

50376  
1990

273 UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

50376  
1990  
273

Année 1990

n° d'ordre : 642

**THESE DE DOCTORAT  
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

présentée par :

**Hubert HONDERMARCK**



**EXPRESSION DE SITES DE FIXATION DES "FIBROBLAST  
GROWTH FACTORS" (FGFs) ACIDE ET BASIQUE AU COURS DU  
DEVELOPPEMENT DU CERVEAU DE POULET**

Soutenue le 19 décembre 1990 devant le Jury suivant :

Président :	Mme G. SPIK
Directeur du travail :	M. B. BOILLY
Rapporteurs :	M. D. BARRITAUULT M. J.P. PEYRAT
Examineurs :	Mme M. SENSENBRENNER Mme E. DEUDON



## AVANT-PROPOS

*Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie des facteurs de croissance (Pr. B. Boilly) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.*

*Mes plus vifs remerciements vont tout d'abord à Monsieur le Professeur B. Boilly, qui m'a accueilli dans son Laboratoire et m'a soutenu et guidé tout au long de ce travail.*

*J'ai aussi le plaisir d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur D. Barritault (Laboratoire de Biotechnologie des Cellules Eucaryotes, Paris XII) dont les compétences et le dynamisme ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Il m'est particulièrement agréable de remercier le Docteur J.Ph. Peyrat (Centre Oscar Lambret, Lille) qui de par ses connaissances étendues et la rigueur de ses démarches m'a beaucoup appris.*

*J'exprime mes plus sincères remerciements à Madame le Docteur E. Deudon (Laboratoire de Biochimie, Pr. Picard, Faculté de médecine St Antoine Paris) pour son aide et ses précieux conseils en matière de glycosaminoglycannes.*

*J'exprime ma reconnaissance au Docteur F. Bernet (Laboratoire de Physiologie Animale, Lille) pour l'aide qu'il m'a apportée dans le dosage des monoamines.*

*Je remercie très vivement :*

*Madame le Docteur M. Sensenbrenner, Directeur de Recherche au CNRS (Centre de Neurochimie, Strasbourg), pour son accueil incomparable au sein de son Laboratoire et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse;*

*Madame le Professeur G. Spik pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens à remercier tout ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de mon travail, en particulier :*

*Le Docteur J. Courty (Laboratoire de Biotechnologie des cellules eucaryotes, Paris XII) pour son aide et ses précieux conseils en matière de réceptologie;*

*Le Professeur B. Lassalle (Laboratoire de Biologie du développement, Lille) pour l'initiation aux techniques d'analyse d'images;*

*Le Docteur Ledig (Centre de Neurochimie, Strasbourg) pour l'apprentissage des techniques de culture primaire de cellules nerveuses;*

*D. Thomas pour ton aide dans la détection des ARNm;*

*V. Blanckaert, pour ta disponibilité, ton apport sur le plan technique et tes grandes qualités humaines, soit assuré de mon amitié;*

*F. Laloux, par ta constante efficacité et ton grand sérieux, tu as permis la dactylographie de cette thèse et des publications dans les meilleurs délais ; par ailleurs, je ne saurai oublier ton aide dans un domaine qui m'est difficile : les relations avec l'administration;*

*Monsieur Lazarecki et Madame Auger pour le travail de photographie.*

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

GENERALITES.....	2
------------------	---

## LES FACTEURS DE CROISSANCE

I - Introduction.....	2
II - Principales familles de facteurs de croissance.....	2
III - Mécanismes d'action.....	7
IV - Analogies avec les oncogènes.....	8
V - Conclusion.....	8

## FIBROBLAST GROWTH FACTORS

I - Introduction.....	9
II - Séquences en acides aminés.....	10
III - Biologie moléculaire, biosynthèse et sécrétion.....	11
IV - Distribution tissulaire et cellulaire.....	12
V - Propriétés biologiques <i>in vitro</i> .....	12
VI - Mécanisme d'action.....	14
A) Détection des sites de fixation membranaires.....	14
B) Sites de fixation à haute affinité.....	16
1 - Purification.....	16
2 - Biologie Moléculaire.....	20
3 - Existe-t-il une ou plusieurs formes de récepteurs pour les FGFs ?.....	21
C) Sites de fixation à basse affinité.....	22
D) Transduction.....	23
E) Le devenir du ligand.....	26
F) Interaction avec l'héparine et les matrices extra-cellulaires...	27
G) Relation structure-fonction.....	29

