunoréactivité au FGFb a été détecté chez l'embryon de rat de 18

jours (Gonzalez et coll., 1990) et l'embryon de poulet (Kalcheim et Neufeld, 1990).

La rétine constitue également une source abondante de FGFs. Plouët et coll. (1988) ont montré que le FGFa est présent dans les photorécepteurs rétiniens, notamment au niveau des membranes des segments externes de ces cellules. Une seule étude à notre connaissance signale la localisation d'une immunoréactivité FGFa (Caruelle et coll., 1989). Celle-ci est associée à la couche de fibres nerveuses ainsi que dans les segments externes des photorécepteurs et les autres couches cellulaires.

La détection immunohistochimique ne révèle que la localisation d'un antigène mais pas son lieu de synthèse. Seule l'hybridation *in situ* à l'aide de sonde moléculaire permet une telle précision. Une étude récente a localisé les ARNm du FGFb au niveau des neurones du cortex, de l'hippocampe et de l'hypothalamus de rat adulte (Emoto et coll., 1990). Les ARNm du FGFa ont été détectés dans les cellules de Purkinje du cervelet de poulet (Risau, résultats inédits). Les résultats obtenus pour la rétine (Noji et coll., 1990 ; Jacquemin et coll., 1990) indiquent une localisation des messagers du FGFa au niveau des couches cellulaires. Les messagers du protooncogène int-2 ont été détectés dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans la rétine d'embryon de souris de 14,5 jours (Wilkinson et coll. 1989). Dernièrement, Haub et coll. (1990) ont montré que les ARNm du FGF-5 sont exprimés et largement distribués dans le SNC adulte, en particulier au niveau des neurones.

Les tumeurs de cerveau prélevées sur des patients contiennent des taux élevés de FGFb (Silverlight et coll., 1990 ; Paulus et coll., 1990). Takahshi et coll. (1990) ont montré que les ARNm des FGFa et b sont présents dans des astrocytomes, des glioblastomes et des oligodendrogliomes mais que les messagers du FGFa sont absents dans les méningiomes ; de plus, l'expression des messagers du FGFb augmente

avec le grade de malignité des gliomes. Ces résultats n'indiquent cependant pas que les FGFs sont impliqués dans la transformation car ils pourraient n'agir que sur la maintenance et la progression de ces tumeurs.

In vitro, il a été clairement montré qu'une culture secondaire d'astrocytes produit du FGFb (Ferrara et coll., 1988). Des lignées transformées dérivées du système nerveux telles que des neuroblastomes (Huang et coll., 1987), des gliomes (Libermann et coll., 1987 ; Morrison et coll., 1990) et des astrocytomes (Sato et coll., 1989), produisent du FGF.

La présence de sites de fixation spécifiques des FGFs a été détectés sur des préparations de membranes de cerveau adulte (Courty et coll., 1987 ; Ledoux et coll., 1989) et embryonnaire (Olwin et Hauschka, 1990; Hondermarck, 1990). En outre, les travaux récents concernant le clonage des récepteurs des FGFs montrent que les messagers spécifiant flg et bek sont exprimés dans les cerveaux embryonnaires et adultes. Par hybridation *in situ*, les ARNm de flg ont été détectés dans le cerveau embryonnaire et adulte dans l'ensemble du tissu nerveux mais plus particulièrement au niveaux de certains neurones (Heuer et coll., 1990 ; Wanaka et coll., 1990). La présence de sites de fixation spécifiques au FGFb a été décelée sur des neurones provenant de l'hippocampe (Walicke et coll., 1988) et sur les cellules PC12 (Sharma et Dahlia, 1988).

MATERIEL ET METHODES.

MATERIEL ET METHODES.

I) Matériel.

Les souris de souche SWISS proviennent d'un élevage réalisé au laboratoire. Les femelles sont élevées par groupe de 5 en présence d'un seul mâle. Les animaux disposent de nourriture et de boisson à volonté et sont soumis à un rythme jour/nuit artificiel de 16hr/8hr, l'accouplement ayant lieu pendant la période d'obscurité. Les cages sont inspectées chaque matin et les femelles porteuses d'un bouchon vaginal (signe indiquant qu'un accouplement récent s'est produit) sont rassemblées dans une même cage. Les femelles gravides sont remplacées. La présence du bouchon vaginal détermine le jour 0 de la gestation qui a une durée de 19 jours pour cette souche de souris.

Pour les stades embryonnaires (notés E), les femelles gestantes ont été sacrifiées aux 10, 12, 14, 16 et 18 ème jours, les cornes utérines prélevées et les embryons récoltés dans du PBS*¹ à 37 °C. Le cerveau entier est prélevé à l'aide de pinces fines dans la solution opératoire sous microscope binoculaire. Pour les stades post-nataux (notés P) les animaux sont décapités sans distinction de sexe à P0, P3, P5, P9, P11, P14, P18, P30, P60 et à l'age adulte (1 an). La tête est immédiatement disséquée et le cerveau entier prélevé. Les cerveaux ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation, ou fixés (voir immunohistochimie).

¹ Les solutions suivies d'une astérisque (*) ont leur composition détaillée dans l'annexe technique

II) Méthodes.

A) Préparation et purification des extraits de cerveaux.

Toute la verrerie utilisée ainsi que les embouts de pipette ont été préalablement traités au silicone (Sigmacoate, Sigma). Les cerveaux sont pesés, homogénéisés (+4°C) à l'aide d'un broyeur de Potter selon un rapport de 10 ml de tampon de broyage* (2 M NaCl) pour 1 g de tissus. La force ionique du tampon de broyage constitue une condition dissociante des complexes que forment les FGFs avec les matrices. L'homogénat est récupéré dans un tube à centrifuger, soniqué (30 sec, 50 Watts) et maintenu dans de la glace pendant une heure. Après centrifugation (Beckman J2-21, rotor JA-20, 48000 g, 30 mn, 4°C) le surnageant est dilué quatre fois avec le tampon de broyage* sans NaCl afin d'obtenir une concentration finale en NaCl de 0,5 M. L'extrait dilué est alors chargé sur une colonne (Econocolumn, BioRad) contenant 50 mg d'héparine-Sepharose (Pharmacia) gonflée (200 µl) et équilibrée par le tampon d'équilibration*. La colonne est ensuite lavée par 4 ml de ce même tampon et éluée séquentiellement en 1,15 et 2 M NaCl. Les fractions (5x1 ml pour chaque molarité) sont récoltées dans des tubes Eppendorf et stockées à -80°C (pendant une durée inférieure à 1 mois) en vue de leur dosage en EIA. L'héparine-Sepharose est régénérée dans de l'urée 6 M et stockée à +4°C dans du tampon NaCl 3 M pour utilisation ultérieure (3 réutilisations). Un aliquot de l'extrait brut a été conservé pour la détermination de la concentration protéique selon la méthode de Bradford (Kit BioRad), en utilisant l'albumine sérique bovine (ASB) (Sigma, fraction V) comme standard.

Pour la caractérisation du FGFa du cerveau de souris, nous avons utilisé et traité comme précédemment 10 cerveaux de stade P18. L'extrait

dilué a été chargé selon un flux continu de 1 ml par mn sur une colonne de 5 ml d'héparine-Sepharose équilibrée. Puis la colonne a été couplée au système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Pharmacia et lavée par du tampon d'équilibration (1 ml/mn) jusqu'à ce que l'absorbance U.V. à 280 nm atteigne la ligne de base. La colonne a été ensuite éluée selon un gradient continu de 0,5-1,5 M NaCl (volume total de 120 ml, 1 ml/mn). Les fractions de 2 ml ont été récoltées et testées le jour même.

B) Mesure de l'activité biologique.

1) Culture cellulaire

Nous avons utilisé la lignée de cellules fibroblastiques CCL39 (ATCC, fibroblastes de poumons de hamster chinois). Ces cellules sont entretenues dans du milieu MEM sels de Earle (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Anval), 0,05 % de pénicilline, 0,05 % de streptomycine et 0,05 % de fungizone. Les cultures sont incubées à 37 °C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂. Le repiquage des cellules s'effectuent deux fois par semaine à raison de 80.000 cellules par ml.

2) Mesure de l'incorporation de thymidine.

Selon la méthode décrite par Plouët et coll. (1984), les cellules sontensemencées dans des plaques de 24 puits (Nunc) à raison de 40.000 cellules dans 0,5 ml de milieu de culture par puits. Lorsque les cellules atteignent la subconfluence (généralement après 72 hr), le milieu de culture est ôté et les cellules lavées par une solution de PBS* stérile puis incubées pendant 24 hr dans un milieu de culture dépourvu de sérum. Chaque fraction est testée en triple à raison de 15 µl par puits en présence

(20 $\mu\text{g/ml}$) ou en absence d'héparine (Sigma). Après 20 hr, $3,7 \cdot 10^4$ Bq de thymidine tritiée (activité spécifique : $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq/mmol, CEA) diluée dans 5 μl de milieu de culture sans SVF, sont ajoutés dans chaque puits. Après 4 hr d'incubation, le milieu radioactif est aspiré et les puits lavés avec du PBS ; le tapis cellulaire est fixé pendant 30 mn par 0,5 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (ATCA) à 5% et lavé à l'eau courante. Les cellules sont ensuite lysées dans 0,5 ml d'une solution de soude 0,3 N (30 mn, 37°C). Le lysat est placé dans une fiole à scintillation en présence de 3 ml de liquide scintillant (Ready Safe, Beckman). La radioactivité est mesurée par un compteur Beta (LKB, Wallac).

C) Mesure des niveaux de FGFa.

Les niveaux de FGFa (concentration de FGFa dans les extraits purifiés) ont été mesurés par un dosage de type "enzymo immunoassay" (EIA) en phase solide (Caruelle et coll., 1988). Le principe de ce dosage est basé sur une compétition entre un traceur : FGFa couplé à l'acétylcholinesterase (AChE) par l'intermédiaire d'un agent pontant bifonctionnel (le N-succinimidyl-4-(N-moliidométhyl)-cyclohexane 1-carboxylate) et le FGFa à doser, au niveau des sites de reconnaissance d'un anticorps polyclonal spécifique de la forme acide du FGF. La séparation entre le traceur lié et libre est obtenue grâce à un deuxième anticorps monoclonal de souris anti IgG de lapin (fig. 4). L'anticorps monoclonal de souris anti IgG de lapin est adsorbé sur la paroi des puits des plaques de microtitration de 96 puits qui sont ensuite saturées par de l'ASB à 1 %. Les plaques sont ensuite lavées par du tampon de lavage* et remplies par 300 μl de tampon EIA* pour être stockées à $+4^\circ\text{C}$ jusqu'à emploi. Les plaques sont ensuite vidées et les puits reçoivent:

-50 μl de la solution à doser ;

-50 μ l de traceur correspondant à 1 unité Ellman/ml (1 unité Ellman est définie comme étant la quantité d'enzyme produisant une augmentation de 1 unité de D.O. pendant 1 mn dans 1 ml de solution pour une cellule de mesure de 1 cm) ;

-50 μ l de sérum anti-FGFa dilué au 1/2000.

Une gamme de dilution de FGFa standard est réalisée par des dilutions par entraînement au 1/2 (plus haut point de gamme : 8 ou 10 ng/ml). Des puits sont aussi réservés pour le témoin de fixation du traceur en l'absence d'anticorps (bruit de fond) et pour le témoin de fixation du traceur en l'absence de compétiteur (Bo). Après une nuit à 20 °C, les plaques sont lavées et 250 μ l de réactif d'Ellman sont ajoutés. La réaction enzymatique est développée pendant environ 1 hr à 20 °C à l'abri de la lumière. L'intensité de la réaction colorimétrique est alors mesurée sur lecteur de plaques Dynatec MR600. Les résultats sont exprimés en B/Bo x 100 où B représente la D.O. obtenue après compétition entre le traceur et le FGFa à doser. Toutes les mesures sont effectuées en double.

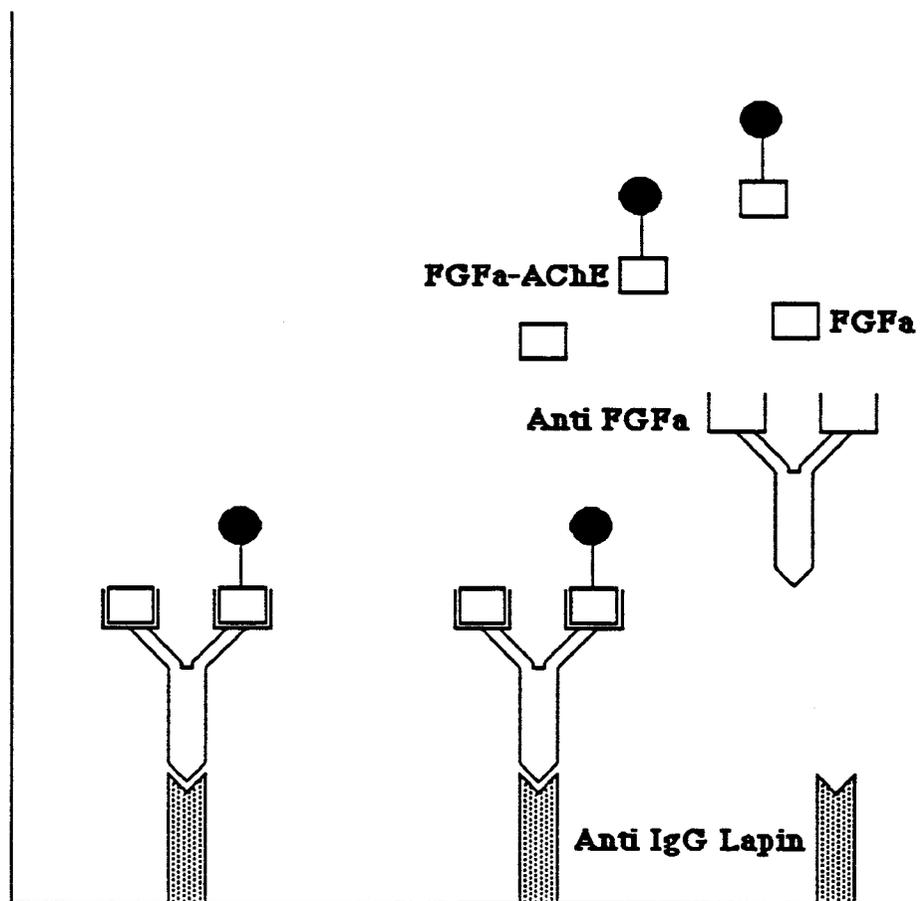


Figure 4: Schéma résumant le principe du dosage EIA par compétition en phase solide.

D) Détection du FGFa

Celle ci a été réalisée par "Western blot" et par immunohistochimie.

1) "Western blot".

Les fractions actives biologiquement et immunoréactives en EIA ont été rassemblées et les protéines précipitées par 5% d'ATCA. De l'ASB est préalablement ajoutée à une concentration finale de 0,1% afin de servir de molécule entraîneuse lors de la précipitation. Après une incubation d'une heure à +4°C, le précipité est récupéré par filtration à

travers un filtre de fibres de verre qui est ensuite lavé à l'eau puis à l'éthanol et séché. Le filtre a été ensuite placé dans 200 μ l de tampon d'échantillon* et les protéines resolubilisées et dénaturées par ébullition en présence de β mercaptoéthanol. Du FGF acide de cerveau de bœuf, purifié selon la méthode de Courty et coll. (1987) et aimablement fourni par D. Barritault (Paris XII), ont été traités dans les mêmes conditions pour une utilisation témoin. 10 μ l de chaque échantillon ainsi que des témoins de poids moléculaire (low molecular weight, Pharmacia) sont soumis à une électrophorèse sur minigel (système OSI) de 15% d'acrylamide en présence de SDS. Après migration (100 Volts/20 mA), le gel d'acrylamide est équilibré pendant 30 mn dans le tampon de transfert*. Un "sandwich" composé dans l'ordre d'un "scotchbrite", d'une feuille de papier What man 3MM, du gel, d'une feuille de membrane Immobilon P (Millipore), d'une seconde feuille de papier What man et d'un second "scotchbrite" est réalisé. L'ensemble est placé dans une cuve contenant le tampon de transfert*. Après un transfert de 5 hr (45 Volts/250 mA) la membrane de transfert est placée dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6 et colorée rapidement par une solution d'amido black afin de repérer les témoins de poids moléculaire.

La membrane d'immobilon est dans un premier temps saturée par une solution de tampon Tris 0,15 M NaCl (TBS) contenant 5 % d'hémoglobine bovine et 0,05 % de Tween 20 pendant 2 hr à température ambiante et sous agitation. Elle est ensuite incubée une nuit à +4°C sous agitation avec l'anticorps polyclonal anti FGFa de cerveau de bœuf (Caruelle et coll., 1988) dilué au 1/200 dans du TBS Tween à 1 % d'hémoglobine bovine. Après 3 lavages par du TBS Tween la membrane est incubée dans le même tampon en présence de [¹²⁵I] protéine A (Dupont De Nemours) pendant 1 hr à température ambiante puis relavée 3 fois en TBS 0,1 % Tween 20. La membrane d'immobilon est

autoradiographiée à -70°C à l'aide d'un film Kodak X OMat K (12 hr d'exposition) entre 2 écrans intensificateurs Cronex (DDN).

2) Immunohistochimie

a) Préparation du matériel biologique.

Les souriceaux sont sacrifiés par décapitation, leur cerveau prélevé et fixé pendant 24 hr à +4 °C dans du paraformaldéhyde (Merck) à 2% dans du PBS* pH 7,4 et rincé pendant 4 hr dans du PBS. Les cerveaux sont ensuite inclus dans la paraffine ou dans du cryogel (Reichert-Jung) et congelés dans du méthyle 2 butane refroidi par de l'azote liquide. Les pièces sont alors fixées sur une platine porte objet et débitées en coupes de 7 µm pour les coupes à paraffine ou de 12 µm pour les coupes à congélation à l'aide d'un microtome réfrigéré à -20 °C (Reichert-Jung). Les coupes sont récoltées sur des lames de verre gélatinées et numérotées.

b) Immunodétection.

Les lames portant les coupes sont suivant le cas déparaffinées, réhydratées ou directement placées 15 mn en tampon phosphate 10 mM pH 7,4 0,4 M NaCl (PBS). Puis les peroxydases endogènes sont inactivées en incubant les coupes dans du PBS contenant 30 % de méthanol et 0,05 % d'eau oxygénée à 30 %. Après un lavage, les coupes sont saturées pendant 30 mn en PBS, 10 % de sérum de chèvre, 0,1% de ASB, 0,05% Tween 20 et incubées 2 hr avec un sérum de lapin anti-FGF acide de bœuf (Caruelle et coll., 1989) dilué au 1/100 en PBS, 5 % de sérum de chèvre, 0,1 % ASB, 0,05% Tween 20. Après 3 lavages de 10 mn en TBS, les coupes sont incubées avec un anticorps de chèvre anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Pasteur) dilué au 1/200. La révélation du complexe premier anticorps/deuxième anticorps est assurée en incubant les coupes dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8,0 contenant 0,05 % de

diaminobenzidine (Sigma) et 0,05 % d'eau oxygénée. La coloration est suivie au microscope et arrêtée par lavage des coupes dans du TBS. Les lames sont ensuite déshydrater dans des bains d'alcool de degré croissant, recouvertes d'une résine histologique puis d'une lamelle et observées. L'immunodétection a été également réalisée à l'aide d'un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine (Pasteur). Dans ce cas, l'étape d'inactivation des peroxydases endogènes est omise, et un dernier lavage des coupes par une solution de bleu Evans dilué au 1/1000 dans le tampon Tris est effectué pour atténuer l'autofluorescence du tissu nerveux.

E) Détection des ARN messagers spécifiant le FGFa.

Les ARNm spécifiant le FGFa ont été détectés grâce à une sonde ARN élaborée à partir d'un fragment d'ADN de 250 bp codant pour la partie 1-41 du FGFa (Abraham et coll., 1986) et aimablement fournie par J. Abraham.

1) Purification des ARN poly A.

Les ARN totaux ont été préparés selon la technique de Chirgwin et coll. (1979). Les cerveaux congelés ont été dans un premier temps pulvérisés dans un mortier contenant de l'azote liquide puis plongés dans un tube conique stérile de 50 ml contenant du tampon guanidinium*. Le mélange est homogénéisé 3 fois 15 sec par broyage à l'aide d'un Polytron. A ce stade, l'homogénat a été conservé à -70°C ou traité de suite selon le protocole suivant.

L'homogénat est délicatement déposé sur un coussin de chlorure de césium* dans des tubes d'ultracentrifugation pour rotor SW 41 (Beckman) préalablement rincés par du tampon guanidinium et séchés. Après centrifugation (Rotor SW41, 125.000g, 18 hr, 18°C) le culot

d'ARN est rincé par de l'éthanol 70 %, séché à température ambiante puis repris dans 300 µl d'eau préalablement traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma) et autoclavée. Les ARN sont ensuite placés dans un tube Eppendorf et précipités en présence de 30 µl d'acétate de sodium (AcONa) 2 M pH 7,5 et de 2 volumes d'éthanol. Les ARN précipités sont conservés à -70°C.

Les ARN précipités sont centrifugés, le culot séché et resuspendu dans de l'eau DEPC. La concentration en acides nucléiques est évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm, une unité de D.O. correspondant à une concentration de 40 µg/ml d'ARN. Les ARN poly A ont été purifiés en utilisant le "kit" de purification des ARNm de Pharmacia conformément aux instructions du fabricant. La figure 5 résume le protocole de purification. 500 µg d'ARN totaux sont traités à la fois. Le matériel retenu sur la colonne d'oligo dT-cellulose est élué à faible force ionique par 1 ml de TE* 0 M NaCl à +65 °C et précipité par ajout de 100 µl d'AcONa 2 M et 2 volumes d'éthanol. Après un nuit à -80 °C, le précipité est récupéré par centrifugation. A cette étape, les ARN peuvent être stockés à -80 °C.

2) Electrophorèse et transfert des ARN ("Northern blot").

5 ou 10 µg d'ARN purifiés sur colonne d'oligo dT sont repris par 50 µl de tampon de dénaturation*, chauffés 5 mn à +65 °C et placés immédiatement dans de la glace. 5 µl de bleu de charge* et 1 µl bromure d'éthidium (BET, 10 mg/ml) sont ajoutés. Les ARN sont séparés électrophorétiquement sur un gel d'agarose (1,2 %) dénaturant* (2,2 M formaldéhyde). La migration s'effectue pendant une nuit à 20 Volts constants en tampon MOPS* une fois concentré (1x).

Après migration des ARN, le gel d'agarose est abondamment rincé à l'eau de qualité Milli Q. Les ARN sont transférés par du tampon SSC*

(standard sodium citrate) 20x sur une membrane Hybond-C-Extra (Amersham) (fig. 6). Le transfert s'effectue pendant 16 hr puis les ARN sont fixés à la membrane par un étuvage de 2 hr à +80 °C. La membrane est ensuite photographiée sous U.V. (312 nm) afin de repérer les ARN ribosomaux 28S et 18S et de vérifier si la même quantité d'ARN a été transférée pour chaque stade. La membrane peut être stockée à température ambiante jusqu'à son utilisation.

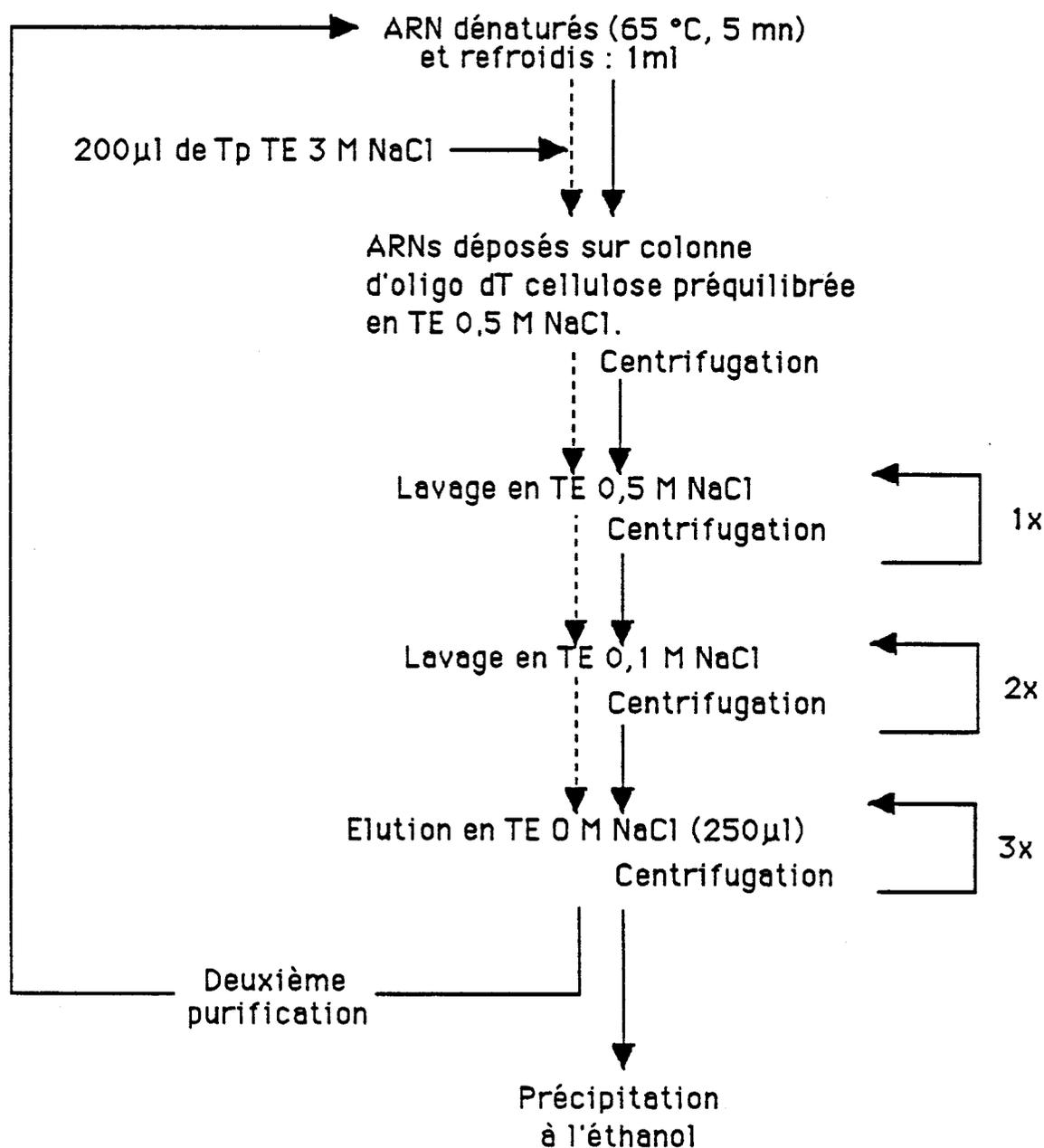


Figure 5 : Protocole de purification des ARN poly A. (selon protocole Pharmacia). TE* = Tampon Tris/EDTA

3) Hybridation des sondes ARN sur "Northern blot".