VII	- FGFs et processus physiologiques.....	31
	A) Angiogenèse.....	31
	B) Cancer.....	33
	C) Cicatrisation et réparation tissulaire.....	35
	D) Régénération du membre et du cristallin.....	36
	E) Régénération nerveuse.....	37
	F) Développement embryonnaire.....	38

MATERIELS ET TECHNIQUES.....	42
------------------------------	----

**CHAPITRE I : Développement du cerveau de poulet..... 45**

I	- Introduction.....	45
II	- Généralités.....	45
	A) Morphogenèse.....	45
	B) Histogenèse.....	47
	C) Facteurs trophiques.....	50
III	- Prolifération cellulaire et maturation neuronale.....	53
	A) Matériels et Techniques.....	53
	B) Résultats.....	55
IV	- Dosage des FGFs acide et basique.....	57
	A) Techniques.....	57
	B) Résultats.....	58
V	- Discussion.....	59

**CHAPITRE II : Expression de sites de fixation spécifiques  
des FGFs acide et basique..... 65**

I	- Introduction.....	65
II	- Matériels et Méthodes.....	65
	A) Matériels.....	65
	B) Préparation des membranes.....	66
	C) Dosages radiorécepteurs.....	66
	D) Expérience de pontage moléculaire.....	74
	E) Mesure de l'expression des ARNm.....	74

III - Résultats.....	76
A) Dosages radiorécepteurs.....	76
B) Expériences de pontage moléculaire.....	81
C) Expression d'ARNm correspondant au gène BEK.....	82
IV - Discussion.....	82

**CHAPITRE III : Caractérisation des glycosaminoglycannes sulfates possédant une affinité pour les FGFs..96**

I - Introduction.....	96
II - Matériels et Méthodes.....	97
III - Résultats.....	102
1) Extraction et séparation des glycosaminoglycannes.....	102
2) Déplacement du I <sup>125</sup> -FGFb de ses sites de fixation membranaires, par les glycosaminoglycannes.....	102
3) Caractérisation électrophorétique des héparane sulfates possédant une affinité pour le FGFb.....	103
4) Modulation de l'activité biologique des FGFs.....	103
5) Localisation in situ des sites de fixation du I <sup>125</sup> -FGFb.....	103
IV - Discussion.....	104
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>114</b>

## INTRODUCTION

La croissance du cerveau est marquée par d'intenses phases de prolifération, de migration, de différenciation et de mort cellulaire. La régulation de ces phénomènes reste mal connue, cependant une catégorie de molécules, les facteurs de croissance et notamment les "fibroblast growth factors" (FGFs) suscitent un intérêt particulier. Les FGFs, ont été isolés à partir de la plupart des tissus de l'organisme, mais leurs quantités apparaissent plus importante dans le cerveau par rapport aux autres organes (revue dans Baird and Böhlen, 1989). Ces facteurs, présentent à la fois des propriétés hypertrophiques et hyperplasiques, qui se manifestent principalement par des effets mitogènes, angiogènes et neurotrophiques. Cependant, bien que les FGFs aient été isolés du cerveau embryonnaire (Risau, 1988), on ne sait pas si ces facteurs interviennent au cours de son développement. L'activité biologique des FGFs étant médiée par des sites de fixation membranaires, un moyen de comprendre la fonction éventuelle de ces facteurs consiste à détecter la présence de leurs sites de fixation dans le cerveau et à étudier leur régulation au cours du développement.

Nous nous sommes proposés dans ce travail, d'aborder la fonction des FGFs par l'étude de leurs sites de fixation au cours du développement du cerveau de poulet. Après avoir rappelé les données actuelles sur les FGFs et leurs récepteurs (Généralités), nous consacrerons un premier chapitre à une étude globale de la prolifération cellulaire, de la différenciation neuronale et de la présence des FGFs au cours du développement du cerveau. Dans le deuxième chapitre, nous étudierons l'expression des sites de fixation spécifiques des FGFs. Enfin, le troisième chapitre sera consacré aux glycosaminoglycannes du cerveau embryonnaire, dont nous étudierons l'implication dans la fixation des FGFs.