La membrane sur laquelle les ARN sont fixés est préhybridée dans le tampon de préhybridation* pendant au moins 4 hr à +60 °C (protocole Amersham). Puis, à la solution de préhybridation est ajoutée la sonde marquée au ^{32}P à raison de 3 à $5 \cdot 10^6$ cpm par ml. L'hybridation s'effectue pendant une nuit à 60 °C. La membrane est ensuite lavée à température ambiante 2 fois 15 mn dans du tampon SSC* 2x et 2 fois 15 mn dans du tampon SSC 0,1x 0,1 % SDS à 50 °C. La membrane est alors autoradiographiée entre deux écrans intensificateurs à -70 °C (film Kodak X Omat S, révélateur Kodak LX 24, fixateur Kodak AL 4). Cette première autoradiographie présente généralement un marquage important aux niveau des ARN ribosomiaux. Ce marquage peut être éliminer par traitement à la RNase A. Dans ce but la membrane est prééquilibrée par du SSC 2x puis incubée à température ambiante pendant 15 mn dans du SSC 2x contenant 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase A (Sigma) préalablement bouillie ; la RNase est ensuite éliminée par un lavage en SSC 2x et en SSC 0,1x 0,1 % SDS à 50 °C ; la membrane est alors à nouveau autoradiographiée.

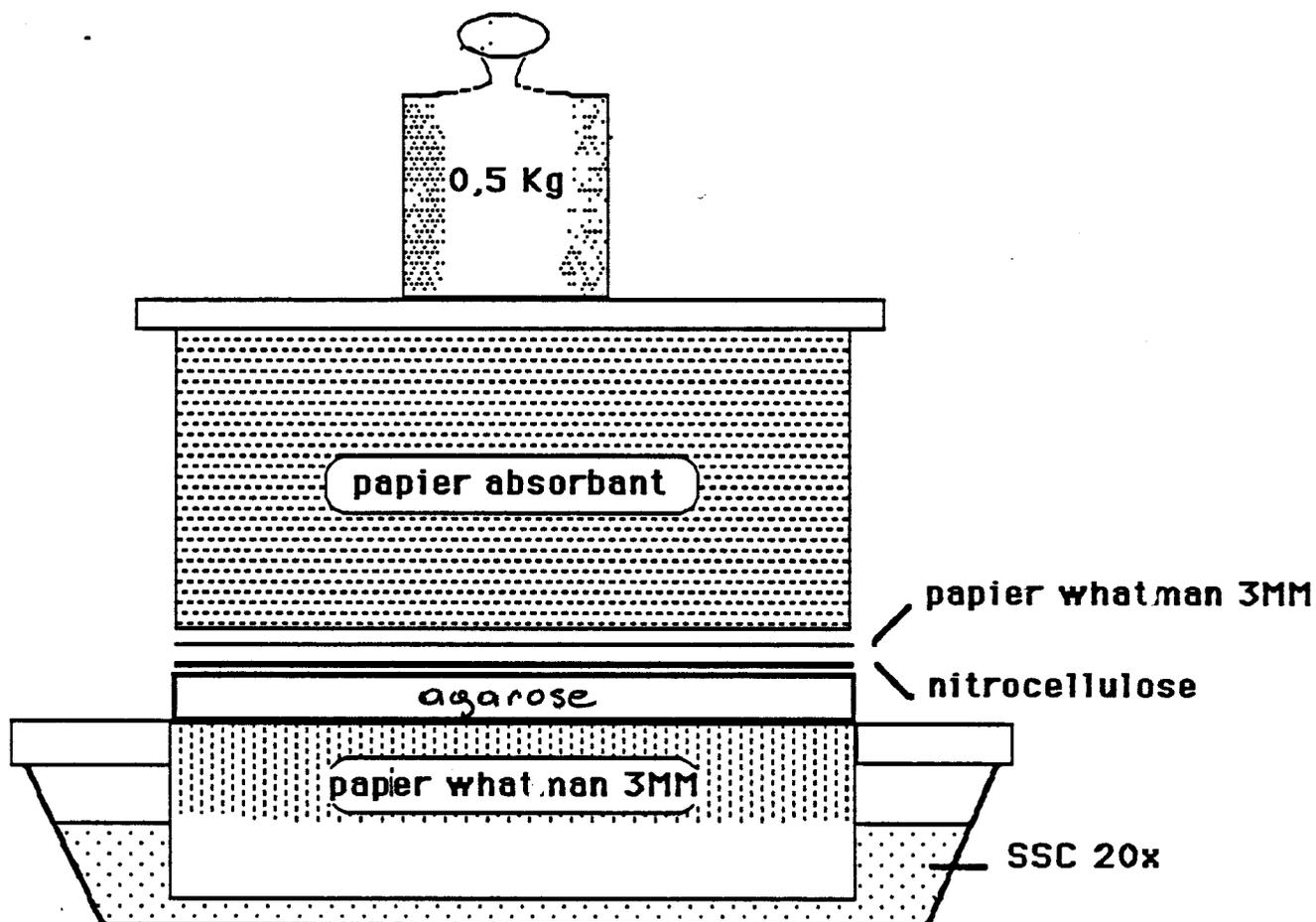


Schéma du transfert d'ARN (Northern blot)

Figure 6: Schéma du montage réalisé pour le transfert salin des ARN selon la méthode du "Northern blot".

4) Préparation des sondes ARN.

Initialement nous disposons d'un fragment d'ADN de 250 bp codant pour la séquence 1-41 du FGFa de cerveau de bœuf (Abraham et al., 1986a) inséré au niveau des sites BamHI et EcoRI du polylinker M13mp18 du plasmide pcBI-100 de la souche d'*E. coli* MC1061.

Amplification des plasmides.

Les bactéries sont cultivées dans 1 litre de milieu LB*, à 37°C et sous agitation constante. Lorsque la D.O. du milieu de culture à 600 nm

atteint 0,9, 1 ml de chloramphénicol (Boehringer) (150mg/ml) est ajouté au milieu de culture et l'incubation est poursuivie pendant une nuit. Le milieu de culture est alors centrifugé (Rotor GSA, 4000 rpm, 10 mn). La préparation des plasmides est réalisée selon la méthode de Ish-Horowicz modifiée. Le culot bactérien est repris par 18 ml de tampon GTE* et la lyse des cellules est obtenue en ajoutant 40 ml de NaOH 0,2 N/SDS 1 % fraîchement préparé et en agitant rapidement sur de la glace pendant 5 mn. La soude est ensuite neutralisée par 20 ml de tampon KAc*. Un précipité blanc constitué de protéines et de débris cellulaires se forme. Après 15 mn, le précipité est éliminé par centrifugation (8000 rpm, 5 mn) et filtration du surnageant à travers de la laine de verre. Les acides nucléiques sont précipités par ajout de 0,6 volume d'isopropanol. Le surnageant est éliminé 10 mn plus tard par une nouvelle centrifugation (8000 rpm, 5 mn) et l'isopropanol évaporé sous vide. Le culot est repris dans 7 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM auquel sont ajoutés 10 g de chlorure de césium ainsi que 2 gouttes de BET. Le mélange est réparti ensuite dans des tubes à sceller de 5 ml (Beckman) pour centrifugation verticale (Rotor VTI 65, 50000 rpm, 17 hr, 20°C). L'ADN plasmidique est alors séparé de l'ADN bactérien et des ARN et il est collecté à l'aide d'une seringue piquée à travers le tube à centrifuger. La solution contenant les plasmides est transférée dans un tube à hémolyse et le BET extrait par du butanol saturé en eau. Les plasmides sont ensuite précipités en ajoutant du tampon STE* q.s.p. 4 ml, 400 µl d'AcONa et 10 ml d'éthanol. Après au moins 2 hr à -20°C, les plasmides sont centrifugés, le culot séché et repris dans 200 µl d'eau pure. La qualité de la préparation est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 % en tampon borate.

500 µg de plasmides sont digérés (1 nuit à 37°C) par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI (Boehringer) en présence du tampon de

digestion B (Boehringer) dans un volume réactionnel de 500 μ l. Après ajout de bleu de charge et de 2 μ l de BET, les plasmides digérés sont déposés sur un gel d'agarose (2 %) préparatif (tampon TEA*, 40 Volts constants). La migration est examinée par illumination du gel aux U.V.. Lorsque la bande correspondant aux fragments de 250 bp est suffisamment séparée du plasmide, une fenêtre est découpée dans le gel et un gel d'agarose 0,3 % y est coulé. Les inserts sont récupérés en les faisant migrer dans la fenêtre. Le gel d'agarose 0,3 % contenant les inserts est recueilli ensuite dans un tube à hémolyse et soumis à trois cycles de congélation/décongélation. L'agarose ainsi "liquéfiée" peut libérer les inserts qui sont récupérés par filtration à travers de la laine de verre et d'un filtre 0,45 μ m.(Millex, Millipore) Ils sont ensuite concentrés par précipitation à l'isopropanol, repris dans de l'eau pure et stockés à +4°C.

Insertion du fragment dans les plasmides pSP64/65.

Les plasmides pSP64 et pSP65 (Promega Biotec), dont la structure est rappelée dans la figure 7, ont été linéarisés par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI (Boehringer) afin de générer des sites de liaisons compatibles à ceux du fragment à insérer. Le fragment d'ADN (environ 100 ng est mis en présence du plasmide pSP64 ou 65 ; environ 40 ng) et l'ADN ligase T4 (Boehringer) à raison de 0,05 U par μ g d'ADN. La réaction de ligation s'effectue dans un volume réactionnel d'environ 50 μ l pendant une nuit à température ambiante dans le tampon de ligation*. Ensuite, la solution est chauffée à 65 °C pendant 5 mn afin de détruire la ligase. La réaction de ligation est contrôlée en faisant migrer un aliquot sur un gel d'agarose avec le mélange fragment/plasmide comme témoin.

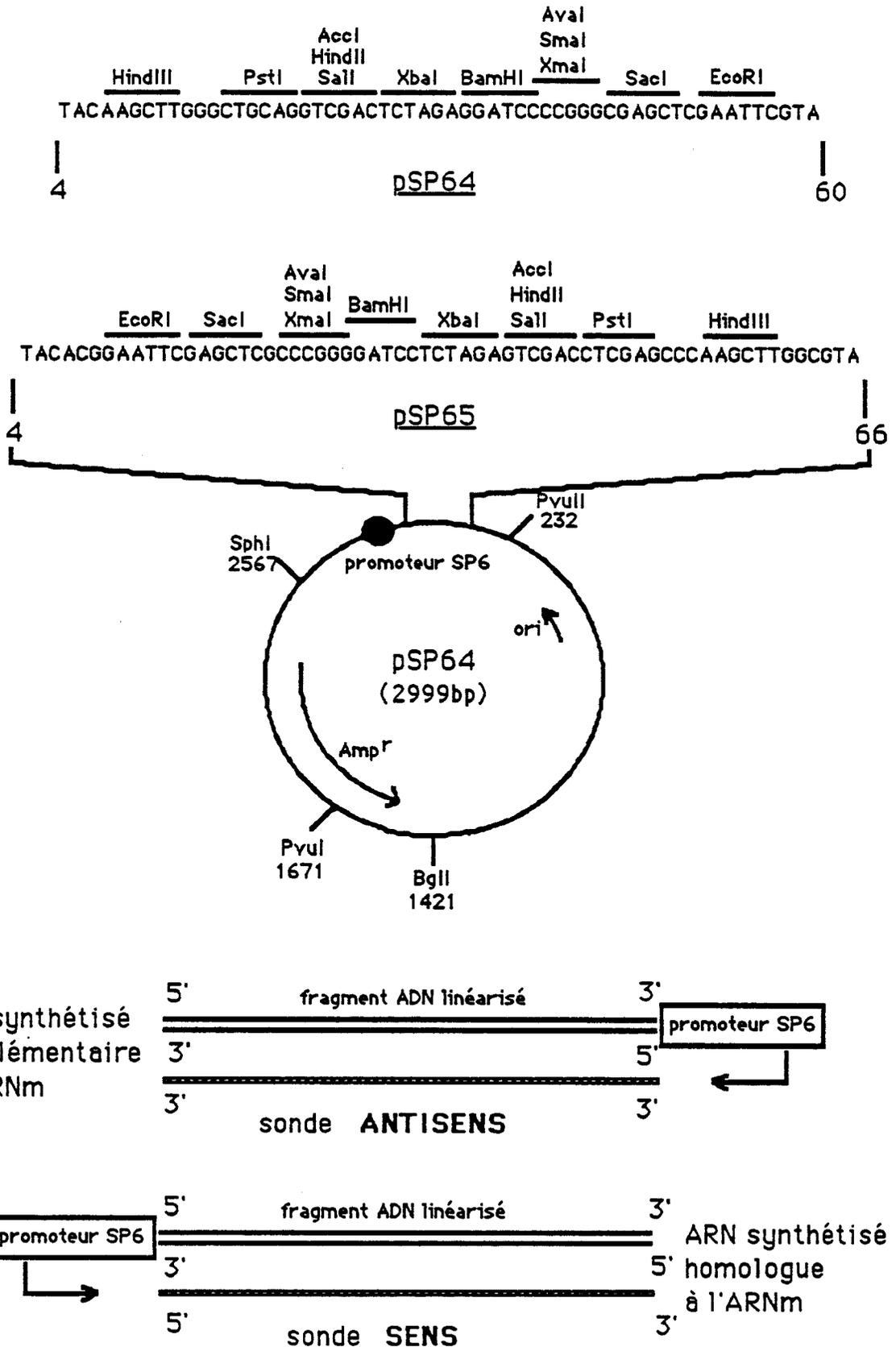


Figure 7: Structure des plasmides pSP64 et 65 et de leur "polylinker" permettant une insertion directionnelle des fragment d'ADN. Dans la partie inférieure de la figure sont indiqués les types d'ARN obtenus suivant le sens de la transcription.

Transfection de la souche HB 101 par les produits de ligation.

La souche réceptrice doit être au préalable rendue compétente. La souche HB101 estensemencée dans 10 ml de milieu LB. Lorsque la D.O. à 600 nm atteint 0,9, la culture est arrêtée, les bactéries centrifugées et le culot bactérien placé dans la glace pour être lavé dans un tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4 , MgCl₂ 10 mM puis soumis à un nouveau cycle de centrifugation. Un second lavage est réalisé dans du tampon FTB* et les bactéries à nouveau centrifugées. Elles sont alors perméabilisées 15 mn dans 6 ml de tampon FTB. Après une dernière centrifugation, les bactéries sont reprises dans 300 µl de FTB auxquels on ajoute 10 µl de β-mercaptoéthanol 2,25 M et 10 µl de DMSO. Les bactéries sont alors compétentes pour la transfection. Celle ci est réalisée en prenant 150 µl de suspension bactériens auxquels sont ajoutés 1µg de plasmides (dans 100 µl de STE*). Les bactéries sont placées à 37 °C pendant 1 mn puis incubées dans la glace pendant 30 mn. Le choc thermique est répété une seconde fois puis 1,5 ml de milieu LB est ajouté. Après agitation à 37°C pendant 1 hr, les bactéries ayant intégré le plasmide sont sélectionnées par étalement sur un milieu gélosé contenant 100 µg/ml de carbéniciline, antibiotique dont le gène de résistance est porté dans le plasmide.

Recherche de la colonie contenant le recombinant.

Un filtre de nitrocellulose est déposé pendant 1 mn sur les boites de Petri où apparaissent des colonies. Des repères sont effectués afin de faciliter le repiquage des colonies positives. Puis le filtre est déposé pendant 5 mn sur un papier Whattman imbibé de tampon de dénaturation* puis neutralisé pendant 10 mn par du tampon de neutralisation*. Le filtre est alors étuvé à 80 °C pendant 2 hr. La boite de Petri est remise en incubation à 37 °C. Après étuvage du filtre, on procède à sa préhybridation et son hybridation à l'aide de la sonde ADNc marquée au ³²P (voir technique "random priming"). Le filtre est autoradiographié,

les colonies positives repérées et repiquées sur un milieu gélosé afin de confirmer les résultats. Un clone positif peut alors être cultivé en masse en vue de la préparation de l'ADN plasmidique recombinant qu'il contient.

Synthèse des sondes ARN.

Les plasmides pSP64/65 recombinants ont été purifiés et sont linéarisés par digestion enzymatique à l'aide de l'enzyme de restriction PvuII (fig. 7) qui n'a qu'un seul site de reconnaissance. La linéarisation est vérifiée par migration d'un aliquot sur un gel d'agarose. Une solution stock à 2 µg/9 µl est réalisée et conservée à +4 °C jusqu'à utilisation.

Principe du système de transcription *in vitro*.

Les plasmides pSP64/65 possèdent en amont du polylinker le promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage SP6 de *Salmonella typhimurium*. (fig. 7) Cette ARN polymérase possède une spécificité stricte pour son promoteur. Un ADN étranger cloné dans le pSP64 et en direction opposée dans le pSP65 permet à l'ARN polymérase SP6 de synthétiser des ARNs antisens complémentaires aux ARNm et des ARN sens homologues aux ARNm incapables de s'hybrider à ceux-ci et qui serviront de contrôle de la spécificité d'hybridation. Ainsi, comme notre fragment d'ADN possède à son extrémité 5' le site BamHI et à son extrémité 3' le site EcoRI, son insertion dans le pSP64 permettra d'obtenir les sondes sens et les sondes antisens par le pSP65 (fig. 7).

Dans un tube Eppendorf sont ajoutés dans l'ordre et à température ambiante:

- 8 µl d'un mélange ACG (10 mM) ;
- 1 µl de RNasine (Promega Biotec). La RNasine est un puissant inhibiteur de RNase, elle est ajoutée à raison de 24 U/µl de volume réactionnel;
- 1 µl de tARN de Coli (5 mg/ml) ;

- 9 μ l d'ADN plasmidique linéarisé (2 μ g) ;
- 5 μ l d'UTP 32 P (Amersham) correspondant à $1,85 \cdot 10^6$ Bq (activité spécifique: 110 TBq/mmol) ;
- 1 μ l d'ARN polymérase SP6 (Promega Biotec) diluée au demi dans le tampon de transcription* et à raison de 0.5 U/ μ l de volume réactionnel.

La transcription est réalisée pendant 2 hr à 39 °C. Puis l'ADN plasmidique est détruit par digestion à la DNase RQ1 (Promega Biotec) en ajoutant 175 μ l de tampon de digestion et 5 μ l de DNase RQ1 et en incubant à 39 °C pendant 30 mn. Cette digestion est suivie d'une extraction par un mélange phénol/chloroforme* afin d'éliminer les traces de protéines de la solution ainsi qu'une partie des ribo et déoxyribonucléotides restés libres dans le mélange réactionnel. Le reste des ribonucléotides libres est éliminé par gel filtration sur une colonne de 2ml de Sephadex G 50 medium (Pharmacia) prééquilibrée en tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, 0,1 % SDS. 8 fractions d'environ 250 μ l sont récupérées et un aliquot de 1 μ l de chaque fraction est placé directement dans du liquide scintillant (Ready safe, Beckman) et compté au compteur β . Les fractions correspondant au pic d'élution sont rassemblées, et la longueur de la sonde vérifiée par migration d'un aliquot correspondant à 100.000 cpm sur un gel d'acrylamide* à 4 % qui est ensuite séché et autoradiographié. Le reste de la sonde est précipité par 2,5 volumes d'éthanol en présence de 4 μ l de tARN de Coli et 0,2 M final d'AcONa puis stocké à -70 °C.

F) Détection des ARNm spécifiant les récepteurs des FGFs.

Préparation des ARN messagers, transfert et hybridation.

La préparation des ARN totaux et messagers ainsi que leur séparation en gel d'agarose dénaturant, ont été effectués selon le protocole précédemment décrit. Le transfert des ARN (5 µg) a été réalisé sur membrane de nylon N+ (Amersham). Après le transfert, la fixation covalente des ARN sur leur support est assurée par un traitement alcalin de la membrane avec de la soude 0,05 N pendant 5 mn. La membrane est ensuite lavée en SSC 2x, photographiée sous U.V. et stockée à +4 °C jusqu'à son utilisation.

La membrane de transfert est préhybridée pendant 4 hr à +65 °C dans le tampon de préhybridation* (protocole Amersham). Puis la sonde ADNc marquée au ³²P est ajoutée à raison de 1 à 2·10⁶ cpm/ml de solution. Après une incubation d'une nuit à 65 °C, la membrane est lavée 2 fois 15 mn à température ambiante en tampon SSC 2x, 0,1% SDS puis 2 fois 15 mn en SSC 0,1x, 0,1 % SDS à +65 °C. La membrane est ensuite autoradiographiée entre des écrans intensificateurs à -70 °C et révélée comme précédemment décrit.

Afin de disposer d'un contrôle supplémentaire de la quantité d'ARN transférés, les membranes ont été déhybridées par un lavage dans une solution de SDS 0,1% bouillante et réhybridées avec une sonde ADNc codant pour la Glycéraldéhyde 3' phosphate deshydrogénase (GapdH), clonée dans le site PstI du vecteur pBR322 (Fort et coll., 1985) et que nous avons amplifiée et radiomarquée selon la technique random.

Préparation des sondes ADNc.

Les plasmides et les fragments d'ADN ont été amplifiés et préparés suivant un protocole analogue à celui décrit précédemment. Les inserts ont été obtenus par coupures au niveau des sites EcoRI et HindIII.

Marquage des sondes ADNc.

Le marquage des sondes ADNc a été réalisé suivant la technique dite du "random priming". Nous avons utilisé le kit de marquage Bœhringer et suivi le protocole du fabricant. Dans un tube Eppendorf placés dans la glace sont ajoutés dans l'ordre:

- 25 ng (soit 2 μ l) de fragment d'ADN préalablement dénaturé par chauffage à 95 °C pendant 10 mn ; cette étape est importante car elle consiste à rendre l'ADN simple brin ;
- 3 μ l d'un mélange de dATP, dGTP et dTTP (0,5 nmole par produit) ;
- 2 μ l d'un mélange d'héxanucléotides en solution dans le tampon de réaction concentré 10x ;
- 5 μ l de [³²P] dCTP (Amersham) correspondant à 1,85·10⁶ Bq ;
- 1 μ l de la solution contenant l'ADN polymérase de Klenow (2 unités par μ l).

Le volume réactionnel est ensuite ajusté à 20 μ l, la réaction (37°C, 30 mn) arrêtée par chauffage (65°C, 5 mn). Le principe de la réaction de marquage est résumé dans la figure 8

Purification des fragments d'ADN marqués.

Afin d'éliminer les précurseurs radioactifs non incorporés, l'échantillon est repris dans 300 μ l d'eau et déposé sur une colonne de Sephadex G-50 médium (Pharmacia) équilibrée en tampon TEN*. Des fractions d'environ 250 μ l sont récoltées et le pic de d'élution repéré par comptage d'un aliquot de 1 μ l au compteur β . Les fractions correspondantes sont ensuite réunies.

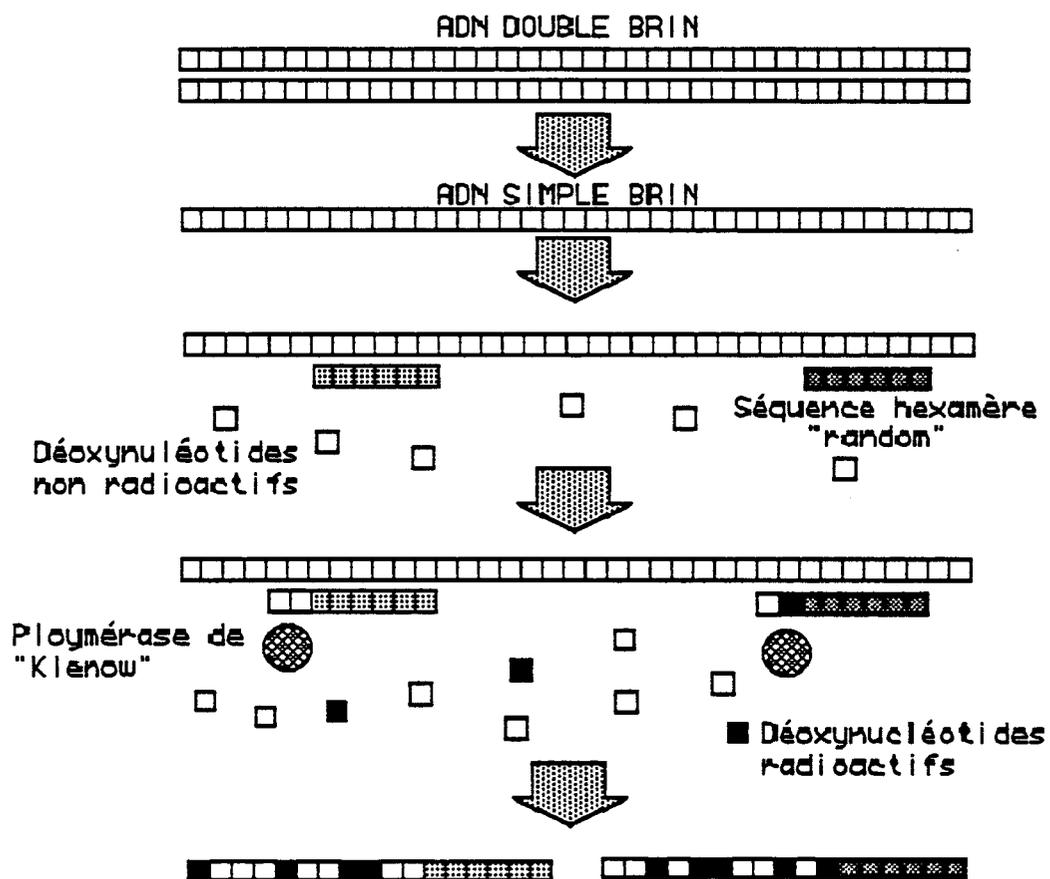


Figure 8: Principe du marquage des fragments d'ADN par la méthode "random".

CHAPITRE 1.

CHAPITRE 1

ETUDE DE LA REGULATION DU FGF ACIDE ET DE CES MESSAGERS DANS LE CERVEAU DE SOURIS AU COURS DU DEVELOPPEMENT.

I) Introduction.

Le cerveau subit une évolution particulièrement importante au cours du développement. Après une prolifération intense du neuroépithélium, les différentes catégories cellulaires tant neuronales que gliales se différencient. Parallèlement un réseau vasculaire très dense se met en place dans le tissu nerveux. Le FGFa, facteur abondant dans le SNC pourrait représenter un des facteurs contrôlant cette évolution compte tenu de son rôle mitogène, neurotrophique et angiogène (cf généralités).