# GENERALITES

## LES FACTEURS DE CROISSANCE.

### I - INTRODUCTION

Les facteurs de croissance peuvent être définis comme des molécules polypeptidiques qui, ajoutés à un milieu de culture (contenant tous les éléments nutritifs) induisent une réponse hyperplasique (mitogène) ou hypertrophique (augmentation de la taille) des cellules contenues dans le milieu.

Jusqu'à présent, une trentaine de ces polypeptides ont été recensés et bien que la plupart restent probablement à découvrir, il est déjà possible de les regrouper en plusieurs grandes familles (tableau 1).

### II - PRINCIPALES FAMILLES DE FACTEURS DE CROISSANCE

#### La famille EGF.

Cette famille regroupe les facteurs de croissance interagissant directement ou indirectement avec le récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGF).

Purifié à partir de glande sous maxillaire de souris mâle, pour ses propriétés à induire l'ouverture précoce des paupières chez le souriceau (Cohen et al., 1962), l'EGF est un peptide de poids moléculaire 6045 Da dont la séquence en acide aminés (Taylor et al., 1972) présente 70% d'homologie avec l'urogastrone purifié à partir d'urines humaines (Gregory, 1975). La capacité de l'EGF à stimuler l'ouverture des paupières est due à son activité mitogène au niveau des cellules épidermiques. *In vitro*, l'EGF stimule la prolifération d'un grand nombre de cellules épithéliales et mésenchymateuses (Rose et al., 1976). Le gène codant pour l'EGF a été cloné, séquencé (Gray et al., 1983), ce facteur est formé à partir d'un précurseur de 128 Da dont les produits de clivage pourraient correspondre à d'autres facteurs de croissance non encore découverts (Scott et al., 1983).

Le Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ), produit par certaines tumeurs

ou des cellules transformées par des rétrovirus apparaît structurellement (séquence en acides aminés) et fonctionnellement (interaction avec le même récepteur, effet mitogène) proche de l'EGF (Marquadt et al., 1984). De même, le Vaccinia Growth Factor (VGF), mitogène produit par le virus de la vaccine possède une homologie avec l'EGF (Brown et al., 1985).

### **La famille PDGF.**

Le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) fut isolé et séquencé (Antonadies et al., 1979) à partir de plaquettes sanguines humaines. Il est composé de deux chaînes polypeptidiques A et B de poids moléculaire respectivement 14 et 17 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures (Raines et Ross, 1982). Ces deux chaînes provenant de gènes différents présentent 60% d'homologie dans leur structure primaire et peuvent s'assembler pour former le PDGF A-A, le PDGF A-B ainsi que le PDGF B-B. Ces isoformes de PDGF ont différents effets au niveau de leurs cellules cibles, ainsi le PDGF A-B est mitogène pour la plupart des cellules mésenchymateuses et les cellules gliales, chémoattractant pour les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, alors que le PDGF A-A ne présente que très peu d'activité mitogène (Nister et al., 1988).

### **La famille des facteurs de croissance apparentés à l'insuline.**

Les Insulin-like Growth Factors IGF I et IGF II, deux peptides présentant 50% d'homologie avec l'insuline ont pu être caractérisés (revue dans Rechler and Nissley, 1989). L'IGF I (MSA ou Somatomédine C) et l'IGF II (Somatomédine A) sont sécrétés par le foie en réponse à une stimulation par l'hormone de croissance circulante (GH). *In vitro*, les IGFs apparaissent être des agents mitogènes et parfois différenciateurs de nombreux types cellulaires d'origine ecto / méso / et endodermique.

### **La famille du TGF $\beta$ .**

Le transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), initialement purifié et caractérisé à partir de plaquettes humaines (Assoian et al., 1983), du placenta humain (Frolik et al., 1983) et du rein de boeuf (Roberts et al., 1983) est un peptide homodimérique de poids moléculaire proche de 25 kDa. Cette première forme de TGF $\beta$  isolée, fut appelée TGF $\beta$ 1 après qu'une forme de structure voisine et appelée TGF $\beta$ 2 ait été purifiée à partir des plaquettes porcines (Cheifetz et al., 1987), des os de bovin (Seyedin et al., 1985), de gliomes humains (Wrana et al., 1987). Les TGF $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 présentent 72% d'homologie, proviennent de précurseurs différents et ont des propriétés biologiques comparables.