Nous proposons dans ce premier chapitre d'aborder le problème du rôle de ce facteur au cours du développement en mesurant les niveaux de FGFa et de ses transcrits dans le cerveau de souris.

II) Résultats.

A) Evolution de la quantité de FGFa immunoréactif dans les extraits purifiés de cerveau de souris au cours du développement (E10, E12, E14, E16, E18, P0, P3, P5, P9, P11, P14, P18, P30, P60, adulte).

L'EIA que nous avons employé pour cette étude nous a permis de doser le FGFa avec un sensibilité de l'ordre de 1,5 à 2,7 ng/ml. La sensibilité du test est définie comme étant la valeur B/Bo égale à 50 %

(fig. 8). La limite de recevabilité du dosage ou limite de détection a été fixé pour une valeur de B/Bo égale à 80 %.

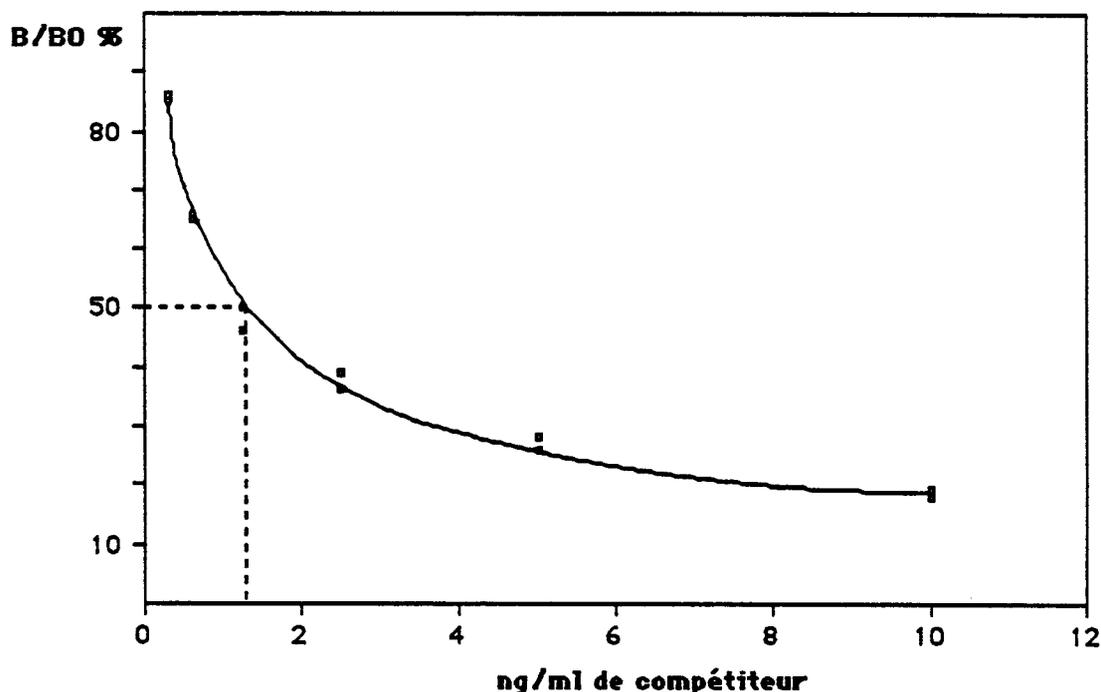


Figure 8: Courbe standard obtenue par l'EIA en utilisant une gamme de dilution de FGFa de cerveau de bœuf (plus haut point de gamme : 10 ng/ml). Sensibilité B/Bo = 50% : 1,6 ng/ml ; limite de détection : 0,5mg/ml.

Le nombre de cerveaux nécessaires aux dosages a été ajusté afin d'obtenir une même quantité de protéine totale pour chaque stade à l'exception de E10, E12 et E14 où la quantité de protéine extraite est plus faible : 200 cerveaux pour E10 ; 100 pour E12 ; 50 pour E14 ; 10 pour E16 et E18 ; 5 pour P0 et P3 ; 4 pour P5, P7, P9 et P11 ; 3 pour P14 et P18 ; 2 pour les stades plus âgés.

Nous avons dosé les 5 fractions issues de l'élution à 1,15 M. Les valeurs obtenues pour chaque fraction ont été additionnées et le total ramené par rapport à la quantité de protéines extraites. Les résultats obtenus (fig. 9) montrent que durant le développement embryonnaire (E10 à E18), la quantité de FGFa immunoréactif (FGFaIR) est constante

et se situe à environ 0,2 ng/mg. Ce niveau augmente après la naissance et atteint à P5 1,5 ng/mg. Un plateau est alors observé de P9 à P11. Entre P11 et P14 survient une augmentation rapide de la quantité de FGFa immunoréactif jusqu'à 5 ng/mg qui se stabilise jusqu'à P18. Ensuite nous avons observé une diminution de cette valeur à P30 et enregistré un niveau de 2,5 ng/mg dans le cerveau adulte.

B) Caractérisation du FGFa immunoréactif.

La caractérisation du (FGFaIR) a été réalisée à partir de cerveau P18 en raison de leur relative richesse en FGFa. Après une chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose de l'extrait brut préparé à partir de 10 cerveaux P18, la colonne a été éluée selon un gradient linéaire 0,5-1,5 M NaCl ; l'activité mitogène ainsi que le FGFaIR contenu dans les fractions de 2 ml ont été testées sur cellules CCL39 et en EIA (fig. 10). L'ensemble de ces résultats indiquent que l'activité biologique maximale (en présence d'héparine) et l'immunoréactivité maximale sont coéluees à 1 M NaCl. En l'absence d'héparine, l'activité mitogène des extraits est très faible (résultat non montré). L'ensemble des fractions immunoréactives et actives biologiquement ont été ensuite rassemblées et précipitées pour être analysées en Western blot à l'aide du même anticorps que celui utilisé pour l'EIA. Du FGFa de cerveau de bœuf a été utilisé comme témoin. L'autoradiogramme de cette immunodétection révélée par la protéine A ^{125}I (fig. 11) montre, au niveau de la piste correspondant au cerveau de souris, une bande majeure correspondant à une protéine immunoréactive d'environ 18.000 Da et une seconde moins intense d'environ 17.000 Da. Le témoin FGFa bovin se situant à 16.000 Da.

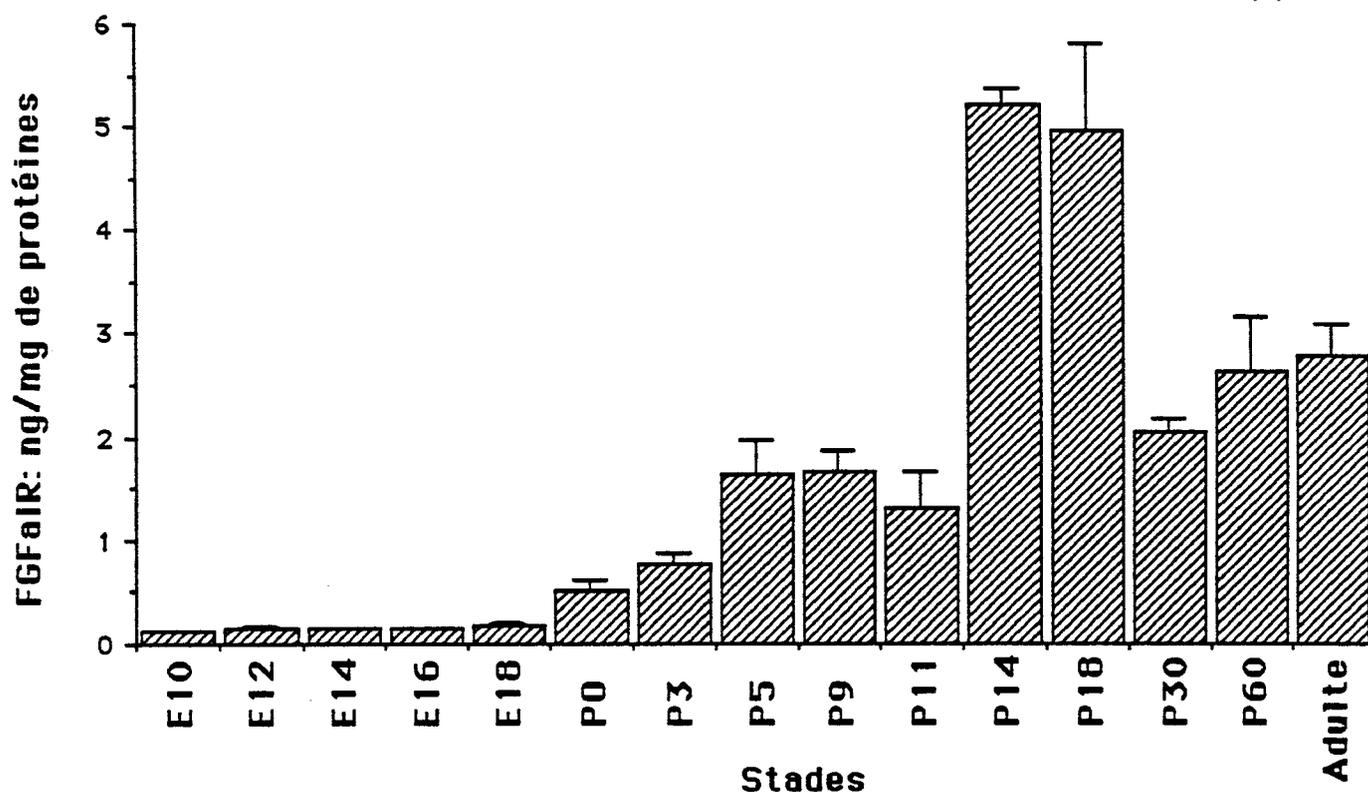
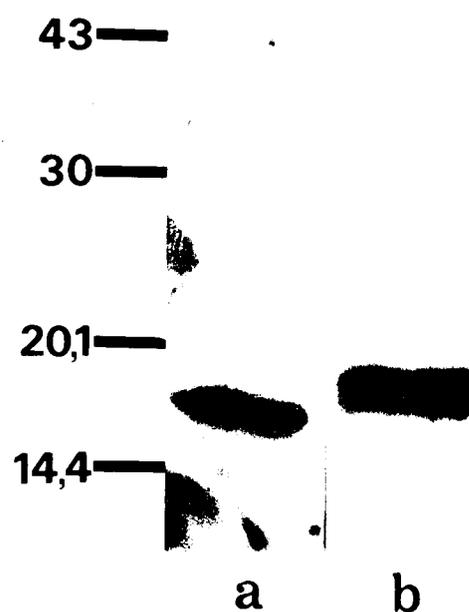


Figure 9 : Evolution du niveau de FGFaIR dans les cerveaux de souris au cours du développement. Les cinq fractions issues de l'élution à 1,15 M NaCl ont été dosées en EIA et les concentrations obtenues additionnées. Les résultats sont exprimés en ng équivalents FGFa par mg de protéines extraites et les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type de mesures répétées 3 fois sur une seule préparation pour les stades E10 à E14 et de mesures effectuées une seule fois sur trois préparations indépendantes pour les autres stades.

Figure 11: "Immunoblot" du FGFa de cerveau de souris. Les fractions actives biologiquement et immunoréactives ont été rassemblées, les protéines précipitées par de l'ATCA, séparées en PAGE/SDS puis transférées sur une membrane d'immobilon P. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps utilisé en EIA et les complexes immuns révélés par de la protéine A 125 I. A : FGFa de cerveau de bœuf ; B : FGFaIR de cerveau de souris. Le front de migration des témoins de poids moléculaire (low molecular weight, Pharmacia) est repéré.



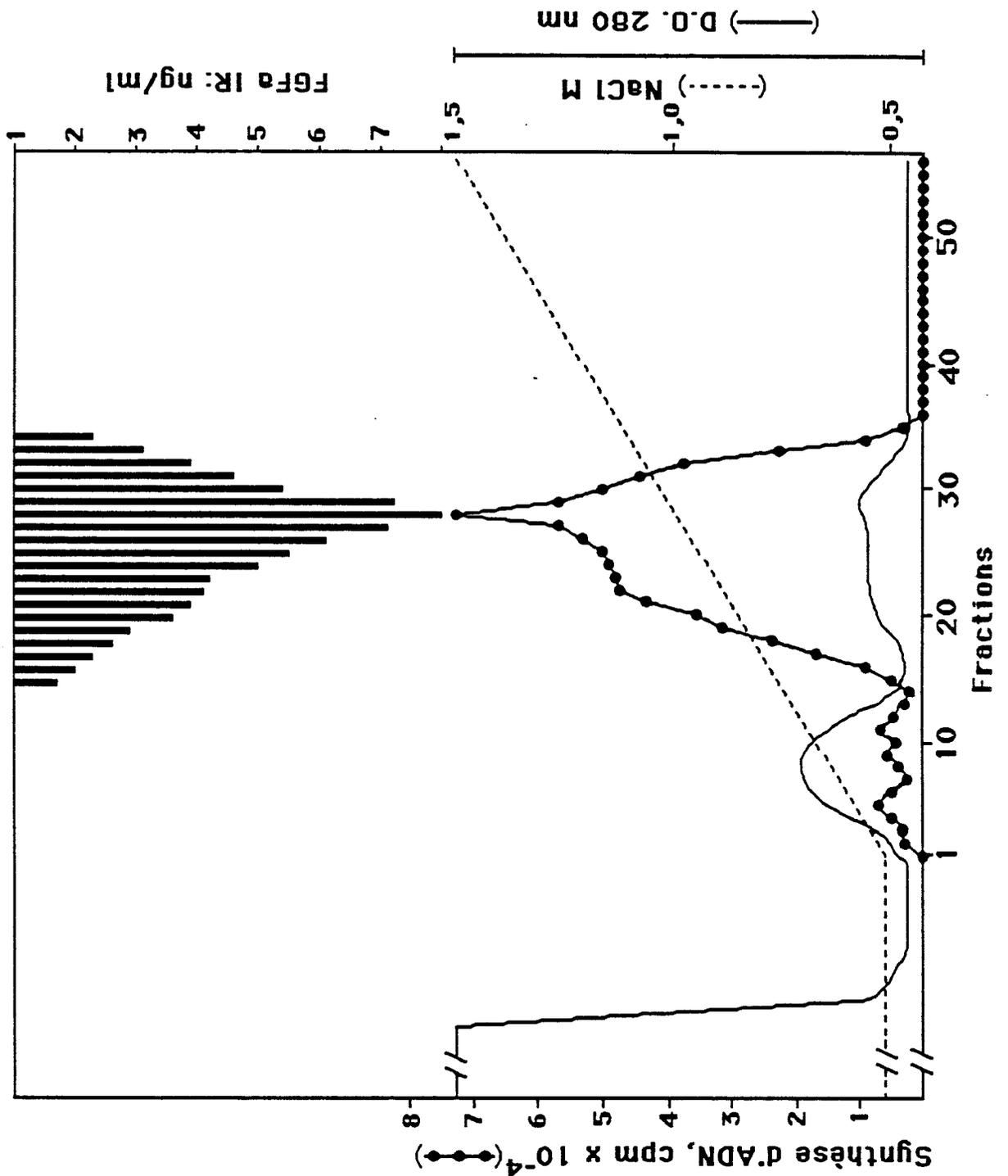


Figure 10 : Caractérisation du FGFR1 de cerveau de souris. Un extrait de 10 cerveaux de souris P18 a été chromatographié sur colonne d'héparine-Sepharose et le matériel retenu élué selon un gradient NaCl 0,5-1,5 M. par fractions de 2ml. Un aliquot de 15 μ l de chaque fraction a été ensuite testé en présence d'héparine pour son activité biologique sur des cellules CCL39. Un deuxième aliquot a été dilué au demi et le contenu en FGFR1 quantifié par EIA.

C) Evolution au cours du développement de la quantité de transcrits spécifiant le FGFa (Stades E14, P5, P11, P14, P18 et adulte).

Les FGFs bien que très abondants dans le système nerveux central présentent en réalité un très faible niveau de leurs transcrits (Abraham et coll., 1986a ; Jaye et coll., 1986). Pour cette raison il nous a semblé que l'utilisation de sondes ARN pouvait améliorer la sensibilité de détection de ces transcrits car il a été montré (Cox et coll., 1984) que les sondes ARNs présentent un bien meilleur rendement d'hybridation et s'hybrident avec une plus grande stabilité que les sondes ADN.

1) Caractérisation de la taille de la sonde.

Après purification de la sonde ARN par gel filtration sur Sephadex G-50, nous avons vérifié la taille de celle ci par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. L'autoradiogramme obtenu avec la sonde antisens (fig. 12) dans nos conditions expérimentales présente d'une bande correspondant à une taille d'environ 500 bp en accord avec la taille attendue c'est à dire celle correspondant à la transcription du fragment de 250 bp plus la partie du plasmide transcrite jusqu'au site de linéarisation en PvuII.

Figure 12 : Caractérisation de la taille de la sonde ARN antisens. Un aliquot de la sonde correspondant à 100.000 cpm a été soumis à une électrophorèse (240 V, 25 mA) sur un gel d'acrylamide 4% en tampon TBE. Après séchage, le gel a été autoradiographié 30 mn .



2) Evolution des quantités de messagers spécifiant le FGFa.

Les résultats de nos hybridations ont montré qu'un traitement à la RNase était nécessaire en raison du bruit de fond important particulièrement au niveau des ARNs ribosomiaux, comme le montre la figure 13A. La digestion par la RNase A assure l'élimination des ARN simple brin, ne laissant sur la membrane que les hybrides spécifiques double brin. Les hybridations par la sonde sens n'ont donné aucun signal. Sur la figure 13B est présenté un des autoradiogrammes obtenus. L'intensité du marquage a été quantifiée par analyse densitométrique des autoradiogrammes, les pics absorption intégrés et exprimés en pourcentage par rapport à la valeur maximum (fig. 14).

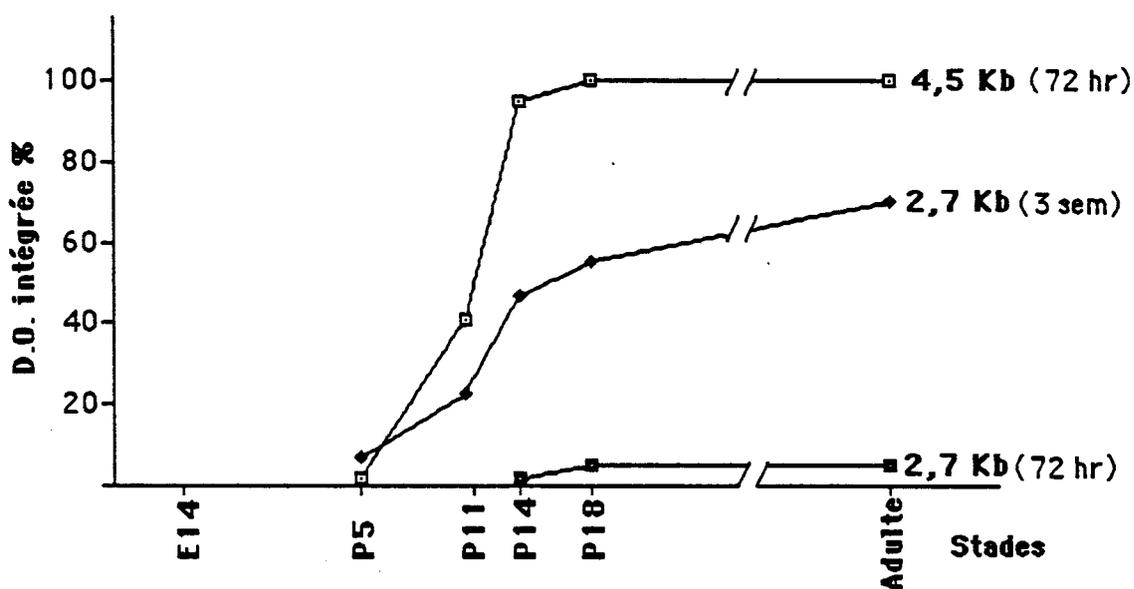


Figure 14 : Evolution des niveaux de transcrits spécifiant le FGFa : Les autoradiogrammes obtenus après 72 hr ou 3 semaines d'exposition sont quantifiés par intégration de la densité optique et les valeurs obtenues exprimées en % par rapport à la valeur maximale. Chaque point représente la moyenne des mesures effectuées pour 2 préparations d'ARN.

Nos résultats indiquent que la sonde antisens pour le FGFa s'hybride avec un transcrit de 4,5 Kb qui est détecté faiblement à P5 et de

FIGURE 13

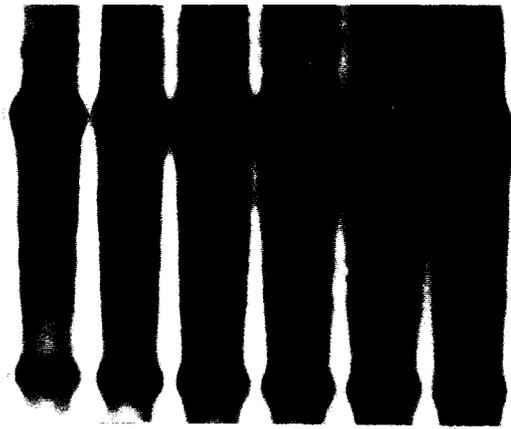
Expression des ARNm du FGFa et du FGFb dans le cerveau de souris au cours du développement.

Les ARN poly A (10 µg/piste) provenant de cerveaux de souris aux stades E14, P5, P11, P14, P18 et adulte, ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose (2,2 M formaldéhyde), transférés sur une membrane de nitrocellulose puis hybridés avec les sondes ARN antisens du FGFa et du FGFb. Les ARN ribosomiaux 28S et 18S sont repérés et permettent une évaluation de la quantité d'ARN transférée.

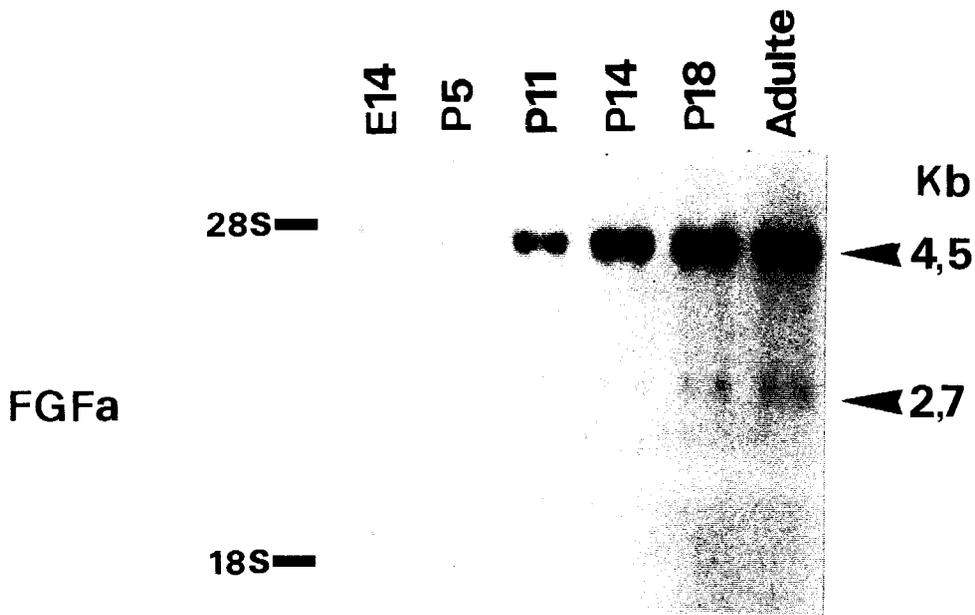
A : Autoradiogramme obtenu après hybridation avec la sonde ARN antisens du FGFb, et sans traitement à la RNase A. (exposition : 24 hr)

B : Autoradiogramme obtenu après hybridation avec la sonde ARN antisens du FGFa, suivie d'un traitement à la RNase A. (exposition : 72 hr)

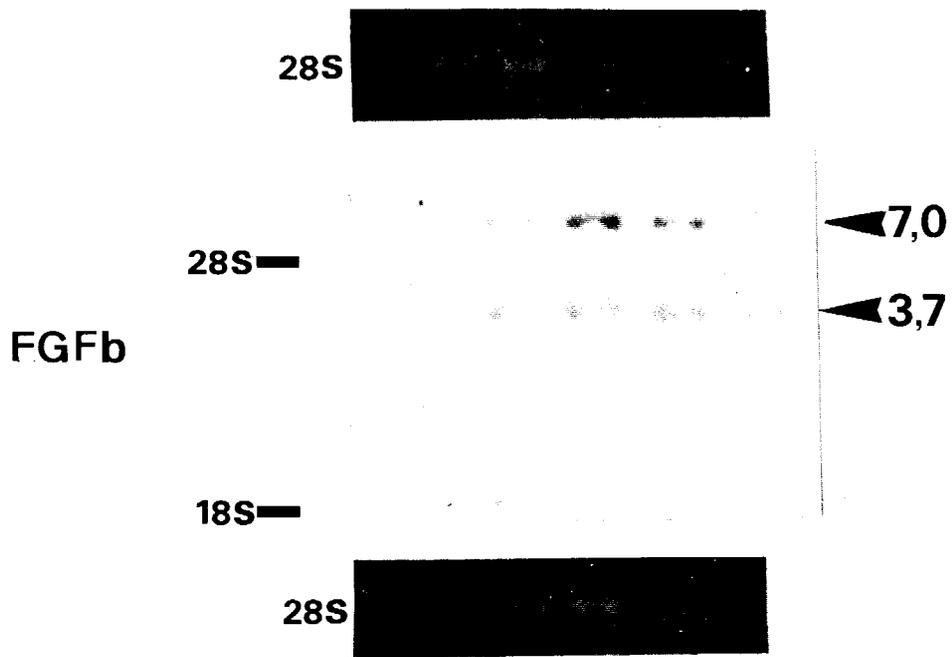
C : Autoradiogramme obtenu après hybridation avec la sonde ARN antisens du FGFb, suivie d'un traitement à la RNase A. (exposition : 3 semaines)



(a)



(b)



(c)

façon plus marquée à P11. Le signal augmente encore fortement à P14 où il semble atteindre un plateau de P18 au stade adulte. Un deuxième transcrit de 2,7 Kb a été faiblement détecté après 72 hr d'exposition (fig. 13B). Une exposition de 3 semaines nous a permis de constater qu'il évolue au cours du développement selon un profil analogue à celui du messenger de 4,5 Kb (fig. 14). Cette exposition prolongée fait apparaître 2 transcrits supplémentaires de 3,1 et 3,5 Kb pour le cerveau adulte seulement (résultats non montrés).

Nous avons pu également disposer d'une sonde ADNc de 1,4 Kb codant pour le FGFb (Abraham et coll., 1986a), qui nous a permis de préparer parallèlement une sonde ARN pour ce facteur selon le procédé précédemment décrit. Les résultats obtenus montrent que les messagers codant pour le FGFb sont exprimés à un faible niveau puisqu'une exposition de 3 semaines a été nécessaire pour obtenir l'autoradiogramme de la figure 13C. Il révèle la présence de deux transcrits de 7 et 3,7 Kb. Le plus long est présent à un très faible niveau à E14 et son niveau augmente jusqu'à P14. Celui ci diminue ensuite à P18 et dans le cerveau adulte pour atteindre un niveau équivalent à celui enregistré pour P11. Le transcrit de 3,7 Kb est présent lui aussi dès E14 mais à un niveau supérieur à celui de 7 Kb puis il augmente pour atteindre un plateau à P18 et dans le cerveau adulte où il semble être exprimé à un niveau supérieur à celui de 7 Kb. (fig. 15).

D) Immunolocalisation du FGFa dans le cerveau.

Cette étude a été réalisée sur des cerveaux d'ages différents. Il en ressort qu'une immunoréactivité peut être observée dans les cerveaux postnataux à partir de 11 jours au niveau de structures vasculaires capillaires comme le montre la photographie a de la figure 16.

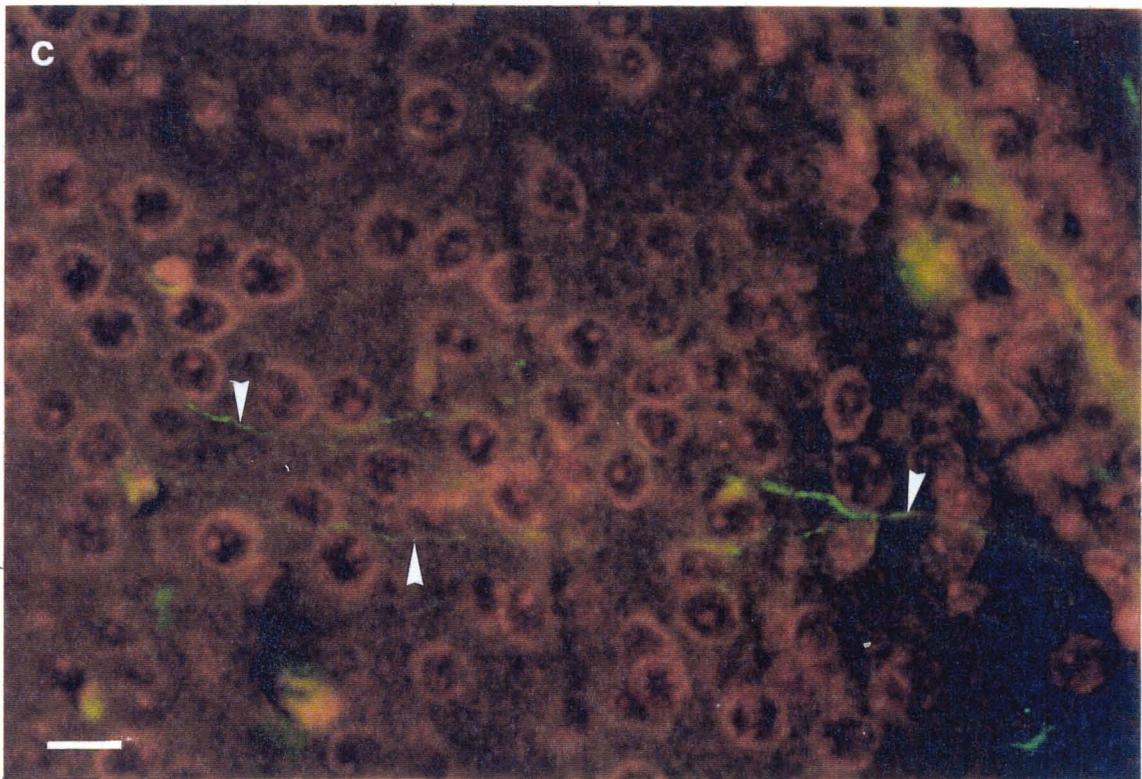
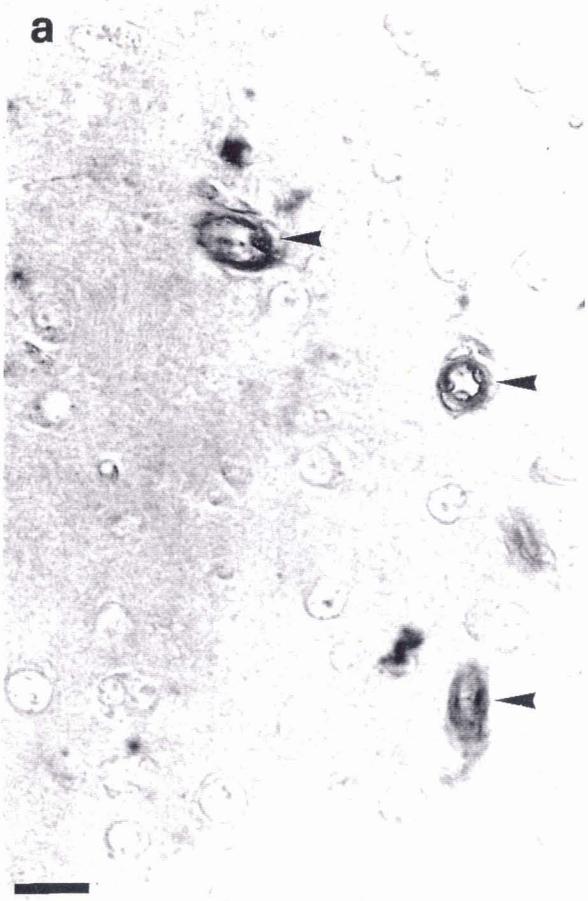
FIGURE 16

Immunolocalisation de FGfAIR dans le cerveau de souris à P14.

a : Section frontale du télencéphale traitée par le sérum immun. Noter l'immunoréactivité localisée au niveau des capillaires (flèches). (immunopéroxydase ; échelle : 40 μm)

b : Section frontale du télencéphale traitée par le sérum pré-immun. Les flèches repèrent les capillaires. (immunopéroxydase ; échelle : 80 μm)

c : Section frontale du télencéphale traitée par le sérum immun. Noter l'immunoréactivité localisée au niveau des prolongements cellulaires (flèches). (immunofluorescence ; échelle : 30 μm)



Exceptionnellement, grâce à l'immunofluorescence, nous avons pu observer un marquage qui correspond probablement à des prolongements cellulaires. (photographie c).

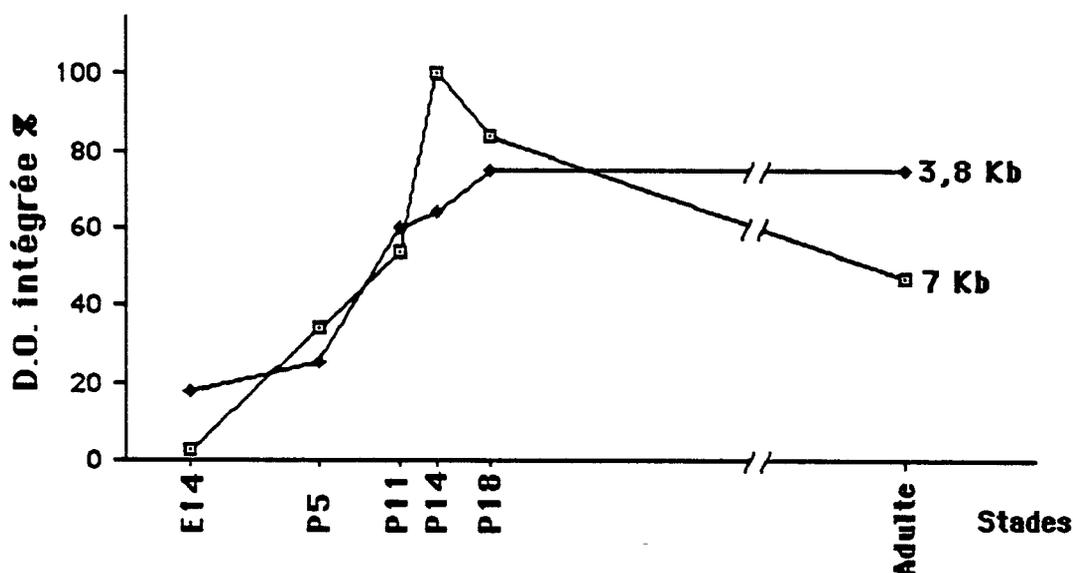


Figure 15 : Evolution des niveaux de transcrits spécifiant le FGFb : Les autoradiogrammes obtenus après 3 semaines d'exposition ont été quantifiés par intégration de la densité optique et les valeurs obtenues exprimées en % par rapport à la valeur maximale. Chaque point représente la moyenne des mesures effectuées pour 2 préparations d'ARN.

III) Discussion, conclusions.

Les résultats concernant la caractérisation du FGFa immunoréactif extrait des cerveaux de souris montrent que l'immunoréactivité et l'activité biologique sont coéluées à 1 M NaCl d'une colonne d'héparine immobilisée. De plus l'activité biologique est potentialisée par l'héparine. L'analyse en immunoblot montre une bande majeure de 18 KDa ce qui est compatible avec les tailles moléculaires déjà décrites pour ce facteur (Burgess et coll., 1985). La forme immunoréactive de 17 KDa également

détectée peut correspondre à une forme tronquée de la première. Cette caractérisation indique donc sur la base de critères biochimiques, biologiques et immunologiques, que les extraits de cerveaux de souris contiennent un facteur de croissance analogue sinon identique au FGFa.

La concentration de FGFa dans le cerveau de souris varie au cours du développement. Quatre périodes peuvent être distinguées. La première est caractérisée par un niveau bas (0,2 ng/mg) de FGFaIR pendant la vie embryonnaire (E10-E18). Aucun ARNmFGFa n'a été détecté à E14 (même après une autoradiographie de 3 semaines) suggérant que la quantité de ARNmFGFa se situe en dehors de la sensibilité de la technique employée ou que le FGFa que nous avons détecté a été synthétisé avant E10. La possibilité que l'anticorps reconnaisse un antigène proche mais différent du FGFa peut être aussi envisagée.

Une bonne corrélation est observée entre l'élévation de FGFa immunoréactif et le niveau de transcrit après la naissance. De P0 à P5, la concentration de FGFa augmente de 8 fois par rapport à la période embryonnaire et atteint un plateau à P11 (2ème période). Pendant cette période, un transcrit de 4,5 Kb, dont la taille correspond à celle déjà observée pour des cellules d'origine nerveuse (Jaye et coll., 1986), est nettement détecté. La troisième période (P14-P18) débute par une rapide augmentation du niveau de FGFaIR (3-4 fois) avec une élévation correspondante du transcrit de 4,5 Kb. Durant la dernière période, de P30 à l'âge adulte, le niveau de transcrit reste élevé tandis que nous observons une diminution de 50 % du niveau de FGFa immunoréactif. En comparant des autoradiogrammes obtenus après une exposition plus courte, nous avons constaté que le signal obtenu pour le cerveau adulte demeure au même niveau que celui observé pour P18. Le plateau enregistré sur nos autoradiogramme à partir de P18, n'est donc pas

provoqué par une saturation du marquage mais par un maintien d'un niveau élevé de transcription dans le cerveau adulte.

Nos résultats indiquent qu'il existe une bonne corrélation entre le niveau de FGFaIR et de ARNm.FGFa Ils suggèrent en outre que le messenger de 4,5 Kb est continuellement traduit au cours du développement, au moins jusqu'à P30, et que l'élévation du niveau de FGFa résulte vraisemblablement d'une augmentation de synthèse plutôt que d'une simple accumulation de ce facteur après la naissance. La différence qui existe entre le niveau de FGFa et de ses ARNm après P30 peut être interprétée comme résultant d'une consommation ou d'une dégradation plus importante de FGFa, une réduction de la traduction des ARNm ou encore un rendement d'extraction plus faible.

L'existence d'un transcrit de 2,7 Kb a déjà été rapportée pour des cellules musculaires lisses de vaisseau (Winkles et coll., 1987). Il est possible que ce deuxième transcrit ainsi que ceux de 3,1 et 3,5 Kb observés seulement dans le cerveau adulte soient générés par un processus d'épissage alternatif au niveau des régions non codantes comme cela a été montré récemment pour le FGFa (Chiu et coll., 1990) ou plus probablement par l'utilisation de site différent de polyadénylation (Crumley et coll., 1989). Quoi qu'il en soit, ce deuxième transcrit est exprimé à un niveau bien plus faible que celui de 4,5 Kb, suggérant que sa traduction ne pourrait produire qu'une faible partie du FGFa dans le cerveau de souris.

L'hybridation à l'aide de la sonde antisens pour le FGFb a révélé la présence de deux types de transcrits dont la taille (7 et 3,7 Kb) correspond à celles déjà décrites pour ce facteur (Abraham et coll., 1986a). Le nombre des transcrits pour le FGFb apparaît faible par rapport au FGFa. Ce résultat est en accord avec les rendements respectifs d'extraction de ces deux facteurs dans le tissu nerveux adulte ; rappelons

qu'il y a en général 3 fois plus de FGFa que de FGFb par cerveau. Il semble tout de même que ce rapport soit encore plus grand en ce qui concerne le niveau des messagers.

La recherche *in situ* du FGFa à l'aide d'un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement la forme acide du FGF (Caruelle et coll., 1989), nous a permis de mettre en évidence une immunoréactivité au niveau de structures vasculaires de type capillaire dans les cerveaux à partir de P11 et plus rarement au niveau de ce qui nous semble correspondre à des prolongements cellulaires. A notre échelle d'observation, il n'est pas possible de déterminer si l'immunoréactivité observée au niveau des capillaires concerne les cellules endothéliales elles mêmes, en effet, la structure des capillaires du SNC est complexe car elle met en jeu les cellules endothéliales des capillaires, les péricytes et les pieds astrocytaires. De plus, l'immunoréactivité peut aussi concerner les basales. Chez le poulet, il a été montré que le FGFa se fixe sur coupes de manière spécifique au niveau des capillaires sanguins du cerveau et que cette fixation peut être éliminée par traitement à l'héparinase (Hondermarck, 1990), démontrant ainsi la présence de molécules de type héparine pouvant fixer le FGFa au niveau de la microvascularisation du tissu nerveux. En outre, nos observations immunohistochimiques concernant le FGFa dans le cerveau de poulet ont confirmé la présence de FGFaIR au niveau des capillaires sanguins. L'ensemble de ces résultats suggère qu'au moins une partie du FGFaIR peut se situer au niveau des lames basales entourant les capillaires. Il se pose néanmoins le problème de l'origine du FGFaIR étant donné l'absence de données précises concernant la production de FGFa par les cellules endothéliales, les astrocytes et les péricytes. Nous ne pouvons éclaircir ce point. Il a été par contre difficile d'observer une immunoréactivité au niveau de prolongements cellulaires ce qui suggère que la présence de FGFa au

niveau de ces prolongements concerne quelques rares cellules. L'apparition tardive de cette immunoréactivité (P11) est compatible avec l'apparition de niveaux élevés de FGFaIR dans les extraits de cerveaux. Cependant, les résultats que nous avons obtenus montrent une immunoréactivité très limitée qui n'est pas en accord avec l'abondance de ce facteur dans le SNC. Nous pensons que nos résultats peuvent s'expliquer par une mauvaise accessibilité de l'antigène. Des tentatives de digestion trypsique dans le but de démasquer des sites antigéniques n'ont pas amélioré l'immunoréactivité. Les études concernant la localisation précise des FGFs dans le système nerveux sont rares. Pettmann et coll. (1986), à l'aide d'un anticorps monoclonal reconnaissant les deux formes de FGF, ont réussi à mettre en évidence une immunoréactivité cellulaire exclusivement au niveau des neurones de toutes les parties du cerveau de jeunes rats. Huang et coll. (1987) mettent en évidence dans le cerveau de bœuf du FGFaIR au niveau des neurones du cortex. Finklestein et coll. (1988) à l'aide d'un anticorps spécifique du FGFb, confirmèrent la localisation neuronale principalement dans l'hippocampe et le septum mais pas dans les neurones du cortex. Dernièrement, Stopa et coll. (1990) ont relaté la présence de FGFb immunoréactif au niveau des neurones du cortex, de l'hippocampe et de l'hypothalamus et aussi au niveau des astrocytes. Les FGFs ont donc une localisation très majoritairement neuronale. Néanmoins il semble exister une certaine hétérogénéité entre les différents travaux immunohistochimiques, notamment au niveau des types de neurones concernés, dont les causes sont peut-être dues aux conditions de fixation ou encore aux performances différentes des anticorps ou encore à l'espèce d'origine des tissus

A notre connaissance, le travail que nous venons de présenter dans ce premier chapitre est le premier qui relate l'évolution des niveaux de FGFa et de ses transcrits au cours du développement du cerveau.

Cependant, plusieurs équipes ont déjà abordé le problème du rôle des FGFs au cours du développement du cerveau. Risau (1986) a montré que des extraits de télencéphale et de mésencéphale de cerveau de poulet embryonnaire contiennent une activité mitogène sur des cellules endothéliales, qui varient au cours du développement. Minimum à 6 jours, celle ci augmente progressivement pour atteindre un maximum aux 14 et 16 ème jours et diminue ensuite au 18ème jour ; l'évolution postnatale n'a pas été étudiée. Cette même étude a de plus mis en évidence la présence d'un facteur angiogène dans les cerveaux embryonnaires de 18 jours dont les caractéristiques biochimiques sont très proches du FGFa. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activité mitogène présente dans les cerveaux embryonnaires de poulet, peut être attribuée au moins pour partie au FGFa et certainement aussi au FGFb (Risau et coll., 1988). De manière tout à fait similaire Caday et coll. (1990) montrent chez la souris que l'activité mitogène présente dans les extraits de cerveaux est très faible durant la période embryonnaire, augmente fortement à partir de la deuxième semaine postnatale et atteint un plateau au 40 ème jour. Bien que les FGFs soient responsables de la presque totalité de l'activité mitogène des extraits de cerveau (Gospodarowicz et coll., 1987), les deux études précédentes ne peuvent tenir compte d'une éventuelle activité inhibitrice puisqu'elles ont été menées avec des extraits bruts. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus sont compatibles avec ceux de Caday et coll. (1990). Ces deux résultats montrent en effet que les FGFs dont le FGFa apparaissent dans le cerveau de souris lors du développement postnatal. L'étude présentée par Caday et coll. (1990) n'a pas mis en évidence par "immunoblot" de FGFa dans les cerveaux P10 à la différence du notre où des niveaux très significatifs de FGFaIR et de ARNmFGFa ont été détectés à la même époque. Nous pensons que ce désaccord peut résulter d'une sensibilité différentes des techniques de

détection. Les résultats obtenus chez le poulet (Risau, 1986) indiquent que les FGFs apparaissent plus précocement dans le cerveau, mais il est difficile de comparer ces résultats à ceux obtenus chez la souris car les horloges contrôlant la vitesse de développement de ces deux espèces ne sont pas équivalentes.

CHAPITRE 2.

CHAPITRE 2

ETUDES DE LA REGULATION AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES MESSAGERS SPECIFIANT LE PRODUIT DES GENES BEK ET FLG, RECEPTEURS PUTATIFS DES FGFS.

I) Introduction.

Nous avons vu dans le premier chapitre que la quantité de FGFa et de ses transcrits évoluent selon un profil particulier au cours du développement. Cependant la présence de FGFa dans le cerveau n'implique pas pour autant que celui ci intervient dans le développement. La recherche d'une fonction de ce facteur dans le système nerveux central nous a conduit à étudier l'expression des récepteurs au cours du développement. Dans une étude parallèle effectuée avec H. Hondermarck sur l'expression des récepteurs des FGFs au cours du développement du cerveau de poulet, nous avons pu constater, qu'il existe une bonne corrélation entre la présence de récepteurs, déterminée par analyse de Scatchard de la fixation de facteurs radiomarqués sur des membranes de cerveaux, et la présence de transcrits codant pour un des récepteurs putatifs des FGFs. Nous nous sommes donc proposés d'étudier l'expression des récepteurs des FGFs à l'aide de sondes spécifiant les produits des gènes flg et bek mises à notre disposition par M. Jaye (Rorer, King of Prussia, PA, USA).

II) Résultats.

les sondes utilisées se caractérisent comme suit :

- une sonde ADNc de 860 bp clonée dans le site EcoRI/HindIII de pGem 1 comprenant la partie 5' non codante et le premier domaine immunoglobuline du gène BEK humain (Dionne et coll., 1990) ;

-une sonde ADNc de 650 bp clonée dans le site EcoRI/HindIII de pGem 1, codant pour une partie de la région non codante en 5' (100 bp) et le premier domaine immunoglobuline du gène FLG humain (Dionne et coll., 1990).

Les résultats obtenus avec la sonde BEK montrent qu'il existe un transcrit d'environ 4,5 Kb et que celui ci est présent à tous les stades étudiés. Le signal ne semble pas présenter de variations importantes de niveau au cours du développement (fig. 17). Il semble toutefois qu'à P14 le signal devienne plus intense, qu'il diminue ensuite à P18 et P30 et s'intensifie à nouveau dans le cerveau adulte. Un autre transcrit de 1,5 Kb est aussi détecté à partir de P11. L'intensité du signal pour ce transcrit augmente progressivement jusqu'à P30.

L'hybridation avec la sonde FLG n'a pas révélé de transcrits.

III) Discussion, conclusions.

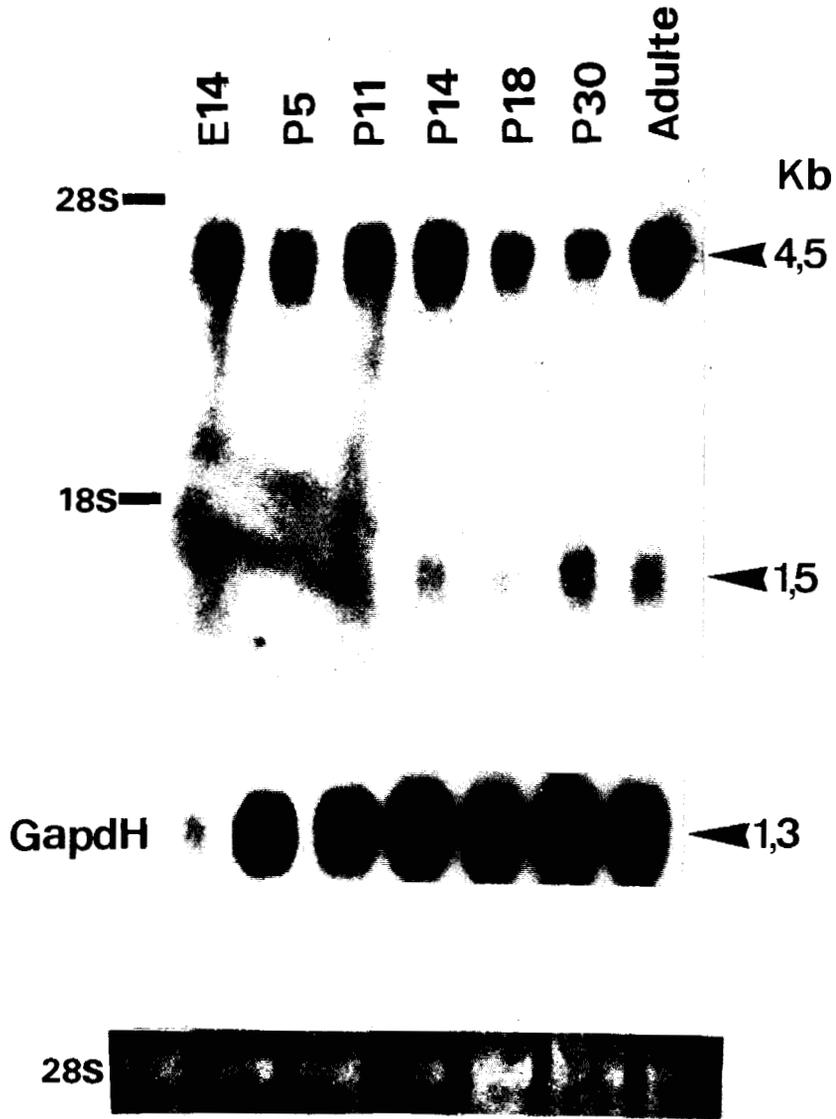
La sonde BEK humaine que nous avons employée code pour la partie 5' non codante et la première boucle immunoglobuline du récepteur des FGFs. Bien que la séquence de bek murin ne soit pas encore connue dans sa partie N-terminale, il semble que celle ci soit homologue à la séquence nucléotidique de BEK humain puisque cette sonde s'est hybridée dans des conditions de stringence élevée avec les ARN de souris.

FIGURE 17

Expression des ARNm de bek (récepteur putatif des FGFs) dans le cerveau de souris au cours du développement.

Les ARN poly A (10µg/piste) provenant de cerveaux de souris aux stades E14, P5, P11, P14, P18, P30 et adultes ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose (2,2 M formaldéhyde), transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec la sonde ADNc de BEK humain (exposition : 1 semaine). La membrane de transfert a été ensuite déhybridée puis réhybridée avec la sonde ADNc de la GapdH (exposition : 12 hr). Les ARN ribosomiaux 28S et 18S sont repérés et les tailles des différents transcrits indiqués

BEK



Par ailleurs la taille d'un des transcrits que nous avons détecté (4,5 Kb) est comparable à celle décrite par Dionne et al (1990) pour la lignée de tératocarcinome NTERA-2 (4,4 Kb). Le transcrit de 4,5 Kb est présent dans le cerveau de souris à tous les stades étudiés et ne semble pas présenter de variation de niveau importante. Bien qu'il semble que la quantité d'ARN transférés pour chaque stade soit équivalente, il ne nous est pas possible d'affirmer si les augmentations observées à P14 et chez l'adulte sont significatives. L'utilisation d'un plus grand nombre de préparations d'ARN est nécessaire pour éclaircir ce point. Le signal enregistré pour la GapdH à E14 est plus faible que pour les autres stades. Nous pensons que ce résultat n'est pas provoqué par un transfert incomplet des ARNs puisque la quantité d'ARN 28 S est comparable à celle des autres stades (fig. 17) mais plutôt par une expression plus faible des messagers de la GapdH dans les cerveaux embryonnaires. Le transcrit de 1,5 Kb est détecté dans les cerveaux uniquement à partir de P11. La présence de transcrits de 1,5 Kb pour bek n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Cependant nous savons que son existence est connue et qu'il correspond probablement à une forme alternative du messager de 4,5 Kb qui coderait pour la partie immunoglobuline du récepteur (Jaye, communication personnelle). De plus, le fait que le transcrit de 1,5 kb apparaisse plus tardivement que celui de 4,5 Kb suggère l'existence d'une régulation indépendante et également un rôle différent pour la protéine codée par ces deux messagers. Cette forme de récepteur amputée de son domaine kinase, pourrait n'avoir aucun rôle dans la transduction du signal mais pourrait par contre avoir une fonction importante dans le contrôle des interactions ligand/récepteur.

A l'aide d'une sonde flg codant pour toute la protéine Reid et coll. (1990) ont montré qu'un transcrit de 4,3 Kb est exprimé à un haut niveau dans les cerveau de souris de stades E14 à P14. Kornbluth et coll. (1988)

montrent que bek est exprimé dans le cerveau de souris adulte. Bien que flg et bek soient deux entités différentes, ils sont très proches structurellement et présentent une homologie globale de 71 % pouvant atteindre par endroit 92 % (Dionne et coll., 1990). Dans ces conditions, l'utilisation d'une sonde codant pour toute la longueur de la protéine ne permet pas de distinguer les transcrits bek des transcrits flg, contrairement aux sondes que nous avons utilisées. Pris dans leur ensemble, nos résultats demeurent néanmoins compatibles avec ceux obtenus par ailleurs avec d'autres types de sondes (Kornbluth et coll., 1988 ; Reid et coll., 1990). Dans un travail parallèle effectué en collaboration avec H. Hondermarck chez l'embryon de poulet aux stades E7 à P1, nous avons pu également mettre en évidence des transcrits 4,5 et 1,5 Kb et ce à tous les stades étudiés.

L'utilisation de la sonde humaine FLG (Dionne et coll., 1990) ne nous a pas permis de détecter de transcrits au niveau des ARN de souris. Nous pensons que nos conditions d'hybridation ne sont pas à mettre en cause puisque ce sont les mêmes qui ont été utilisées pour la sonde BEK. De plus, nous avons constaté que l'homologie de séquence peptidique entre le produit du gène FLG humain (Dionne et coll., 1990) et le récepteur au FGFb cloné chez la souris (Reid et coll., 1990), est d'au moins 94 % au niveau du premier domaine immunoglobuline. Une conclusion possible serait donc l'absence de transcrit spécifiant le produit du gène flg dans le cerveau de souris, au moins pour les stades que nous avons étudiés, ou encore que leurs niveaux soient en dehors de la sensibilité de notre technique. Cette conclusion n'est pas compatible avec les résultats de Reid et coll. (1990) qui mettent en évidence à l'aide d'une sonde flg murine codant pour toute la protéine, la présence de messagers dans le cerveau de souris à E14, E19 et P14. Néanmoins ces mêmes auteurs relatent également l'existence d'une autre forme de messager

codant pour un récepteur au FGFb, caractérisé par l'absence du premier domaine immunoglobuline. L'existence de cette forme tronquée de récepteur chez la souris a été confirmée par Mansukhani et coll. (1990) qui par ailleurs ne rapportent pas l'existence d'une forme classique à trois boucles immunoglobulines. Cette différence entre ces deux travaux peut s'expliquer par l'origine des cDNAthèques employées pour le clonage. En effet, Reid et coll. ont utilisé une cDNAthèque de neuroépithélium d'embryon de souris de 10 jours, tandis que Mansukhani et coll. ont utilisé une cDNAthèque de cellules NIH/3T3 transfectées par K-FGF.

Nous pensons que si flg est transcrit dans les cerveaux de souris pour les stades que nous avons étudiés, il s'agit d'ARNm codant pour la forme comportant 2 domaines immunoglobulines et ce pour les trois raisons suivantes :

- Reid et coll. détectent les messagers de flg de E14 à P14 avec une sonde codant pour la protéine entière ;
- il existe chez la souris une forme tronquée pour flg (Mansukhani et coll., 1990 ; Reid et coll., 1990) ;
- la sonde FLG humaine que nous avons utilisée qui code pour la première boucle immunoglobuline, ne s'hybride pas avec les ARNs de souris, au moins à partir de E14.

L'étude de l'expression des ARNm flg nécessite donc l'utilisation d'un autre type de sonde. Nous pensons qu'une sonde ADNc spécifiant l'insert du domaine kinase de flg pourrait représenter une solution intéressante, puisqu'il existe seulement une homologie de 50 % au niveau de ce domaine entre le récepteur flg et bek.

Jusqu'à présent, les données concernant la biologie moléculaire des récepteurs des FGFs, indiquent qu'il existe une famille de récepteurs sans pour autant distinguer de récepteur spécifique pour une forme de FGF.

Ceci suggère que le message porté par le FGFa lorsqu'il est présent, peut être recueilli au niveau des cellules qui exprime le récepteur bek.

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3

EFFETS D'UNE LESION MECANIQUE SUR LES NIVEAUX DE FGF ACIDE ET DE SES RECEPTEURS.

I) Introduction.

La lésion du système nerveux central constitue un autre modèle où le rôle physiologique des FGFs peut être appréhendé. Les effets d'une lésion sur le tissu nerveux sont bien connus, elle provoque une nécrose et notamment la mort de neurones qui chez l'adulte ne seront pas remplacés. La cicatrisation de la lésion est assurée par la prolifération de cellules gliales et la reconstitution d'une vascularisation (Cavanagh, 1970 ; Dubois et coll., 1985a ; Dubois et coll., 1985b). La nature des facteurs stimulant et contrôlant la gliose et la vascularisation ne sont pas encore connus. Dans les généralités consacrées aux FGFs, nous avons vu que ces facteurs de croissances sont angiogènes, stimulent la prolifération et/ou la différenciation des cellules gliales et qu'ils sont de plus neurotrophiques pour des neurones d'origine variée. En outre, des travaux récents ont montré dans les cerveaux adultes qu'un traumatisme induit une élévation des niveaux de FGFs ou de leurs transcrits (Nieto-Sampedro et coll., 1988; Logan, 1988 ; Finklestein et coll., 1988 ; Stopa et coll., 1990). En l'absence de peptide signal pouvant rendre compte d'un mode d'excrétion classique des FGFs, la nécrose importante qui survient après une lésion peut constituer une voie possible de libération des FGFs. Chez le cerveau immature, la production de facteur de croissance consécutivement à une lésion a été très peu étudiée. Nieto-Sampedro et coll. (1984) ont montré que des extraits de cerveaux de jeunes rats blessés à 3 jours contiennent

des facteurs assurant *in vitro* la survie de neurones du striatum et *in vivo* la survie de transplants du corpus striatum.

Nous avons dans ce troisième chapitre, mesuré pour des cerveaux néonataux blessés, les niveaux de FGFa, des ARNm spécifiant le FGFa et les ARNm spécifiant le produit du gène bek.

II) Résultats.

Avant d'aborder les résultats de ce chapitre, nous allons décrire la technique de lésion que nous avons employée.

La lésion est effectuée dans des conditions stériles, sur des souriceaux de 3 jours anesthésiés par refroidissement, à l'aide d'une aiguille de tungstène coudée en L avec un rayon de 2 mm (lésion légère) ou 3 mm (lésion sévère). Celle ci est enfoncée sur une longueur de 3mm à travers le crâne à environ 3 mm sur la droite de la suture médiane et 3 mm devant la suture occipitale comme indiqué sur la figure 18. La lésion consiste en une dilacération du tissu nerveux par rotation de l'aiguille. Le volume de tissu nerveux détruit dans ces conditions est estimé à 30 mm³ pour l'aiguille la plus petite et 60 mm³ pour la plus grande. L'opération terminée, les souriceaux sont réchauffés sous une lampe et remis par portée avec leur mère.

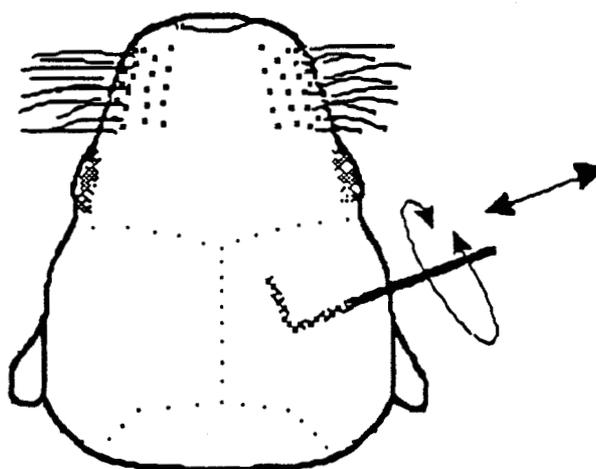


Figure 18: Schéma indiquant comment est effectuée la lésion de l'hémisphère cérébral droit sur des souriceaux de 3 jours.

A) Evolution des niveaux de FGFa immunoréactif.

Nous avons quantifié le FGFa dans les cerveaux blessés de souris à partir de 5 jours soit 2 jours après la lésion et aux jours 9, 11, 14, 18, 30 et 60. Les lésions et les mesures ont été effectuées sur 3 lots indépendants de souriceaux. La série "lésion légère" a été préparée en même temps que la série concernant le développement normal décrite dans le premier chapitre. La série "lésion sévère" a été préparée et mesurée ultérieurement sans témoin parallèle.

Nos résultats indiquent (fig. 19) que lors d'une lésion légère, le niveau de FGFaIR extrait des cerveaux lésés est 3 fois plus faible à P5 par rapport au témoin (0,5 ng/mg contre 1,6ng/mg) mais devient un peu plus élevé à P9 (2,2 contre 1,7 ng/mg). A P11 la différence de niveau n'est pas significative. A P14 une élévation de FGFaIR survient mais à un niveau inférieur à celui enregistré dans les cerveaux témoins (3,5 contre 5ng/mg), cette différence se maintenant à P18.

Lors d'une lésion plus sévère, le niveau de FGFaIR à P5 est équivalent à celui observé pour la lésion plus petite. A P9 par contre le

niveau demeure légèrement inférieur. Entre P11 et P14 le niveau de FGFaIR n'augmente pas et se maintient à un niveau 2,5 fois plus faible (1,9 contre 5,2 ng/mg). Il augmente ensuite légèrement à P18 (2,9 contre 5ng/mg). A 1 et 2 mois le niveau de FGFaIR dans les cerveaux blessés s'élève et sont supérieurs à ceux enregistrés dans les cerveaux témoins bien que la différence ne soit pas significative à 2 mois.

B) Recherche de FGFaIR *in situ*. dans les cerveaux blessés.

Cette recherche a été entreprise dans des cerveaux blessés d'âges différents. Nous avons constaté qu'une immunoréactivité apparaît en bordure de la lésion et de façon plus accentuée dans les cerveaux de 11 jours (fig. 19, photographies b,c,d,e), soit 8 jours après la lésion. Le montage photographique e de la figure 20 montre la partie du télencéphale d'une souris de 11 jours blessée à trois jours à l'aide d'une simple aiguille. On voit autour de cette lésion et sur toute sa longueur, des cellules dont le cytoplasme est immunoréactif. Les types cellulaires auxquels appartiennent ces cellules n'ont pas été déterminés. Cependant les cellules ayant un gros noyau ($> 12 \mu\text{m}$) sont probablement des neurones et les cellules plus petites mais plus nettement marquées, de nature gliales. Les cellules plus éloignées de la lésion ne sont pas immunoréactives. Les photographies b, c et d correspondent à une lésion forte pour laquelle on observe également une immunoréactivité au niveau cellulaire ainsi qu'une fine bordure nettement marquée par endroit.

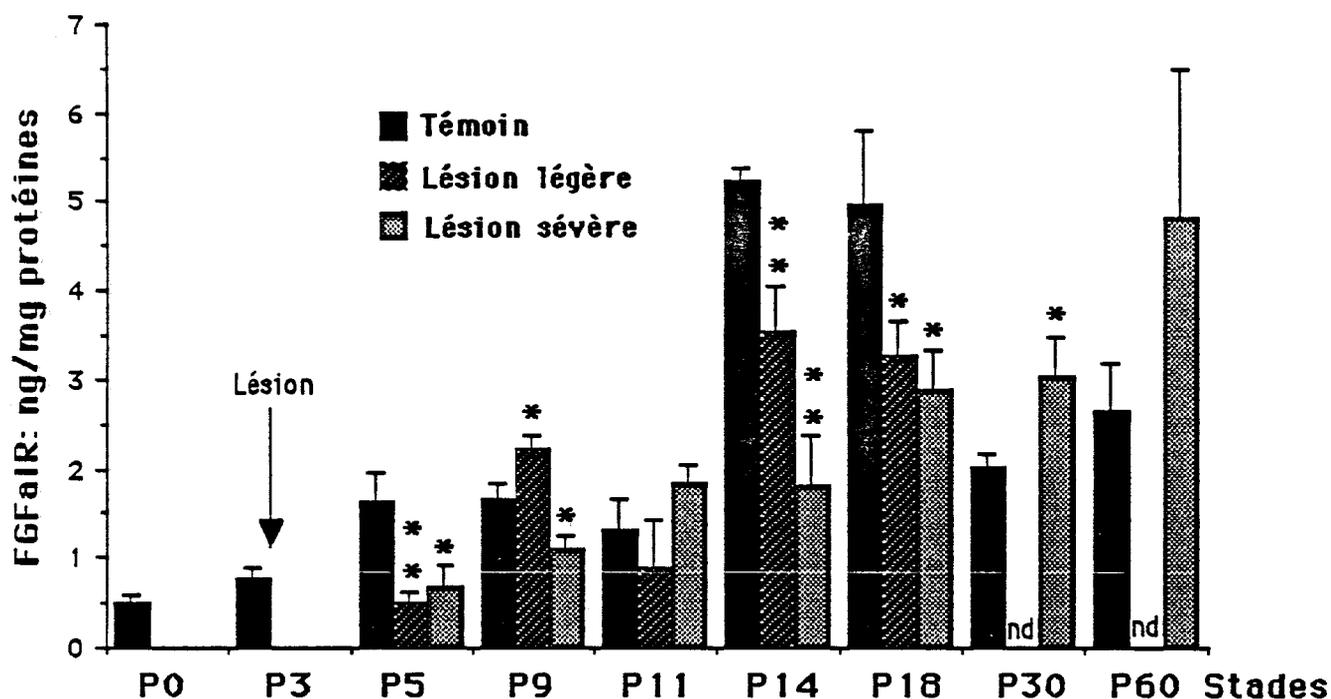


Figure 19 : Niveaux de FGFaIR dans les cerveaux blessés. Pour les deux types de blessures, les mesures ont été effectuées sur trois séries indépendantes de souriceaux. Les résultats sont exprimés en ng équivalent FGFa par mg de protéines extraites \pm l'écart type. La significativité des résultats est déterminée par le test de t (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). nd: non déterminé.

C) Niveaux de transcrits spécifiant le FGFa et le produit du gène bek.

Pour cette étude, nous avons effectué une lésion sévère sur des cerveaux de souris de 3 jours et extraits les ARN à 5, 14 et 30 jours. Une série témoin a été préparée parallèlement. Les détections successives des différents transcrits ont été effectuées sur la même membrane de transfert. C'est pourquoi, nous n'avons pas utilisé pour cette étude de sondes ARN du FGFa afin d'éviter les traitements à la RNase qui détruit les ARN non hybridés. Afin de pouvoir hybrider les mêmes blots avec les différentes sondes, il est nécessaire de procéder entre chaque hybridation à leur déhybridation. (voir matériel et méthodes) La disparition des hybrides est vérifiée par autoradiographie. Les radiomarquages des

FIGURE 20

Immunolocalisation de FGFaIR dans le cerveau blessé de 11 jours (immunopéroxydase).

a : Section frontale du télécéphale au niveau de la lésion, traitée par le sérum non immun (échelle : 160 μm).

b,d : Section frontale réalisée au même niveau qu'en **a**, traitée par le sérum immun. Noter les cellules immunoréactives autour de la lésion. (échelle : **b**, 160 μm ; **d**, 80 μm).

c : Section frontale au niveau de la lésion, traitée par le sérum immun. Noter l'immunoréactivité non cellulaire en bordure de la lésion. (échelle : 120 μm)

e : Section frontale au niveau d'une lésion réalisée à l'aide d'une aiguille et traitée par le sérum immun. (échelle : 80 μm).

a



b



c



d



e

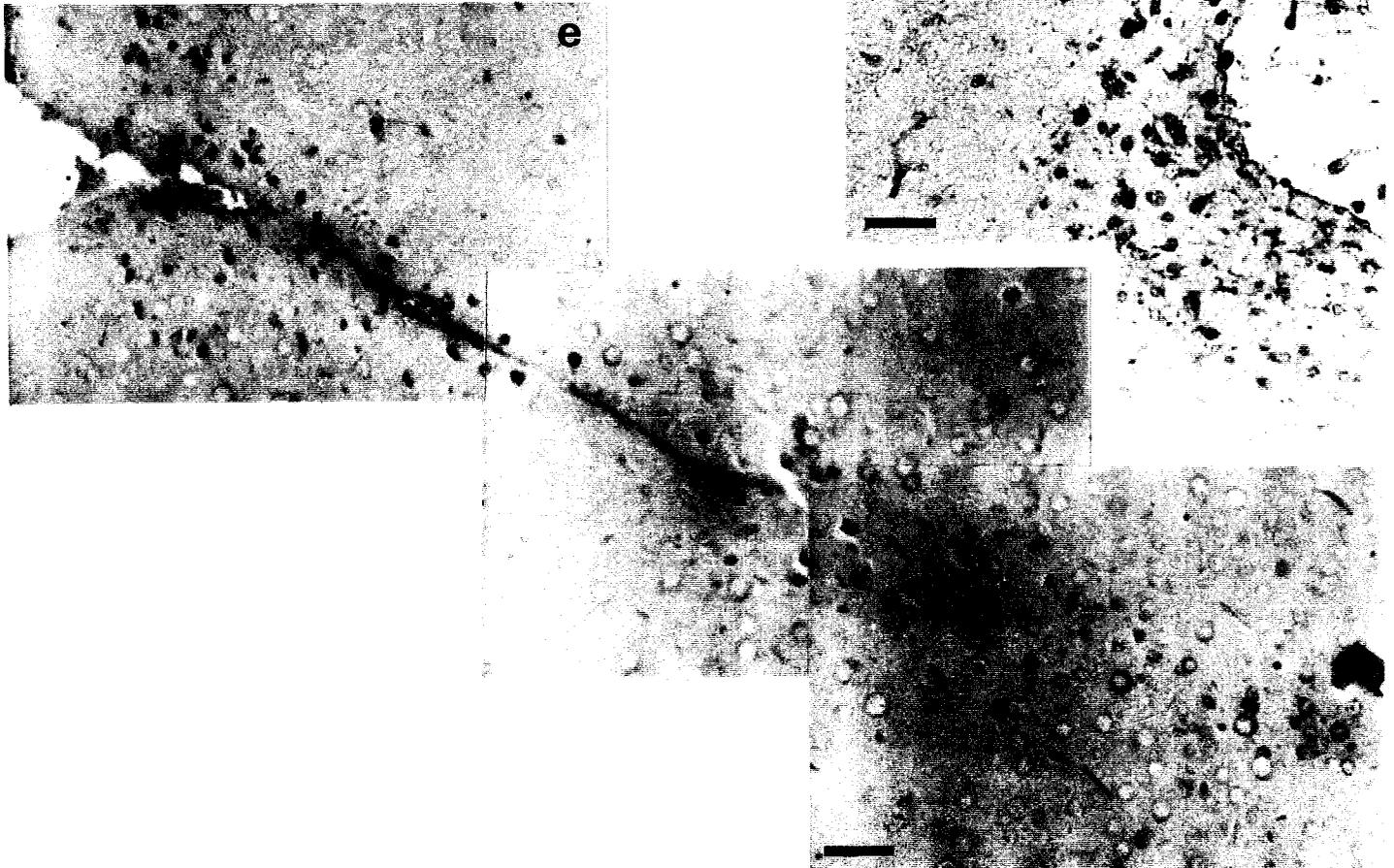
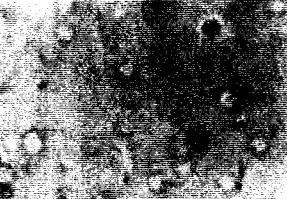
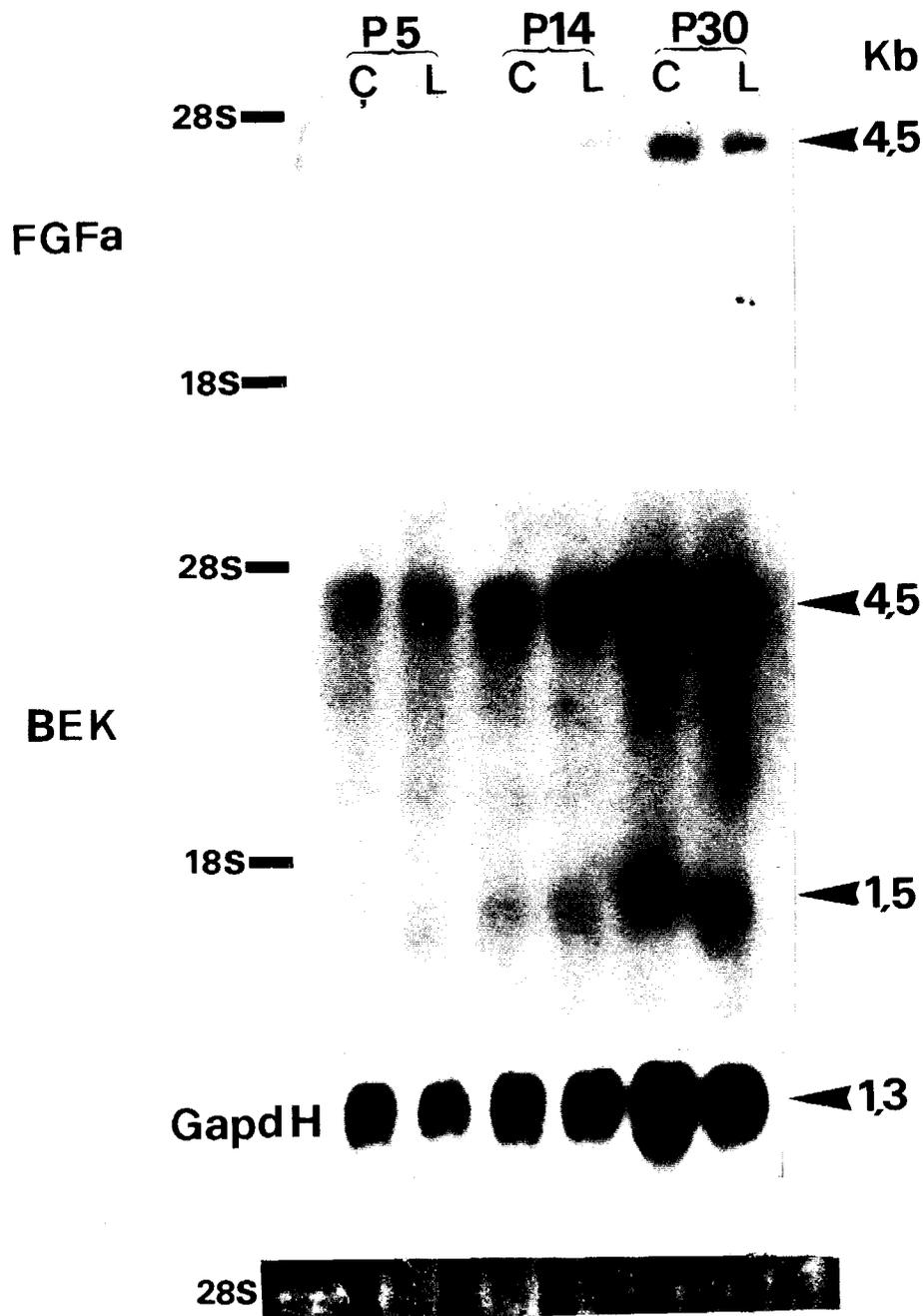


FIGURE 21

Expression des ARNm du FGFa et de bek dans les cerveaux blessés.

Les ARN poly A (10µg/piste) ont été extraits de cerveaux contrôles (C) et de cerveaux ayant reçu une lésion sévère à P3 (L), à P5, P14 et P30, séparés par électrophorèse en gel d'agarose (2,2 M formaldéhyde), transférés sur une membrane de nylon puis hybridés successivement avec les sondes ADNc spécifiant le FGFa (exposition : 1 semaine), le produit du gène BEK humain (exposition : 1 semaine) et la GapdH (exposition : 12 hr). Entre chaque hybridation la membrane de transfert a été déhybridée. Les ARN ribosomiaux 28S et 18S sont repérés et les tailles des différents transcrits indiquées.



différentes sondes ont été réalisés par la technique "random" (voir matériel et méthodes).

Les résultats que nous avons obtenus (fig 21) indiquent que pour le FGFa, un transcrit de 4,5 Kb est détecté à P14 et à P30 dont le niveau semble équivalent entre les cerveaux témoins et blessés. Pour bek, nous avons détecté la présence d'un transcrit de 4,5 Kb de P5 à P30 et d'un transcrit de 1,5 Kb de P14 à P30. Il semble que le transcrit de 1,5 Kb soit très faiblement exprimé dès P5 dans les cerveaux blessés. Toutefois, les niveaux de ces transcrits ne semblent pas affectés par la lésion.

Le signal observée grâce à la sonde GapdH montre que pour chaque stade, la quantité d'ARN messagers est équivalente entre le lot témoin et le lot expérimenté.

III) Discussion, conclusions.

Nous avons montré qu'une lésion mécanique unilatérale du télencéphale chez le nouveau-né modifie sensiblement le niveau de FGFaIR extrait. Cette modification est particulièrement perceptible à P14 où survient normalement une élévation rapide du niveau de FGFaIR. En effet, nous avons enregistré une diminution du niveau de FGFaIR atteint à P14 et à P18. Cette diminution est d'autant plus grande que la lésion est sévère puisque dans le cas d'une destruction d'un volume important de tissu nerveux, le niveau de FGFaIR n'augmente pas à P14. Les résultats obtenus précédemment pour le cerveau adulte par Nieto-Sampedro et coll. (1988), ont révélé une élévation précoce du niveau de FGFaIR dans une éponge de "gelfoam" implantée dans la cavité lésionnaire. Cette augmentation peut correspondre d'ailleurs, à une simple libération de FGFa par les cellules en "souffrance" qui bordent la plaie. Cependant, il

n'y a pas d'augmentation du taux de FGFaIR autour de la plaie, contrairement au FGFb (Finklestein et coll., 1988). Il semble donc, que contrairement au FGFb (Finklestein et coll., 1988), le niveau de FGFa n'augmente pas après une lésion du tissu nerveux et que chez le nouveau né, le taux global de FGFaIR diminue après une lésion sévère.

La recherche de transcrits spécifiant le FGFa dans les cerveaux blessés sévèrement n'a pas révélé de variation de niveaux de messagers par rapport au contrôle, au moins pour les stades étudiés (P5, P14 et P30). Ce résultat est différent de celui obtenu pour le cerveau adulte par Logan (1988) qui a observé une augmentation très nette du niveau de transcrits pour le FGFa après une lésion moins importante que celle que nous avons pratiquée. La situation est d'ailleurs confuse en ce qui concerne le FGFa puisque il est difficile de concilier une absence de d'élévation de FGFaIR (Nieto-Sampedro et coll., 1988) et une élévation importante du niveau de messagers (Logan, 1988) après une lésion, à moins que ces transcrits ne soient pas traduits.

Pour l'instant et à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée concernant le comportement des récepteurs des FGFs lors d'une lésion du tissu nerveux. Les niveaux des transcrits de 4,5 Kb et 1,5 Kb détectés à l'aide de la sonde BEK humaine ne semblent pas non plus affectés par une lésion sévère du cerveau. Il semble cependant que le transcrit de 1,5 Kb apparaît plus précocement sous l'effet d'une lésion.

Enfin, nos travaux d'immunolocalisation dans le cerveau blessé indiquent qu'une lésion du tissu nerveux constitue une situation favorable pour laquelle l'anticorps que nous avons utilisé permet une détection au niveau cellulaire de FGFaIR. Nous pensons que cette apparition d'immunoréactivité au niveau cellulaire peut être provoquée par une meilleure accessibilité antigénique. Les types cellulaires présentant cette immunoréactivité n'ont pas été déterminés mais sont probablement gliaux

et neuronaux. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs et indiquent qu'une lésion du système nerveux central entraîne une augmentation de l'immunoréactivité vis à vis des FGFs, au niveau même des zones lésées. En effet, deux études montrent, lors de lésions mécaniques et pathologiques du cerveau, une augmentation de FGFb immunoréactif au niveau des zones lésées (Finklestein et coll., 1988; Stopa et coll., 1990). De plus, le délai d'apparition d'une semaine du FGFbIR au niveau d'une lésion mécanique du cortex (Finklestein et coll., 1988), est comparable à celui que nous avons observé pour le FGFa dans le cerveau néonatal. Néanmoins, le nombre de cellules immunoréactives (principalement des astrocytes) chez l'adulte après lésion, est beaucoup plus important que chez le jeune. Cette situation nous semble conciliable avec la gliose cicatricielle qui est limitée dans le cerveau néonatal par rapport au cerveau adulte (Eclancher et coll., 1990).

Ainsi après blessure, il apparaît que les niveaux des transcrits du FGFa et de bek sont maintenus alors que celui du FGFaIR diminue significativement. Cependant, nos résultats d'immunolocalisation ont permis de déceler une immunoréactivité au niveau de la blessure des cerveaux blessés. Il est possible que la diminution relative de FGFaIR dans les cerveaux blessés et le maintien des niveaux de transcrits du FGFa et de bek, peuvent être expliqués par une augmentation du taux de dégradation et/ou de consommation du FGFa lors de la cicatrisation de la lésion.

CHAPITRE 4

CHAPITRE 4

EFFET DE LA MUTATION "JIMPY" SUR LES NIVEAUX DE FGF ACIDE ET DE SES RECEPTEURS.

I) Introduction.

La lésion mécanique du SNC à l'aide d'une aiguille entraîne des altérations locales du tissu nerveux. Nous avons donc recherché un modèle d'agression plus sévère du SNC. La mutation Jimpy (jp) constitue à cet égard une situation de choix. Cette mutation récessive de la souris est portée par le chromosome X (Phillips, 1954) et résulte de la substitution d'une base paire au niveau du 4ème intron du gène codant la protéine protéolipidique de la myéline (PLP) (Nave et coll., 1987). Les oligodendrocytes ne peuvent plus synthétiser cette protéine qui est un composant essentiel de la gaine de myéline. Cette anomalie affecte uniquement le SNC et épargne le SNP (Billings-Gagliardi et Adcock, 1981). Les examens histologiques et immunohistologiques indiquent une absence presque totale de myéline dans toutes les zones du SNC (Sidman et coll., 1964 ; Knapp et coll., 1986 ; Lachapelle et coll., 1990). A ce déficit majeur de myéline sont associés également des anomalies au niveau des astrocytes (Meiers et Bishoff, 1975 ; Skoff et coll., 1976 ; Omlin et Anders, 1983) et du cycle cellulaire des oligodendrocytes (Skoff, 1982 ; Knapp et coll., 1986), une dégénérescence neuronale (de Webster et coll., 1976 ; Krist et coll., 1978 ; Rosenfeld et Friedrich, 1983 ; Omlin et Anders, 1983) et la destruction de la myéline (Sidman et coll., 1964 ; Hirano et coll., 1969). Les syndromes extérieurs de cette mutation apparaissent sous forme de tremblements à P11 et se transforment par

des convulsions chez les animaux plus âgés. L'espérance de vie des mutants *jp* n'excède pas 30 jours.

Nous avons dans ce quatrième chapitre, apprécié les effets de la mutation *jimpy* sur les niveaux de FGFaIR, des transcrits du FGFa et de *bek*.

II) Résultats.

Les cerveaux de souris mâles hémizygotés *Ta jp/Y (jp)* et de femelles hétérozygotes *Ta jp/Ta+ jp+ (jp+)* qui ont été utilisés pour cette étude nous ont été aimablement fournis par F. Lachapelle. (INSERM U 134, hôpital de la Salpêtrière). Les individus *jp+* présentent un léger retard de myélinisation mais sont parfaitement viables. Ils ont servi de témoins pour nos mesures. Les jeunes individus *jp* sont repérés en utilisant la mutation *Tabby (Ta)* comme marqueur. Absence de sous-poil, et défaut de développement des vibrisses post-orales et post-orbitaires constituent des caractéristiques aisément repérables du syndrome de la mutation *Tabby*.

A) Evolution des niveaux de FGFaIR.

Nous avons mesuré le niveau de FGFaIR dans les extraits bruts de souriceaux *jp* et *jp+* à P5 et à P14. Les cerveaux (2 par série) ont été broyés dans 10 ml de tampon Tris/HCl (10 mM ; 0,4 M NaCl ; pH7,4) contenant des inhibiteurs de protéases (voir annexe techniques). Après une incubation d'une heure dans de la glace, l'homogénat a été centrifugé (48000g, 4 °C, 30 mn) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été ensuite dosé par EIA.

Nos résultats montrent (fig. 22) qu' à P5 le niveau de FGFaIR dans les extraits bruts est de 9,3 ng/mg dans les cerveaux jp contre 4,8 ng/mg dans les cerveaux jp+, cependant les variations importantes enregistrées pour les mutants rend non significative cette différence. A P14 par contre, la différence de niveau entre les cerveaux sains et ceux porteurs de la mutation est nettement significative : 17 ng/mg contre 7,5 ng/mg de protéines.

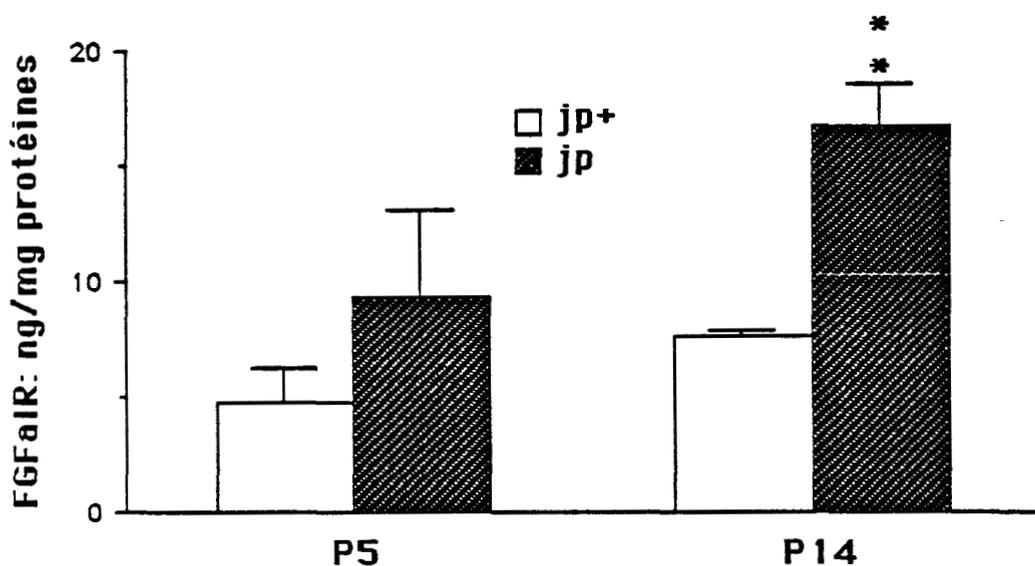


Figure 22 : Niveaux de FGFaIR dans les cerveaux de souris jp ; les extraits bruts de cerveaux (2 cerveaux par série) ont été dosés en EIA à P5 et à P14. Les résultats sont exprimés en ng équivalents FGFa par mg de protéines extraites et les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type de mesures effectuées une seule fois sur trois préparations indépendantes. La significativité des résultats est déterminée par le test de t (** $p < 0,01$).

B) Evolution des transcrits spécifiant le FGFa et le produit du gène bek ("Northern blot").

Pour cette étude, nous avons préparé des ARNs poly A à partir de cerveaux des souriceaux jp+ et porteurs de la mutation jp, aux stades P5,

P14, P18 et P30. La détection des ARNm du FGFa et de bek a été réalisée sur le même blot et à donc nécessité l'utilisation de sondes ADNc selon la méthode décrite dans le chapitre III. De plus, la quantité d'ARN transférée entre les lots sains et mutants a bénéficié d'un contrôle par hybridation de la sonde GapdH, nous permettant de normaliser les intensités de marquage autoradiographique.

1) Evolution des transcrits spécifiant le FGFa.

Après hybridation à l'aide de la sonde ADNc du FGFa, la membrane a été autoradiographiée pendant une semaine. L'autoradiogramme obtenu (fig 23) révèle la présence d'un transcrit de 4,5 Kb détectable de P14 à P30 chez les souris saines et mutantes. L'autoradiogramme a été ensuite analysé par densitométrie afin de quantifier l'intensité du marquage (fig. 24). Nos mesures indiquent que pour les individus jp+ le niveau du transcrit de 4,5 Kb n'est pas détectable pour nos conditions à P5 mais qu'il augmente ensuite rapidement jusqu'à P18 où il semble se stabiliser. Pour individus jp, les mesures indiquent des intensités de marquage inférieures de P14 à P30 : 27% contre 38% à P14, 59% contre 95% à P18, 54% contre 100% à P30.

2) Evolution des transcrits spécifiant le produit du gène bek.

L'autoradiogramme que nous avons obtenu après hybridation de la sonde BEK humaine (fig. 23) indiquent la présence d'un transcrit de 4,5 Kb pour tous les stades étudiés. Un deuxième transcrit de 1,5 Kb a été également détecté à partir de P14 et de manière plus nette pour les cerveaux jp+ à P18 et à P30. L'analyse densitométrique de cet autoradiogramme n'a pas révélé de différence entre cerveaux sains et mutants au niveau du transcrits de 4,5 Kb.

FIGURE 23

Expression des ARNm du FGFa et de bek dans les cerveaux de souris atteintes de la mutation "jimpy".

Les ARN poly A (10µg/piste) provenant de cerveaux d'individus jp (-) et jp+ (+) aux âges P5, P14, P18 et P30, ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose (2,2 M formaldéhyde), transférés sur une membrane de nylon puis hybridés successivement avec les sondes ADNc spécifiant le FGFa (exposition : 1 semaine), le produit du gène BEK humain (exposition : 1 semaine) et la GapdH (exposition : 12 hr). Entre chaque hybridation la membrane de transfert a été déhybridée. Les ARN ribosomiaux 28S et 18S sont repérés et les tailles des différents transcrits indiquées.

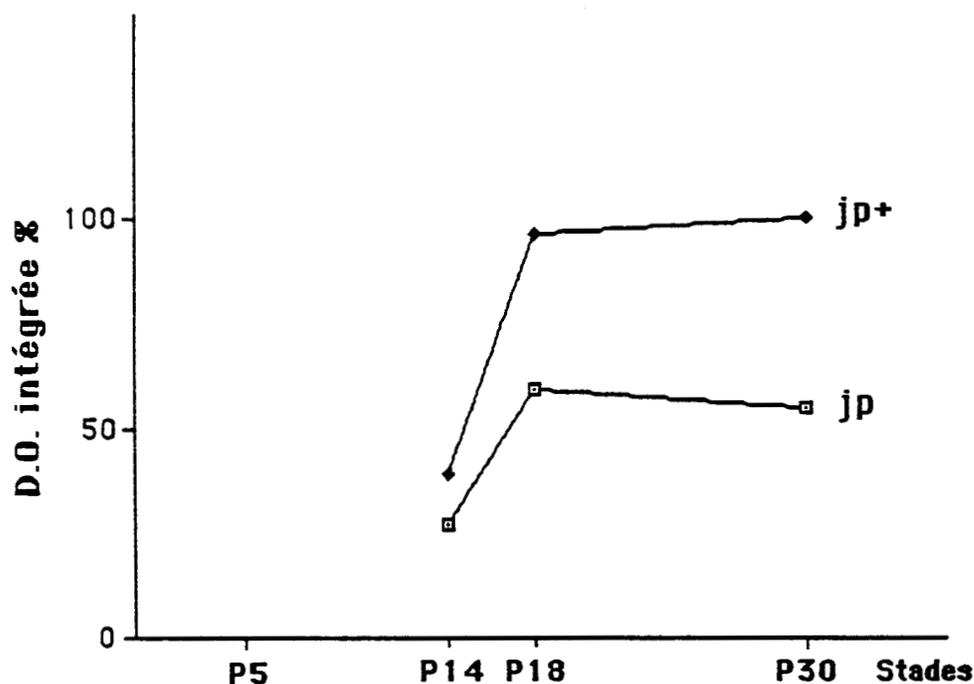


Figure 24 : Evolution des transcrits spécifiant le FGFa dans les cerveaux de souris portant la mutation Jimpy. L'autoradiogramme obtenu après hybridation a été analysé par densitométrie et les pics d'absorption intégrés et normalisés par rapport au signal obtenu avec la sonde GapdH. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la valeur enregistrée à P18 pour les individus jp+.

III) Discussion, conclusions.

La mutation jimpy chez la souris, entraîne des anomalies graves du développement des oligodendrocytes et de la myélinisation, affecte également les astrocytes et cause une dégénérescence neuronale. Il s'agit donc d'une situation de souffrance aiguë du SNC. Nous avons constaté qu'à P14, période où les effets de la mutation sont très nettement perceptibles, le niveau de FGFaIR dans les extraits bruts est plus de 2 fois supérieur dans les cerveaux jp. Par contre, l'analyse par "Northern blot" des niveaux de messagers du FGFa, révèle que ceux ci sont nettement moins exprimés dans les cerveaux jp. Le niveau des messagers du

récepteur bek ne semble pas altérer par la mutation. Toutefois, nous avons constaté que le messager de 1,5 kb est moins exprimé dans les cerveaux mutants.

Le fait que pour la mutation jp, le niveau de messenger spécifiant le FGFa est plus faible peut être interprété par une réduction de la transcription et/ou par une réduction du nombre des cellules qui produisent le facteur. Les sites de synthèse du FGFa dans le cerveau n'ont pas été clairement identifiés. Seules des données immunohistologiques ont montré la présence de FGFaIR au niveau des neurones (Pettmann et coll., 1986 ; Huang et coll., 1987). Ferrara et coll. (1988) ont rapporté que le corps calleux présente un haut niveau de FGFa, suggérant que dans le SNC, les oligodendrocytes ainsi que les axones constituent une des sources de ce facteur. De plus, ces mêmes auteurs ont également montré que des cultures secondaires d'astrocytes contiennent du FGFa. Comme la mutation jimpy entraîne des anomalies du développement de l'oligodendrogliose, de l'astroglie et une dégénérescence neuronale, il est possible que la production putative de FGFa par ces types cellulaires soit secondairement affectée. D'ailleurs, il est clair que des déficits en facteurs trophiques existent pour la glie de souris jp. En effet, Bartlett et coll. (1987) ont montré que la survie de cultures d'oligodendrocytes jp est augmentée par la présence de milieux conditionnés provenant de cultures d'astrocytes normaux et que les facteurs (non identifiés) responsables de cette survie ne sont pas présents dans les milieux conditionnés par des astrocytes jp.

Il apparaît que la mutation jimpy se traduise par une élévation du niveau de FGFaIR ; il est possible donc, étant donné la diminution du niveau de transcrits du FGFa que ce facteur puisse, dans les cerveaux jp, ne pas être utilisé.

En ce qui concerne les récepteurs, l'analyse en "Northern blot" des messagers de bek a révélé que le transcrit de 1,5 Kb codant pour la partie extracellulaire de bek, est exprimé à un plus faible niveau dans les cerveaux jp. Bien que le rôle d'un récepteur des FGFs sans domaine kinase ne soit encore connu, nos résultats suggèrent que ce type de récepteur serait moins exprimé dans les cerveaux jp et qu'il pourrait en résulter de ce fait une modification des interactions FGFa/récepteur.

DISCUSSION GENERALE.

DISCUSSION GENERALE.

Un nombre grandissant de travaux réalisés pour la plupart *in vitro*, ont montré que les FGFs sont actifs sur la prolifération et la différenciation cellulaires de lignées issues du tissu nerveux, qu'ils sont neurotrophiques et angiogènes. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'*in vivo*, les FGFs pourraient agir sur le développement du SNC. Toutefois, ces études n'ont apporté que peu de précisions sur la véritable fonction de ces facteurs *in vivo* dans le tissu nerveux. Dans le but de clarifier cette situation, nous avons recherché la présence de FGFa et d'un récepteur putatif des FGFs à différents stades du développement du cerveau de souris ainsi que lors d'agression du SNC comme une lésion mécanique ou un déficit de myélinisation.

Le profil d'évolution des niveaux de messagers du FGFa et du FGFaIR dans le cerveau montre qu'il existe une régulation de la production du FGFa et suggère que le FGFa n'interviendrait que lors de certaines phases du développement.

Le développement embryonnaire du cerveau chez la souris est essentiellement caractérisé par la prolifération des précurseurs neuronaux (Korr, 1980). Bien qu'il ait été démontré *in vitro* que les FGFs sont actifs sur la prolifération de ces cellules (Gensburger, 1987), la situation que nous observons, à savoir : absence de niveau détectable de messagers du FGFa et un très faible niveau de FGFaIR dans les cerveaux embryonnaires, n'est pas en faveur d'une stimulation de la prolifération des neuroblastes par le FGFa. Néanmoins, nous ne pouvons écarter la possibilité que localement, de hauts niveaux de FGFa soient produits et agissent sur un nombre limité de cellules.

Après la naissance, l'apparition de niveaux très significatifs de messagers du FGFa et de FGFaIR suggère la possibilité d'une intervention

de ce facteur sur le développement postnatal du cerveau. Les deux premières semaines suivant la naissance concernent la prolifération de la glie astrocytaire puis oligodendrocytaire (Korr, 1980 ; Jacobson, 1978). Compte tenu du rôle *in vitro* des FGFs sur la prolifération des astroblastes et des oligodendroblastes, un contrôle de la gliogenèse *in vivo* par le FGFa est envisageable. En outre, les cellules endothéliales du SNC présentent à P7 chez la souris, une activité mitotique intense (Robertson et coll., 1985), qui pourrait être aussi sous la dépendance du FGFa. Toutefois, comme le pic d'activité mitotique des cellules endothéliales ne coïncide pas avec le niveau maximum de FGFa, nous ne pensons pas que le rôle primordial du FGFa dans le cerveau concerne l'angiogenèse.

Le fait le plus marquant de l'évolution du FGFa dans le cerveau est l'augmentation rapide du taux de ce facteur entre P11 et P14 et l'augmentation correspondante de ses transcrits. Cette observation suggère un rôle important pour le FGFa dans la maturation du cerveau à partir de P14. Il est intéressant de noter qu'entre P11 et P14 correspond une période où l'on observe chez la souris l'ouverture des paupières, la différenciation terminale des photorécepteurs et de l'organe de Corti (Theiler, 1972). Cette "mise en service" de récepteurs sensoriels va être suivie d'une période d'apprentissage durant laquelle de nouvelles connexions nerveuses vont être élaborées. La présence de facteurs neurotrophiques est vraisemblablement nécessaire pendant cette période pour stimuler la poussée de neurites et la formation de nouvelles synapses. A cet égard, nous avons constaté que l'évolution du FGFa et de ses transcrits est similaire en amplitude et dans le temps à celle observée pour le NGF pour certaines zones du cerveau de rat (Auburger et coll., 1987 ; Large et coll., 1986). Il est donc raisonnable d'envisager pour le FGFa, compte tenu de son activité neurotrophique reconnue *in vitro* et par analogie avec le NGF, un rôle neurotrophique naturel *in vivo*. Une

fonction neurotrophique du FGFa dans le SNC pourrait expliquer en outre le maintien d'un haut niveau de transcription de ce facteur dans le cerveau adulte, car on sait que la présence continue de facteurs neurotrophiques est nécessaire au maintien des neurones. Le FGFa peut également agir sur la maintenance d'autres types cellulaires en particulier les astrocytes, pour lesquelles ce facteur stimule *in vitro* l'acquisition d'un phénotype différencié. De plus, il pourrait exister un lien entre la maturation des oligodendrocytes et la production de FGFa, compte tenu de l'apparition de niveau élevé de FGFaIR au début de la phase de myélinisation. Enfin, certains résultats obtenus *in vitro* sur des cultures cellulaires ont fait apparaître que la nature de la réponse induite par les FGFs (prolifération, migration et différenciation), dépendent de la concentration de FGF présent dans le milieu de culture (McAvoy et Chamberlain, 1989). Il faut donc envisager qu'*in vivo* également, les variations de niveaux de FGFa permettraient à ce facteur d'être actif au cours du développement à la fois sur la prolifération, la migration et la différenciation de certains types cellulaires.

En ce qui concerne l'expression des messagers de bek, forme putative du récepteur des FGFs, nous avons constaté que le transcrit de 4,5 Kb est exprimé à un haut niveau suggérant que les récepteurs des FGFs sont présents à tous les stades que nous avons étudiés. Le messager de 1,5 Kb de bek, que nous avons mis en évidence, apparaît plus tardivement, ce qui suggère une régulation différente de celle du transcrit de 4,5 Kb. Le rôle de ce transcrit particulier reste à découvrir. Son apparition tardive pourrait signifier qu'il est impliqué dans le contrôle de la fonction des FGFs lors des phases postnatales du développement du SNC. On peut envisager que ce contrôle concerne le FGFa étant donné la coïncidence d'apparition de leurs messagers. Dernièrement, l'expression des messagers de flg a été étudiée par hybridation *in situ* dans le SNC de

poulet, au cours du développement embryonnaire (Heuer et coll., 1990). Cette étude montre que les messagers de flg sont exprimés d'abord dans le neuroépithélium au moment de la phase de prolifération des neuroblastes puis plus tard, au niveau des populations neuronales pendant la période de maturation. Ces résultats ainsi que d'autres (Wanaka et coll., 1990), indiquent que la forme flg des récepteurs des FGFs est exprimée au niveau de certaines populations neuronales et suggèrent une action privilégiée des FGFs sur les neurones, notamment lors de la prolifération et de la maturation. Ils renforcent de plus, l'hypothèse selon laquelle les FGFs seraient des facteurs neurotrophiques. Néanmoins, le niveau significatif, bien que plus faible d'expression des messagers de flg au niveau de la glie observé par ces mêmes auteurs, suggère également qu'*in vivo* les FGFs ont une action sur les cellules gliales.

Le profil particulier de l'évolution du FGFa et de ses messagers que nous avons mis en évidence dans ce travail, soulève le problème de la disponibilité de ce facteur dans le tissu nerveux. En particulier, le mécanisme d'excrétion des FGFs demeure inconnu. Les FGFs sont des molécules extracellulaires dont l'action est médiée au niveau de récepteurs membranaire, mais dont l'ADNc est dépourvu de séquence signal permettant leur excrétion. C'est pourquoi certains auteurs ont proposé que la libération des FGFs pourrait se faire à l'occasion de la mort cellulaire. Nous pensons que si ce mode de libération peut effectivement survenir lors de la lésion tissulaire, il est vraisemblable qu'il ne puisse suffire au développement normal du cerveau. La mort cellulaire, bien qu'étant un phénomène normal au cours du développement du SNC, n'en demeure pas moins globalement limitée. Il faut donc envisager d'autres modes de libération plus subtils des FGFs. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le transport des FGFs de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule se ferait sous la forme d'une association avec des protéohéparanes

sulfates membranaires (revue Courtois, 1990). De plus, la grande avidité des FGFs pour l'héparine et les héparanes sulfates, suggère que la disponibilité des facteurs serait contrôlée par la matrice extracellulaire ; ce qui implique également l'existence de mécanismes de libération des FGFs stockés dans ces matrices.

Les résultats que nous avons obtenus en ce qui concerne la lésion mécanique du cerveau, n'ont pas révélé de variation des niveaux de messagers du FGFa et de bek. Toutefois, nous ne pouvons écarter que localement ces niveaux soient modifiés avec une amplitude non détectable pour notre technique. L'hybridation *in situ* pourrait à cet égard, fournir des éléments de réponse. Par contre, nous avons constaté que la lésion mécanique provoque une diminution sensible du taux global de FGFaIR extrait des cerveaux. Encore une fois, il est possible que localement cette situation soit différente. Quoi qu'il en soit, il apparait difficile dans l'état actuel de nos connaissances, de proposer un mécanisme autre qu'une augmentation du taux de dégradation et/ou de consommation du FGFa pour expliquer cette diminution.

La mutation jimpy qui provoque une souffrance aiguë et généralisée du SNC, entraîne des modifications au niveau du FGFa et de son récepteur putatif qui se traduisent par une élévation du taux de FGFaIR, une diminution des niveaux d'ARNm du FGFa. et de l'ARNm de 1,5 Kb de bek. Ces résultats nous ont conduits à envisager une diminution de la consommation du FGFa dans le cerveau des individus jp.et/ou une modification de la production de FGFa.

Les résultats que nous avons donc obtenus pour la lésion mécanique et la mutation jimpy, ne permettent pas de proposer une explication commune pour ces deux situations différentes.

Notre travail a fait apparaître que la présence de FGFa dans le cerveau est régulée au cours du développement et que ce facteur pourrait être impliqué dans le contrôle des phases tardives de la maturation du SNC. Il conviendra maintenant d'apporter des précisions quant à cette régulation au niveau des différentes zones du cerveau. Il sera utile également de compléter les données d'immunolocalisation du FGFa, par la détermination précise des sites de synthèse de ce facteur par hybridation *in situ*. En effet, la localisation apparemment neuronale de ce facteur, n'implique pas forcément que le FGFa est produit par les neurones, mais qu'il pourrait compte tenu de son activité neurotrophique, avoir été transporté de manière rétrograde jusqu'au péricaryon. L'élaboration récente de sondes immunologiques et moléculaires spécifiant les récepteurs des FGFs, permettra de déterminer les cellules cibles des FGFs dans le tissu nerveux. En outre, il conviendra de préciser si les différents types de récepteurs (flg et bek), sont portés par les mêmes types cellulaires, et si la réponse qu'induit la fixation des FGFs à leur niveau, est de même nature. De plus, l'existence d'un niveau élevé de messagers codant pour bek, récepteur putatif des FGFs, dans les cerveaux embryonnaires alors que le niveau de FGFa est très faible, permet d'envisager que d'autres membres de la famille des FGFs pourraient prendre part au contrôle des phases précoces du développement du système nerveux. Nous avons montré que les ARNm du FGFb sont présents dans le cerveau de souris dès E14. Les messagers de FGF-5 et d'Int-2 sont exprimés eux aussi pendant cette période dans le SNC. Il serait intéressant de savoir si les autres oncogènes de la famille des FGFs sont également exprimés au cours du développement du SNC et s'ils partagent les mêmes récepteurs. Enfin, l'étude de modèles de développements anormaux du SNC provoqués par certaines mutations,

pourrait apporter des renseignements nouveaux sur les interactions trophiques existant entre les différents types cellulaires du tissu nerveux.

ANNEXE TECHNIQUE.

ANNEXE TECHNIQUE

Produits et tampons concernant le dosage et la détection du FGFa.

PBS : Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant 135 mM NaCl et 15 mM KCl.

Tampon de broyage: Tris-HCl 10 mM ; NaCl 2 M pH 7,4; EDTA 1mM ; EGTA 1 mM; PMSF (Sigma) 0,2 mM ; aprotinine (Sigma) 20 KIU/ml ; leupeptine (Sigma) 1 mg/ml ; pepstatine (Sigma) 1mg/ml.

Tampon d'équilibration : Tris/HCl 10 mM pH 7,4 ; 0,65 M NaCl

Tampon de lavage EIA : Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant 0,05 % de Tween 20.

Tampon EIA : Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 contenant 0,4 M NaCl, 1mM EDTA, 0,1 % ASB ; 0,01 % NaN₃.

Tampon d'échantillon. (Electrophorèse des protéines):
Solution stock I : Tris-HCl 2,0M pH8,8, 5 ml ; bleu de bromophénol 0,1%, 10 ml ; Glycérol, 60 ml; eau Mq qsp 100 ml
Solution stock II : SDS 20%, 900 µl ; DTT 0,5M, 100 µl. Le tampon de dénaturation est obtenu en mélangeant 800 µl de la solution I et 200 µl de solution II.

Gel d'acrylamide 15 % (Electrophorèse des protéines):
Acrylamide/bisacrylamide (BDH) 30%/0,8%, 20 ml, Tris-HCl 2,0 M

pH8,8, 8 ml ; TEMED (Merck), 20 μ l ; SDS 20%, 100 μ l ; persulfate d'ammonium (Merck) 10%, 90 μ l ; eau Milli Q, qsp 40 ml.

Gel de concentration (Electrophorèse des protéines):

Acrylamide/bisacrylamide (BDH) 30%/0,8%, 8 ml ; Tris-HCl 0,5M pH6,8, 7ml ; TEMED, 25 μ l ; SDS 20%, 125 μ l ; persulfate d'ammonium 10 %, 125 μ l.

Tampon de migration (Electrophorèse des protéines):

Glycine (Merck), 28,8 g/l ; Tris base (Sigma), 6 g/l ; SDS 20 %, 5 ml/l.

Tampon de transfert ("Western blot"): Pour 3 litres de

tampon : Trizma base (Sigma), 9g, pH 8,3 ; glycine (Merck), 43g ; Méthanol, 10 % ; SDS, 0,3 g.

Produits et tampons concernant la détection des ARNm.

Purification des ARN.

Tampon guanidinium: Guanidine thiocyanate (Fluka) 4,7M ; AcONa 0,02M ; Sarcosinate de sodium (Sigma) 0,5% ; Tris-HCl 50mM pH7,4 ; β mercaptoéthanol 100mM; eau Mq. Dissoudre le thiocyanate de guanidinium dans l'eau sur un agitateur chauffant. Filtrer 0,22 μ m et stocker à -20°C à l'abri de la lumière.

Solution de chlorure de césium: CsCl 5,7M ; AcONa 250mM
pH 7,5

Tampon TE: Tris/Hcl 10 mM pH 7; 1 mM EDTA

Electrophorèse et transfert des ARN (Northern blot).

Tampon de dénaturation des ARN: pour 50 μ l : Formamide (Fluka) (désionisée) 25 μ l ; Formaldéhyde (désionisé) 8 μ l ; MOPS 10X 5 μ l ; H₂O 12 μ l.

Bleu de charge: TBE 1X ; 5 % Ficoll, 0,02g/l de bleu de bromophénol.

MOPS 10X pH 7: 0,2 M MOPS (Sigma) ; AcoNa 50mM pH7; EDTA 10mM.

Gel d'agarose/Formaldéhyde/MOPS: Agarose 3,3g ; H₂O 109 ml ; MOPS 10X 15 ml ; Formaldéhyde, préalablement désionosée avant emploi sur résine échangeuse d'ions (Analytical mixed bed resin Biorad) 25 ml.

Tampon de transfert SSC 20X: citrate trisodique 0,3M ; NaCl 3M

Hybridation.

Tampon de préhybridation et d'hybridation: (pour la recherche des clones positifs) formamide (Fluka) 50 % ; polyvynilpirolidone 0,1 % ; Ficoll 400 0,1% ; SAB 0,1% ; Hepes 0,05M pH6,8; SSC 3X ; 100 μ g/ml d'ADN de thymus de veau simple brin préparé en dissolvant de l'ADN (Sigma) dans de l'eau distillée, et en le dénaturant, après sonication, par chauffage à 100°C pendant 10 mn.

Tampon de préhybridation et d'hybridation pour "blot" et sondes ARN: (selon protocole "Amersham") SSPE 20x, 5ml ; Formamide 20ml ; polyvynilpirolidone 0,1 % ; Ficoll 400 0,1% ; ASB 0,1% ; SDS 10%, 0,4ml ; ARNt de Coli dénaturé 0,8mg ; eau Milli Q qsp 40 ml.

SSPE 20x: NaCl 3,6 M ; Phosphate de sodium pH 7,7 ; EDTA 0,02 M.

Tampon de préhybridation et d'hybridation pour "Northern blot" et utilisation des sondes ADN (Selon protocole "Amersham") : SSC 20x, 7,5 ml ; polyvynilpirolidone 0,1 % ; Ficoll 400 0,1% ; ASB 0,1%ml ; 0,5% SDS ; eau Milli Q qsp 25 ml ; ADN de thymus de veau, 100 µg/ml.

Préparation des plasmides et transfection bactérienne.

Milieu de culture LB: milieu LB (Luria Broth) bacto-tryptone (Difco) 10g/l, extrait de levure (Difco) 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH ajusté à 7,4 avec NaOH, stérilisé à 120 °C pendant 45 mn. Avant emploi complété avec 50 µg/ml de thymidine et d'acide diaminopymélique.

Milieu LB gélosé : Milieu LB ajusté à 1,2 % de bacto-agar (Difco) avant autoclavage.

Tampon GTE: Tris-HCl 50 mM pH8, saccharose 25 % (P/V).

Tampon KAc. : Acétate de potassium, 3 M ; acide acétique, 2 M ; pH 5.

Tampon STE 1X: Tris-HCl 10 mM pH7, NaCl 100mM, EDTA 1mM.

Tampon borate 10x: Acide borique 900mM ; Tris-HCl 1M pH8,3 ; EDTA 25mM

Tampon d'électrophorèse TEA 1X: préparé à partir d'une solution TEA 200 X : Tris-HCl 2 M pH 8,15 ; NaCl 1M ; EDTA 50mM

Tampon de ligation 1X: obtenu par dilution d'un tampon 10x:Tris-HCl 200mM pH 7,9 ; MgCl₂ 100mM, ATP 1mM, 100 mM β-mercaptoéthanol.

Tampon FTB: RbCl 100 mM, MgCl₂ 40 mM, CaCl₂ 50 mM, HaCoCl₃ 30 mM. Le milieu est filtré et stocké à +4 °c à l'abri de la lumière.

Tampon de dénaturation: soude 0,5M, NaCl 1,5M.

Tampon de neutralisation: Tris-HCl 0,5M pH7, NaCl 1,5M.

Préparation des sondes ARN et ADN.

Tampon de transcription 5X: (provient du kit commercial Riboprobe Gemini system II, Promega Biotec) Tris-HCl 200mM pH 7,4; MgCl₂ 30 mM; spermidine 10mM.

Phénol: le phénol cristallisé (Merck) est saturé par 100ml d'eau, 40ml d'AcONa 500mM pH6 ; On ajoute au mélange 1g d'hydroxyquinoleine.

Chloroforme/Alcool isoamylique: le chloroforme (Merck) est dilué dans un rapport 24:1 avec l'alcool isoamylique (Merck).

Gel d'acrylamide 4% pour la caractérisation des sondes ARN: 4 ml d'acrylamide 40% (38g mono, 2g bis) ; 4ml de TBE 10X ; 31,6 ml d'H₂O ; 400 µl de persulfate d'ammonium 10% ; 27 µl de TEMED.

Tampon TEN: Tris/HCl 20 mM pH 7,6 ; EDTA 10 mM ; NaCl 100 mM.

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.
- Aebischer, P., Salessiotis, A. N. and Winn, S. R. (1989). Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. *J. Neurosci. Res.*, **23**: 282-289.
- Alterio, J., Courtois, Y., Robelin, J., Bechet, D. and Martelly, I. (1990). Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are expressed by skeletal muscle satellite cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**: 1205-1212.
- Anderson, K. J., Dam, D., Lee, S. and Cotman, C.W. (1988). Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons *in vivo*. *Nature, London.*, **332**: 360-361.
- Aono, H. and Ide, H. (1988). A gradient of responsiveness to the growth-promoting activity of ZPA (zone of polarizing activity) in the chick embryo limb bud. *Dev. Biol.*, **128**, 136-141.
- Auburger, G., Heumann, R., Hellweg, R., Korsching, S. and Thoenen, H. (1987). Developmental changes of nerve growth factor and its mRNA in the rat hippocampus : comparison with choline acetyltransferase. *Dev. Biol.*, **120**: 322-328.
- Baird, A., Esch, F., Gospodarowicz, D. and Guillemin, R. (1985a). 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., Esch, F., Ling, N. and Gospodarowicz, D. (1985b). Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. *Regul. Pept.*, **12**: 201-213.
- Baird, A., Culler, F., Jones, K.L. and Guillemin, R. (1985c). Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet*, **2**: 563.
- Baird, A., Mormede, P., Ying, S.Y., Wehrenberg, W.B., Ueno, N., Ling, N. and Guillemin, R. (1985d). A non-mitogenic pituitary function of fibroblast growth factor : regulation of thyrotropin and prolactin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** :5545-5549
- 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 Böhlen, P. Fibroblast Growth factors. In handbook of experimental pharmacology. Peptide growth factor and their

- receptors. Vol 95 I. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (Eds). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. PP 369-418.
- Barotte, C., Eclander, F., Ebel, A., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. and Will, B. (1989). Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on choline acetyl transferase activity and astroglial reaction in adult rats after partial fimbria transection. *Neurosci. Letters*, **101**: 197-202.
- Bartlett, W.P., Knapp, P.E. and Skoff, R.P. (1987). Medium conditioned by normal brain cells rescues jimpy oligodendrocytes in vitro. *J Neurochem.*, **48**: s43.
- 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 heparanase and heparin-like molecules. *Biochemistry*, **28**: 1737-1743.
- Bellvé, A.P. and Feig, L.A. (1984). Cell proliferation in the mammalian testis: biology of the seminiferous growth factor (SGF). *Recent Prog. Horm. Res.*, **40**: 531-567.
- Besnard, F., Lawrence, D., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G. (1989). Modulation, par le transforming growth factor (TGF β) de l'effet mitogène du fibroblast growth factor (FGF) sur les oligodendrocytes de rat en culture. *C. R. Acad. SCI. Paris*, t **308**, série III: 287-292.
- Besnard, F., Perraud, F., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G. (1989). Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on proliferation and maturation of cultured rat oligodendrocytes. *Int. J. Devl. Neuroscience*, **7**: 401-409.
- Billings-Gagliardi, S. and Adcock, L.H. (1981). Hypomyelinated mutant mice IV: Peripheral myelin in *jpmsd*. *Brain Res.*, **225**: 309-317.
- Blottner, D., Westermann, R., Grothe, C., Böhlen, P. and Unsicker, K. (1989). Basic fibroblast growth factor in the adrenal gland : possible trophic role for preganglionic neurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, **1**: 471-478.
- Blottner, D. and Unsicker, K. (1990). Maintenance of intermediolateral spinal cord neurons by fibroblast growth factor administrated to the medullectomized rat adrenal gland : dependence on intact adrenal innervation and cellular organization of implants. *Eur. J. Neurosci.*, **2**: 378-382.
- 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.
- Böhlen, P., Baird, A., Esch, F., Ling, N. and Gospodarowicz, D. (1984). Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5364-5368
- 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*)
- 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
- Burgess, W. H., Mehlman, T., Friesel, R., Johnson, W. V. and Maciag, T. (1985). Multiple forms of endothelial cell growth factor. Rapid isolation and 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.
- Caday, C.G., Klagsbrun, M., Fanning, P.J., Mirzabegian, A. and Finkelstein, S.P. (1990). Fibroblast growth factor (FGF) levels in the developing rat brain. *Dev. Brain Res.*, **52**: 241-246.
- Caruelle, D., Grassi, J., Courty, J., Groux, B., Barritault, D. and Caruelle, J.P. (1988). Development and testing of radio and enzyme immunoassays for acidic fibroblast growth factor (aFGF). *Anal. Biochem.*, **173**: 117-128.
- Caruelle, D., Groux-Muscattelli, B., Gaudric, A., Sestier, C., Coscas, G., Caruelle, J.-P. and Barritault, D. (1989). Immunological study of acidic fibroblast growth factor (aFGF) distribution in the eye. *J. Cell. Biochem.*, **29**: 117-128.
- Cavanagh, J.B. (1970). The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J. Anat.*, **106**: 471-487.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R. J. and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294-5298.
- Chiu, I.M., Wang, W.P. and Lehtoma, K. (1990). Alternative splicing generates two forms of mRNA coding for human heparin-binding growth factor 1. *Oncogene*, **5**: 755-762.
- Chodak, G.W., Shing, Y., Borge, M., Judge, S.M. and Klagsbrun, M. (1986). Presence of heparin-binding growth factor in mouse bladder tumors and urine from mice with bladder cancer. *Cancer Res.*, **46**: 5507-5510.
- Chodak, G.W., Hospelhorn, V., Judge, S.M., Mayforth, R., Koeppen, H. and Sasse, J. (1988). Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney carcinoma. *Cancer Res.*, **48**: 2083-2088.
- Chua, C.C., Barritault, D., Geiman, D.E. and Ladda, R.L. (1987). Induction and suppression of type I collagenase in cultured human cells. *Coll. Relat. Res.*, **7**: 277-284.

- Conn, G. and 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
- 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.
- Courtin, F., Gavaret, J.M., Toru-Delbauffe, D. and Pierre, M. (1990). Induction of 5-deiodinase activity in rat astroglial cells by acidic fibroblast growth factor. *Dev. Brain Res.*, **53**: 237-242
- Courty, J., Chevallier, B., Moenner, M., Loret, C., Lagente, O., Böhlen, P., Courtois, Y. and Barritault, D. (1985). Evidence for FGF-like growth factor in adult bovine retina : analogies with EDGF 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**: 102-108.
- 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.
- 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.
- Courtois, Y. (1990). Fibroblast growth factor and Herpes simplex virus receptor. *Médecine et Sciences*, **6**: 674-679.
- Cox, K.H., DeLeon, D.V., Angerer, L.M. and Angerer R.C. (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryo by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.*, **101**, 485-502.
- Crumley, G.R., Dionne, C.A and Jaye, M. (1989). The gene for human acidic fibroblast growth factor encodes two upstream exons alternatively spliced to the first coding exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**: 7-13.
- Crumley, G.R., Howk, R., Ravera, M.W. and Jaye, M. (1990). Multiple polyadenylation sites downstream from the human aFGF gene encoding acidic fibroblast growth factor. *Gene*, **85**: 489-497.
- Cuevas, P., Burgos, J. and Baird, A. (1988). Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**: 611-618.
- Cuny, R., Jeanny, J.C. and Courtois, Y. (1986). Lens regeneration from cultured newt irises stimulated by retina-derived growth factors. *Differentiation*, **32**: 221-229.
- D'Amore, P. and Klagsbrun, M. (1984). Endothelial cell mitogens derived from retina and hypothalamus : biochemical and biological similarities. *J. Cell. Biol.*, **99**: 1545-1549.
- Damon, D.H., D'Amore P.A. and Wagner J.A. (1990). Nerve growth factor and fibroblast growth factor regulate neurite outgrowth and

- gene expression in PC12 cells via both protein kinase C and AMP-cyclic independent mechanisms. *J. Cell. Biol.*, **110**: 1333-1339.
- Danielsen, N., Pettmann, B., Vahlsing, H. L., Manthorpe, N. and Varon, S. (1988). Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicon chamber model. *J. Neurosci. Res.*, **20**: 320-330.
- Davis, J.B. and Stroobant, P. (1990). Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.*, **110**: 1353-1360.
- Delaunoy, J.P., Langui, D., Ghangour, S., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. (1988). Influence of basic fibroblast growth factor on carbonic anhydrase expression by rat glial cells in primary culture. *Int. J. Devl. Neuroscience*, **6**: 129-136.
- 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.
- de Webster, H., Reier, P.J., Matthieu, J.M. and Quarles, R.H. (1976). Axonal abnormalities in optic nerves of jimpy mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **35**: 309.
- Dickson, C. and Peters, G. (1987). Potential oncogene product related to growth factors. *Nature*, **326**: 833-835.
- 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**.
- Dreyer, D., Lagrange, A., Grothe, C. and Unsicker, K. (1988). Basic fibroblast growth factor prevents ontogenetic neuron death *in vivo*. *Neurosci. Lett.*, **99**: 35-38.
- DuBois, M., Bowman, P.D. and Goldstein, G.W. (1985a). Cell proliferation after ischemic injury. *Cell. Tiss. Res.*, **242**, 17-23.
- DuBois, M., Bowman, P.D. and Goldstein, G.W. (1985b). Cell proliferation after ischemic infarction in gerbil brain. *Brain Research*, **242**: 245-252.
- Eccleston, P. A. and Silberberg, D. H., (1985). Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes *in vitro*. *Dev. Brain. Res.*, **21**: 315-318.
- Eclancher, F., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. Reactive astrogliosis after basic fibroblast growth factor (bFGF) injection in the injured neonatal brain. European conference on tissue and post-traumatic regeneration. Geneva, 1990.
- Emoto, N., Gonzalez, A.M., Walicke, P.A., Wada, E., Simmons, D.M., Shimasaki, S. and Baird, A. (1990). Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system : Identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. *Growth Factors*, **2**: 21-29.

- 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.
- Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumara, D., Matthes, M.T. and LaVail, M.M. (1990). Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature*, **347**: 83-86.
- Fayein, N.A., Courtois, Y. and Jeanny, J.C. (1990). Ontogeny of basic fibroblast growth factor binding sites in mouse ocular tissues. *Exp. Cell Res.*, **188**: 75-88.
- 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., Ousley, F. and Gospodarowicz, D. (1988). Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotropic and angiogenic mitogen. *Brain Res.*, **462**: 223-232.
- Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G., Mitchell, R. and Gospodarowicz, D. (1987). Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5773-5777.
- Ferrari, G., Minozzi, M.-C., Toffano, G., Leon, A. and Sakper, S. (1989). Basic fibroblast growth factor promotes the survival and the development of mesencephalic neurons in culture. *Dev. Biol.*, **133**: 140-147.
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D. and Aaronson, S.A. (1989). Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector on epithelial cell growth. *Science*, **245**: 752-755.
- Finklestein, S.P., Apostolides, P.J., Caday, C.G., Prosser, J., Philips, M.F. and Klagsbrun, M. (1988). Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Res.*, **460**: 253-259.
- 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., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M.G., Ingber, D. and Vlodavsky, I. (1988). A heparin-binding angiogenic protein basic fibroblast growth factor is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.*, **130**: 393-400

- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, **235**: 442-447.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Sabrouy, S., Dani, C., Jeanteur, P. and Blanchard, J.M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. *Nucl. Acid.Res.*, **13**: 1431-1442.
- Fredj-Reygrobelle, D., Plouët, J., Delayre, T., Baudoin, C., Bourtet, F. and Lapalus, P. (1987). Effect of aFGF and bFGF on wound healing in rabbit corneas. *Cur. Eye Res.*, **6**: 1025-1029.
- 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.
- Gautschi, P., Frater-Schroeder, M., Müller, T. and Böhlen, P. (1986). 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., 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.
- Gautschi-Sova, P., Müller, T. and Böhlen, P. (1986). Amino acid sequence of human acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**: 874-880.
- Gavaret, J.M., Matricon, C., Pomerance, M., Jacquemin, C., Toru-Delbauffe, D. and Pierre, M. (1989). Activation of S6 kinase in astroglial cells by FGFa and FGFb. *Dev. Brain Res.*, **45**: 77-82.
- Gensburger, C., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. (1987). Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells *in vitro*. *FEBS Lett.*, **217**: 1-5.
- Gillespie, L.L., Paterno, G.D. and Slack, J.M.W. (1989). Analysis of competence : receptors for fibroblast growth factor in early *Xenopus* embryo. *Development*, **106**: 203-208.
- 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.
- 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.

- Gonzalez, A.M., Buscaglia, M., Onk, 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., Cheng, J., Lui, G.M., Baird, A. and Böhlen, P. (1984). 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., 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., Vlodavsky, I., Savion, N. and Tauber, J.P. (1980). Control of the proliferation and differentiation of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor. In: *Blood Peptides: integrators of cell and tissue function*. Raven, New York, pp 1-37.
- 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., Baird, A., Cheng, J., Lui, G.M., Esch, F. and Böhlen, P. (1986). Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland : physicochemical and biological characterization. *Endocrinology*, **118**: 82-90.
- Gospodarowicz, D. and Cheng, J. (1986). 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 factor from bovine adrenal gland : physicochemical and biological characterization. *Endocrinology*, **118**: 82-90.
- Gospodarowicz, D. and Ferrara, N. (1988). The control of cell growth and differentiation by fibroblast growth factor. Neuronal plasticity and trophic factors. Biggio, G., Spano, P.F., Toffano, G., Appel, S.H., Gessa, G.L. (Eds). Fidia research series, symposia in neuroscience VII. Liviana Press, Padova. pp 53-71.
- Gospodarowicz, D., Neufeld, G. and Schweigerer, L. (1987). Fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Endocrin.*, **46**: 187-204.
- Green J.B.A., Symes, H.K., Cooke, J. and Smith, J.C. (1990). The biological effects of XTC-MIF : quantitative comparison with *Xenopus* bFGF. *Development*, **108**: 173-183.

- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1982). PC12 Pheocromocytoma cultures in neurobiological researches. *Adv. Cell. Neurobiol.* **3**: 373-414.
- Grothe, C., Otto, D. and Unsicker, K. (1989). Basic fibroblast growth factor promotes in vitro survival and cholinergic development of rat septal neurons : comparison with the effect of nerve growth factor. *Neuroscience.*, **31**: 649-661.
- Groux-Muscatelli, B., Bassaglia, Y., Caruelle, J.P., Barritault, D. and Gautron, J. (1990). *Dev. Biol.* (sous presse)
- Gurney, M.E. . Peptide growth factors and the nervous system. In " Handbook of experimental pharmacology" In M. B. Sporn and A. B. Roberts (Eds.), *Vol. 95/II, Peptide growth factors and their receptors II*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, 1990, pp. 344-369.
- Halaban, R., Ghosh, S. and 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.
- Halperin, J.A., Lobb, R.R. (1987). Effect of heparin-binding growth factors on monovalent cation transport in Balb/C 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**: 115-122.
- Hamerman, D., Taylor, S., Kirschenbaum, I., Klagsbrun, M., Raines, E.W., Ross, R. and Thomas, K.A. (1987). Growth factors with heparin-binding affinity in human synovial fluid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **186**: 384-389.
- Hanai, K., Oomura, Y., Kai, Y., Nishikawa, K., Shimizu, N., Morita, H., and Plata-Salaman, C. (1989). Central action of acidic fibroblast growth factor in feeding regulation. *Am. J. Physiol.*, **256**: R217-R223.
- Harper, J.W. and Lobb, R.R. (1988). Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor : effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry*, **27**: 671-678.
- Hatten, M.E., Lynch, M., Rydel, R.E., Sanchez, J., Joseph-Silverstein, J., Moscatelli, D. and Rifkin, D.B. (1988). In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev. Biol.*, **125**, 280-289.
- Haub, O., Drucker, B. and Goldfarb, M. (1990). Expression of the murine fibroblast growth factor in the adult central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 8022-8026.
- 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, C. and Edwards, D. (1989). Expression of multiple heparin-binding growth factor species by murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Development*, **107**: 113-122.
- Hébert, J.M., Basilico, C., Goldfarb, M., Haub, O. and Martin, G.R. (1990). Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression pattern during embryogenesis. *Dev. Biol.*, **138**: 454-463.
- Hefti, F., Hartikka, J. and Knusel, B. (1989). Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, **10**: 515-533.
- Heuer, J.G., von Bartheld, C.S., Kinoshita, Y., Evers, P.C. and Bothwell, M. (1990). Alternative phases of FGF receptor and NGF receptor in the developing chicken nervous system. *Neuron*, **5**: 283-296.
- Heuman, R., Korshing, S., Scott, J. and Thoenen, H. (1983). Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J.*, **3**: 3183-3189.
- Hicks, D. and Courtois, Y. (1988). Acidic fibroblast growth factor stimulates opsin level photoreceptor cells in vitro. *FEBS Lett.*, **234**: 475-479.
- Hirano, A., Sax, D.S. and Zimmerman, H.M. (1969). The fine structure of the cerebella of jimpy mice and their normal littermates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **28**: 388-400.
- Hondermarck, H. (1990). Expression des sites de fixation spécifique des FGF acide et basique au cours du développement du cerveau de poulet. Thèse.
- 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.
- Huang, S.S. and Huang, J.S. (1986). Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **261**: 9568-9571.
- 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.
- Huff, K.R. and Schreier, W. (1990). Fibroblast growth factor inhibits epidermal growth factor-induced responses in rat astrocytes. *Glia*, **3**: 193-204.
- Hyl Dahl, L., Schofield, P.N., and Engström, W. (1990). Stimulatory effect of basic fibroblast growth factor on DNA synthesis in the human embryonic cornea. *Development*, **109**: 605-611.
- Iberg, N., Rogelt, S., Fanning, P. and Klagsbrun, M. (1989). Purification of 18- and 22 kDa forms of basic fibroblast growth factor from rat

- cells transformed by the ras oncogene. *J. Biol. Chem.*, **264**: 19951-19955.
- Imamura, T., Tokita, Y. and Mitsui, Y. (1988). Purification of basic FGF receptors from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**: 583-590.
- Jacobson, M., Developmental neurobiology. Plenum press, New York and London, 1978
- 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. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**: 78106-78110.
- James, R. and Bradshaw, R.A. (1984). Polypeptide growth factors. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 259-292.
- 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
- Jeanny, J.C., Fayein, N., Moenner, M., Chevallier, B., Barritault, D. and Courtois, Y. (1987). Specific fixation of bovine brain and retinal acidic and basic fibroblast growth factors to mouse embryonic eye basement membranes. *Exp. Eye Res.*, **171**: 63-75.
- Kalcheim, C. (1989). Basic fibroblast growth factor stimulates survival of nonneuronal cells developing from trunk neural crest. *Dev. Biol.*, **134**: 1-10.
- Kalcheim, C. and Neufeld, G. (1990). Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryo. *Development.*, **109**: 203-216.
- 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.
- Kato, Y. and 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.
- Kato, J.A. and Gospodarowicz, D. (1984). Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocytes cultures maintained in serum-free medium. *J. Cell. Physiol.*, **120**: 354-363.
- Kiefer, M.C., Stephans, J.C., Crawford, K., Okino, K. and Barr, P.J. Ligand affinity cloning and structure of a heparan sulfate proteoglycan receptor for fibroblast growth factor. *Science*, in press
- Kimmelman, 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.
- Kimmelman, 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.
- Klagsbrun, M. and Beckoff, M.C. (1980). Purification of cartilage-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, **255**: 10859-10866.
- Klagsbrun, M., Sasse, J., Sullivan, R. and 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. and Shing, Y. (1985). Heparin-binding affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 805-809.
- Knapp, P.E., Skoff, R.P. and Redstone, D.W. (1986). Oligodendroglial cell death in jimpy mice. An explanation for the myelin deficit. *J. Neurosci.*, **6**: 2813-2822.
- Kniss, D.A. and Burry, R.W. (1988). Serum and fibroblast growth factor stimulate quiescent astrocytes to re-enter the cell cycle. *Brain Research*, **439**: 281-288.
- Knusel, B., Michel, P.P., Schwaber, J.S. and Hefti, F. (1990). Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and three insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.*, **10**: 558-570.
- 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.
- Korr, H. Proliferation of different cell types in the brain, *Advances in anatomy, embryology and cell biology, Vol. 61*, Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1980.
- Krist, D.A. and Buttler, F.K. (1978). Neuronal abnormalities associated with impaired myelination during brain development: a golgi study of neocortex in the jimpy mouse. *Neurosci. Lett.*, **7** : 107-113.
- Labourdette, G., Janet, T., Laeng, P., Perraud, F., Lawrence, D. and Pettmann, B. (1990). Transforming growth factor type β 1 modulates the effects of basic fibroblast growth factor on growth and phenotypic expression of rat astroblasts in vitro. *J. Cell. Physiol.*, **144**: 473-484.
- Lachapelle, F., Lapie, P., Gansmuller, A., Villroya, H. and Gumpel, M. (1990). Patchy myelination pattern in the jimpy mouse brain : immunohistochemical study. *Glia*, **3**: 375-384.
- Large, T. H., Bodary, S. C., Clegg, D. O., Weskamp, G., Otten, U. and Reichardt, L. F. (1986). Nerve growth factor gene expression in the developing rat brain. *Science* , **234**: 352-354.

- Latzovits, L., Torday, C., Labourdette, G., Pettmann, B. and Sensenbrenner, M. (1988). Sodium and potassium uptake in primary cultures of proliferating rat astroglial cells induced by short-term exposure to an astroglial growth factor. *Neurochem. Res.*, **13**: 837-848.
- 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.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science.*, **237** : 1154-1162.
- Libermann, T.A., Friesel, R., Jaye, M., Lyall, R.M., Westermark, 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. and D'Amore, P.A. (1988). Acidic fibroblast growth factor enhances regeneration of processes by postnatal mammalian retinal ganglion cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2388-2392.
- Liu, L. and Nicoll, C.S. (1988). Evidence for a role of basic fibroblast growth factor in rat embryonic growth and differentiation. *Endocrinology*, **123**: 2027-2031
- Lobb, R. R., Harper, J. W. and Fett, J W. (1986). Purification of heparin-binding growth factors. *Anal. Biochem.*, **154**: 1-14.
- Lobb, R.R., Alderman, E.R. and Fett, J.W. (1985). Induction of angiogenesis by bovine brain-derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry*, **24**: 4969-4973
- 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., 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.
- Logan, A. (1988). Elevation of acidic fibroblast growth factor mRNA in lesioned rat brain. *Mol. Cell. Endocrin.*, **58**: 275-278.

- Loret, C., Laeng, P., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G. (1989). Acidic and basic fibroblast growth factors similarly regulate the rate biosynthesis of rat astroblast proteins. *FEBS Lett.*, **257**: 324-328.
- Loret, C., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G. (1989). Differential phenotypic expression induced in cultured rat astroblasts by acidic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8319-8327.
- 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 angiogenic activity. *Endocrinology*, **115**: 1672-1677.
- 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. Natl. 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.
- Mascarelli, F., Raulais, D., Counis, M.F. and Courtois, Y. (1987). Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 478-486
- Mattson, M.P., Murrain, M., Guthrie, P.B., and Kater, S.B. (1989). Fibroblast growth factor and glutamate : opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.*, **9**: 3728-3740.
- McAvoy, J. W. and Chamberlain C. G. (1989). Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development.*, **107**: 221-228.
- Meiers, C. and Bishoff, A. (1975). Oligodendroglial cell development in jimpy mice and control. An electronmicroscopy study in the optic nerve. *J. Neurol. Sci.*, **26**: 517-528.
- 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.
- Mergia, A., Tischer, E., Graves, D., Tumolo, A., Miller, J., Gospodarowicz, D., Abraham, J.A., Shipley, G. and Fiddes, J.C. (1989). Structural analysis of the gene for human acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 1121-1129.
- 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.
- Mitrani, E., Gruenbaum, Y. and Ziv, T. (1990). Fibroblast growth factor during mesoderm induction in the early chick embryo. *Development*, **109**: 387-393.
- Moenner, M., Badet, J., Chevallier, B., Tardieu, M., Courty, J. and Barritault, D. (1987). 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., 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.
- Montesano, R., Vassalli, 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.
- Moonen, G., Delree, P., Leprince, P., Rigo, J.M., Rogister, B. and Lefebvre, P.P. (1988). Developmental neurobiology and the physiopathology of brain injury. In: "Pharmacological approaches to the treatment of brain and spinal cord injury", Stein, D.G. and Sabel, B.A. Eds. Plenum publishing corporation, pp 259-280.
- Mormède, P., Baird, A. and Pidgeon, P. (1985). Immunoreactive fibroblast growth factor (FGF) in rat tissues : molecular weight forms and effects of hypophysectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**: 1108-1113.
- Morrison, R.S. and De Vellis, J. (1981). Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7205-7209.
- Morrison, R.S., De Vellis, J., Lee, Y.L., Bradshaw, R. and 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.
- Morrison, R.S., Gross, J.L. and Moskal, J.R. (1988). Inhibition of protein kinase C activity promotes the neurotrophic action of epidermal and basic fibroblast growth factors. *Brain Res.*, **473**: 141-146.

- Morrison, R. S., Sharma, A., De Vellis, J. and Bradshaw, R. A. (1986). Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **83**: 7537-7541.
- Morrison, R.S., Gross, J.L., Herblin, W.F., Reilly, T.M., LaSala, P.A., Alterman, R.L., Moskal, J.R., Kornblith, P.L. and Dexter, D.L. (1990). Basic fibroblast growth factor-like activity and receptors are expressed in a human glioma cell line. *Cancer Res.*, **50**: 2524-2529.
- Moscatelli, D. (1987). 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.
- Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J., Manejias, R. and Rifkin, D.B. (1987). 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., Presta, M., Joseph-Silverstein, J. and Rifkin, D.B. (1986). Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.*, **129**: 273-276.
- Motowo, N., Irimura, T. and Nicolson, G.L. (1988). Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.*, **36**: 157-167.
- Müller, G., Courty, J., Clerc, B. and Barritault, D. (1985). Utilisation du facteur de croissance dérivé de l'œil dans le traitement des ulcères de cornée. *J. Fr. Ophtalmol.*, **8**: 187-192.
- Müller, R., Bravo, R. and Burckhardt, J. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, **312**: 716-720.
- 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.
- Nave, K.A., Lai, C., Bloom, F. and Milner, R.J. (1987). A single nucleotide difference in the gene encoding for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in mouse. *J. Neurochem.*, **49**: 1873-1877.
- 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., Ferrara, N., Schweigerer, L., Mitchell, R. and Gospodarowicz, D. (1987a). Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*, **121**: 597-603.
- 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.
- Nieto-Sampedro, M., Lim, R., Hicklin, D.J. and Cotman, C.W. (1988). Early release of glia maturation factor and acidic fibroblast growth factor after brain injury. *Neurosci. Lett.*, **86**: 361-365.
- Nieto-Sampedro, M., Whittemore, S.R., Needels, D.L., Larson, J. and Cotman, C.W. (1984). The survival of brain transplants is enhanced by extracts from injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**: 6250-6254.
- Noji, S., Matsuo, T., Koyama, E., Yamaai, T., Nohno, T., Matsuo, N. and Taniguchi, S. (1990). Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**: 343-349.
- Olwin, B.B. and Hauschka, S.D. (1990). Fibroblast growth factor receptor levels decrease during chick embryogenesis. *J. Cell Biol.*, **110**: 503-509.
- 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.
- Omlin, F.X. and Anders, J.J. (1983). Abnormal cell relationships in jimpy mice. Electron microscopic and immunocytochemical findings. *J. Neurocytol.*, **12**: 767-784.
- Otto, D., Frotsher, M. and Unsicker, K. (1987). Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection. *J. Neurosci. Res.*, **22**: 83-91.
- Otto, D., Unsicker, K. and Grothe, C. (1987). Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.*, **83**: 156-160.
- Otto, D. and Unsicker, K. (1990). Basic FGF reverses chemical and morphological deficit in the nigrostriatal system of MPTP-treated mice. *J. Neurosci.*, **10**: 1912-1921.
- Panet, R., Amir, I., Atln, H. (1986). Fibroblast growth factor induces a transient net K⁺ influx carried by the bumetanide-sensitive transporter in quiescent BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta*, **859**: 117-121.
- Pasquale, E.B. (1990). A distinct family of embryonic protein-kinase receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 5812-5816.
- Pasquale, E.B. and Singer, S.J. (1989). Identification of a developmentally regulated protein kinase by using by using

- autophosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 5449-5453.
- 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. and 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.
- Perraud, F., Labourdette, G., Eclancher, F. and Sensenbrenner, M. (1990). Primary cultures of astrocytes from different brain areas of newborn rats and effects of basic fibroblast growth factor. *Dev. Neurosci.*, **12**: 11-21.
- Perraud, F., Labourdette, G., Miehle, M., Loret, C. and Sensenbrenner, M. (1988). Comparison of the morphological effects of acidic and basic fibroblast growth factors on rat astroblasts in culture. *J. Neurosci. Res.*, **20**: 1-11.
- Perraud, F., Besnard, F., Pettmann, B., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G. (1988). Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF and bFGF) on the proliferation and the glutamine synthetase expression of rat astroblasts in culture. *Glia*, **1**: 124-131.
- Petroutsos, G., Courty, J., Guimaraes, R., Pouliquen, Y., Barritault, D., Plouët, J. and Courtois, Y. (1984). Comparison of the effects of EGF, bFGF, and EDGF on corneal epithelium wound healing. *Curr. Eye Res.*, **3**: 593-598.
- 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.
- Pettmann, B., Weibel, M. and Sensenbrenner, M. (1985). Purification of two astroglial growth factors from bovine brain, *FEBS. Lett.*, **189**: 102-108.
- Phillips, R.J. (1954). Jimpy, a new totally sex-linked gene in the house mouse. *Z. Vererbungsl.*, **86**: 322.
- Plouët, J., Olivié, 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.
- Plouët, J., Mascarelli, F., Loret, M.D., Faure, J.P. and Courtois, Y. (1988). Regulation of eye-derived growth factor binding to membranes by light, ATP or GTP in photoreceptor outer segments. *EMBO J.*, **7**: 373-376.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 1836-1840.

- Paulus, W., Grothe, C., Sensenbrenner, M., Janet, T., Baur, I., Graf, M. and Roggendorf, W. (1990). Localization of basic fibroblast growth factor, a mitogen and angiogenic factor, in human brain tumor. *Acta Neuropathol.*, **79**: 418-423.
- Plata-Salaman, C. (1989). Growth factors, feeding regulation and the nervous system. *Life Sciences*, **45**: 1207-1217.
- 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., 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.
- 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.
- Posypanova, G.A., Severin, S.E. and Kondratyev, A.D. (1990). Effect of protein kinase modulators on the induction of morphological differentiation of pheocromocytoma PC12 cells by nerve and fibroblast growth factors. *Biotech. Appl. Biochem.*, **12**: 20-27.
- Rauvala, H. (1989). An 18-Kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factor. *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.
- Richardson, W.D., Pringel, N., Mosley, M.J., Westermarck, B. and DuBois-Dalcq, M. (1988). A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*, **53**: 309-319.
- Richman, J.M. and Crosby, Z. (1990). Differential growth of facial primordia in chick embryos : responses of facial mesenchyme to basic fibroblast growth factor (bFGF) and serum in micromass culture. *Development*, **109**: 341-348.
- Risau, W. (1986). Developing brain produces an angiogenesis factor. *Proc. Natl. Acad. USA*, **83**: 3855-3859.
- 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.
- Risau, W. and Ekblom, P. (1986). Production of a heparin-binding angiogenic factor by the embryonic kidney. *J. Cell Biol.*, **103**: 1101-1107.

- Robertson, P.L., Dubois, M., Bowman, P.D. and Goldstein, G.W. (1985). Angiogenesis in developing rat brain : an *in vivo* and *in vitro* study. *Dev. Brain Res.*, **23**: 219-223.
- Rogelj, S., Klagsbrun, M., Atzmon, 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.
- Rogelj, S., Weinberg, R.A., Fanning, P. and Klagsbrun, M. (1988). Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. *Nature*, **331**: 173-175.
- Rogister, B., Leprince, P., Pettmann, B., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. and Moonen, G. (1988). Brain basic fibroblast growth factor stimulates the release of plasminogen activators by new born rat cultured astroglial cell. *Neurosci. Lett.*, **91**: 321-326.
- Rosenfeld, J. and Friedrich, V.L. (1983). Axonal swelling in jimpy mice: does lack of myelin cause neuronal abnormalities? *Neuroscience*, **10**: 959-966.
- Ruta, M., Burgess, W., Givol, D., Epstein, J., Neiger, N., Kaplow, J., Crumley, G., Dionne, C., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1989). Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the *fms*-like gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **86**: 8722-8726.
- 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 kinase gene whose expression is modulated during endothelial cell differentiation. *Oncogene*, **3**: 9-15.
- Rydell, R.E and Greene, L.A. (1987). Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J. Neurosci.*, **7**: 3639-3653.
- Safran, A., Avivi, A., Orr-Urtreger, A., Neufeld, G., Lonai, P., Givol, D. and Yarden, Y. (1990). The murine *flg* gene encodes a receptor for fibroblast growth factor. *Oncogene*, **5**: 635-643.
- 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. and 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., Murphy, P.R., Sato, R. and Friesen, H.G. (1989). Fibroblast growth factor release by bovine endothelial cells and human astrocytoma cells in culture is density dependent. *Mol. Endocrinology*, **3**: 744-748.

- Saunders, J.W. and Gasseling, M.T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In "Epithelial-mesenchymal interactions". R. Fleishmajer & R.E. Billingham, Eds.), pp. 78-97. William and Wilkins, Baltimore.
- Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrel, S. and Bernfield, M. (1989). Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J. Cell. Biol.*, **108**: 1547-1756.
- Schreiber, A.B., Kenney, J., Kowalsky, W.J., Friesel, R., Mehlman, T. and Maciag, T. (1985). Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: characterization of receptor and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **82**: 6138-6142.
- Schubert, D., Ling, N. and Baird, A. (1987). Multiple influences of a heparin growth factor on neuronal development. *J. Cell Biol.*, **104**: 635-643.
- Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, F.C. and 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. and Gospodarowicz, D. (1987b). Basic fibroblast growth factor : production and growth stimulation in cultured adrenal cortex cells. *Endocrinology*, **120**: 796-800.
- Schweigerer, L., Neufeld, G. and Gospodarowicz, D. (1987c). Basic fibroblast growth factor as a growth inhibitor for cultured human tumor cells. *J. Clin. Invest.* **80**: 1516-1520.
- Seed, J. and Hauschka, S.D. (1988). Clonal analysis of vertebrate myogenesis. VIII. Fibroblast growth factor (FGF)-dependent and FGF independent muscle colony types during chick wing development. *Dev. Biol.*, **128**: 40-49.
- Seed, J., Olwin, B.B. and Hauschka, S.D. (1988). Fibroblast growth factor levels in the whole embryo and limb bud during chick development. *Dev. Biol.*, **128**: 50-57.
- 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.
- Sharma, A. and Dahlya, R. (1988). Bovine basic fibroblast growth factor: identification and binding of its receptor on PC12 cells. *Biomed. Biochim. Acta*, **47**: 975-983.
- Shimasaki, S., Emoto, N., Koba, A., Mercado, M., Shibata, F., Cooksey, K., Baird, A. and Ling, N. (1988). Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**: 717-723.
- 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.
- Siman, R.L., Dickie, M.M. and Appel, S.H. (1964). Mutant mice (quacking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. *Science*, **144**: 309-310.
- Sievers, J., Hausmann, B., Unsicker, K. and Berry, M. (1987). Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci. Lett.*, **76**: 157-162.
- Silverlight, J.J., Prysor-Jones, R.A. and Jenkins, J.S. (1990). Basic fibroblast growth factor in human pituitary tumours. *Clinical Endocrinology*, **32**: 669-676.
- Skoff, R.P. (1982). Increased proliferation of oligodendrocytes in the hypomyelinated mutant mouse jimpy. *Brain Res.*, **248**: 19-31.
- Skoff, R.P., Price, D.L. and Stocks, A. (1976). Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. II. Time of proliferation. *J. Comp. Neurol.*, **169**: 313-333.
- Slack, J.M.W., Darlington, B., Heath, H. and Godsave, S. (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature*, **326**: 197-200.
- Slack, J.M.W. and Isaacs, H.V. (1989). Presence of basic fibroblast growth factor in the early *Xenopus* embryo. *Development*, **105**: 147-153.
- Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*, **332**: 217-219.
- Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980). *N. Engl. J. Med.*, **303**: 878-880.
- 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.
- Sternfeld, M.D., Hendrickson, J.E., Keeble, W.W., Rosenbaum, J.T., Robertson, J.E., Pittelkow, M.R. and Shippley, G. (1988). Differential expression of mRNA coding for heparin-binding growth factor type 2 in human cells. *J. Cell. Physiol.*, **136**: 297-304.
- Schwab, M.E. (1977). Ultrastructural localization of a nerve growth factor-horseradish peroxydase (NGF-HRP) coupling product after retrograde axonal transport in adrenergic neurons. *Brain Res.*, **130**: 190-196.
- Stopa, E.G., Gonzalez, A.M., Chorsky, R., Corona, R.J., Alvarez, J., Bird, E.D. and Baird, A. (1990). Basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**: 690-696.

- Story, M.T., Esch, F., Shimasaki, S., Sasse, J., Jacobs S.C. and Lawson, R.K. (1987). Aminoterminal sequence of a large form of basic fibroblast from human benign prostatic hyperpalstic tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**: 702-709.
- Sullivan, R. and Klagsbrun, M. (1985). Purification of cartilage-derived growth factor by heparin affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, **260**: 2399-2401.
- Takahashi, J.A., Mori, H., Fukumoto, M., Igarashi, K., Jaye, M., Oda, Y., Kikuchi, H. and Hatanaka, M. (1990). Gene expression of fibroblast growth factor in human gliomas and meningiomas : demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5710-5714.
- 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.
- Terranova, V.P., DiFlorio, R., Lyall, R.M., Hie, S., Friesel, R. and Maciag, T. (1985). Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J. Cell. Biol.*, **101**: 2330-2334.
- Theiler, K. The house mouse. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1972.
- Thomas, D. Regulation de la production de FGFa au cours du développement du cerveau de l'embryon de poulet. DEA des Universités de Lille I et II. 1987.
- Thomas, K.A., Rios-Cadelore and 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. and Gimenez-Gallego, G. (1986). Fibroblast growth factors : broad spectrum mitogen with potent angiogenic activity. *Trends Biochem. Sci.*, **11**: 81-84.
- Thompson, J.A., Anderson, K.D., DiPietro, J.M., Zwiebel, J.A., Zametta, A., Anderson, W.F. and Maciag, T. (1988). Site-directed neovessel formation *in vivo*. *Science*, **241**: 1349-1352.
- Thompson, P., Desbordes, S.M., Girand, J., Pauliquen, J., Barritault, D. and Courtois, Y. (1982). The effect of an eye-derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration. *Exp. Eye. Res.*, **34**: 191-199.
- 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.

- Thornton, S., Mueller, S. and Levine, E. (1983). Human endothelial cells : use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science*, **222**: 623-625.
- Togari, A., Baker, D., Dickens, G. and Guroff, G. (1983). The neurite promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**: 1189-1193.
- 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., Hammamori, Y., Yamashita, T., Fukumoto, Y. and Takai, Y. (1986). Involvement of three intracellular messenger systems, protein kinase C, calcium ion and cyclic AMP, in the regulation of c-fos gene. *FEBS Lett.*, **208**: 39-42.
- Tsuda, T., Kaibuchi, K., Kawahara, Y., Fukuzaki, H. and Takai, T. (1985). Induction of protein kinase C activation and Ca^{2+} 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
- Unsicker, K., Reichert-Preibsch, H., Schmidt, R., Pettmann, B., Labourdette, G. and 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.
- Vaca, K., Stewart, S. S. and Appel, S., H. (1989). Identification of basic fibroblast growth factor as cholinergic growth factor from human muscle. *J. Neurosci. Res.*, **23**: 55-63.
- Vallés, A. M., Boyer, B., Badet, J., Tucker, G. C., Barritault, D. and Thiery J.-P. (1990). Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 1124-1128.
- Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J. and Klagsbrun, M. (1987). Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor : synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2292-2296
- Wagner, J.A. 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. and 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. (1988). Basic and acidic growth fibroblast growth factors have trophic effects on neuron from multiple CNS regions. *Exp. Neurol.*, **102**: 144-148.
- Walicke, P. A. (1988). Interactions between basic fibroblast growth factor (FGFG) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Developmental Neurobiology*, **102**: 144-148.
- Walicke, P., Cowan, W. M., Ueno, N., Baird, A. and 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. and Baird, A. (1988). Neurotrophic effects of basic and acidic fibroblast growth factors are not mediated through glial cells. *Dev. Brain Res.*, **40**: 71-79.
- Walicke, P.A. and Baird, A. (1988). Trophic effects of fibroblast growth factor on neural tissue. *Progress in brain research*, **78**: 333-338.
- 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. (1989). 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.
- Weibel, M., Pettmann, B., Labourdette, G., Mische, M., Bock, E. and Sensenbrenner, M. (1985). Morphological and biochemical maturation of rat astroglial cells grown in a chemically defined medium : influence of an astroglial growth factor. *Int. J. Devl. Neuriscience*, **3**: 617-630.
- Weiner, H. and Swain, J.L. (1989). Acidic fibroblast growth factor mRNA is expressed by cardiac myocytes in cultures and the protein is localized to the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 2683-2687.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S. and McMahon, P.A. (1989). Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene int-2 suggest mutiple roles in fetal development. *Development*, **105**: 131-136.
- Wilkinson, D.G., Peters, G., Dickson, C. and McMahon, A. Expression of the FGF-related protooncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO J.*, **7**: 691-695.
- 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.
- 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.

Zeytin, F.M., Rusk, S.F., Baird, A., Raymond, V., Leff, S.E. and Mandell, A.J. (1988a). Induction of c-fos, calcitonin gene expression and acidic FG production in a multi-peptide secreting neuroendocrine cell line. *Endocrinology*, **122**: 1114-1120.

Zeytin, F.N., Rusk, S.F., Raymond, V. and Mandell, A.J. (1988b). Fibroblast growth factor stabilizes ribonucleic acid and regulates differentiated function functions in a multi-peptide-secreting neuroendocrine cell line. *Endocrinology*, **122**: 1121-1128.

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.



RESUME

Les fibroblast growth factors (FGFs) sont des facteurs de croissance mitogènes et angiogènes actifs sur la prolifération et la différenciation de lignées cellulaires issues du tissu nerveux. Cependant la fonction *in vivo* de ces facteurs dans le système nerveux central n'est pas encore connue. Afin d'apporter des éléments de réponse à ce problème, nous avons recherché la présence de FGFa et de ses ARNm ainsi que ceux d'un récepteur putatif des FGFs (BEK) dans le cerveau de souris au cours du développement et dans deux modèles d'agression du SNC : la lésion et la mutation jimpy (jp). Nos résultats indiquent que de E10 à E18, le niveau de FGFa est bas et ses ARNm indétectables. Après la naissance, le niveau de FGFa augmente progressivement jusqu'à P11 (1,5ng/mg de protéines) puis rapidement de P11 à P14 (5ng/mg). Ce haut niveau décroît chez l'adulte (2,5ng/mg). Les ARNmFGFa évoluent de manière similaire jusqu'à P18 et demeurent fortement exprimés chez l'adulte. Pour BEK, nous avons détecté un transcrite de 4,5 kb de E14 à l'âge adulte et un transcrite de 1,5 kb à partir de P11. Une lésion mécanique du cerveau néonatal induit une diminution du niveau de FGFa mais une augmentation d'immunoréactivité en bordure de la lésion, les niveaux des ARNm du FGFa et de BEK n'étant pas modifiés. La mutation jp, caractérisée par une absence de myélinisation, provoque une élévation du niveau de FGFa dans les extraits de cerveau mais une diminution de l'expression des ARNmFGFa et du messenger de 1,5 Kb de BEK. Nos résultats suggèrent que le FGFa agirait sur les phases postnatales du développement du cerveau. Une lésion et la mutation jp semblent induire des réactions différentes au niveau du FGFa et de ses récepteurs.