Initialement décrits comme étant capables de stimuler la croissance de cellules non transformées en milieu solide, ces facteurs de croissance sont activateurs ou inhibiteurs de la multiplication de nombreux types cellulaires (revue dans Roberts and Sporn, 1989). D'autres substances telles que la Müllerian - inhibiting substance (MIS) (Mason et al., 1985) et de la sous unité  $\beta$  des inhibiteurs et activateurs de la sécrétion de folliculo stimulating factor (Vale et al., 1986), se sont avérées être des TGF $\beta$ -like protéines.

### **La famille des Heparin Binding Growth Factor.**

Cette famille de facteurs de croissance notamment représentés par les FGFs acide et basique regroupe les facteurs de croissance ayant une forte affinité pour l'héparine et de nombreuses propriétés biologiques. Nous y consacrerons un chapitre particulier.

Les trois familles suivantes de facteurs de croissance rassemblent des polypeptides intervenant préférentiellement dans des processus physiologiques précis, à savoir la croissance nerveuse, l'hématopoïèse et la réponse immunitaire.

FAMILLES	MEMBRES
Epidermal growth factor	EGF - TGF $\alpha$ - VGF -
Platelet derived growth factor	PDGFA - PDGFB - PDGFAB -
Insulin and Insulin like growth factor	Insuline - IGF I - IGF II - Relaxin -
Transforming growth factor $\beta$	TGF $\beta_1$ - TGF $\beta_2$ - TGF $\beta_2$ - inhibin A - inhibin B - Activin A - Activin A-B - Mullerian inhibing - substance -
Heparin-binding growth factor	aFGF - bFGF - hst/ks - int-2 - FGF5 - FGF6 - FGF7 -
Facteurs de croissance nerveuse	NGF - BDNF - CNTF -
Facteurs de croissance hématopoïétiques	Erythropoïétine - CSF 1 - CSF 2 - CSF 3 -
Facteur de croissance de la réponse immunitaire	IL1 - IL2 - IL3 - IL4 - IL5 - IL6 -

Tableau 1 : principales familles de facteurs de croissance

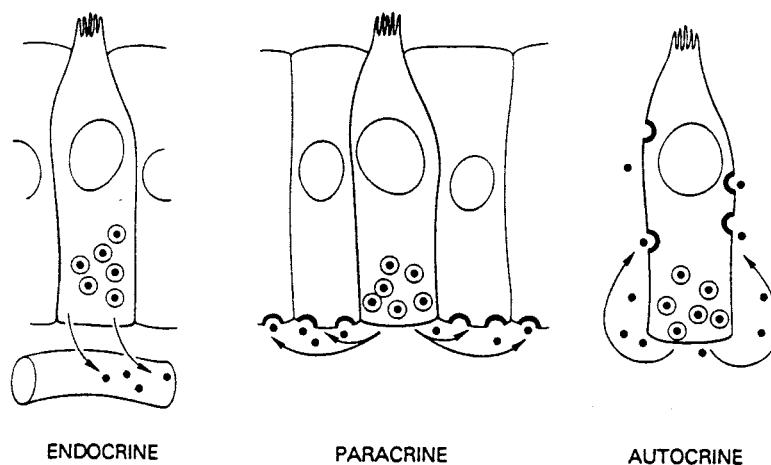


Figure 1 : Mode d'action des facteurs de croissance ( d'après Sporn MB and Todaro GJ, N Engl Med ; 303 : 878-880)

### **La Famille du NGF/BDNF/CNTF.**

Ces facteurs sont caractérisés par une action essentiellement au niveau de la croissance nerveuse.

Le Nerve Growth Factor (NGF) isolé originellement à partir de la tumeur Sarcome 180, de la glande à venin du serpent et de la glande sous-maxillaire de souris (Levi-Montalcini et Angeletti, 1968) fut caractérisé biochimiquement comme étant un homodimère de 26 kDa (Angeletti et Bradshaw, 1971) capable de stimuler la croissance et la survie de fibres nerveuses parasymphatiques (Levi-Montalcini and Angeletti, 1963).

Le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) isolé de l'oeil de poulet, du nerf sciatique de rat et du coeur de boeuf (Barbin et al., 1984 ; Manthorpe et al., 1986; Watters et Hendry, 1987) est un peptide stimulant la survie de ganglions ciliaires en culture.

Le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) purifié du cerveau de porc (Barde et al., 1982) est un peptide favorisant la croissance des neurones sensoriels de la rétine (Davies et al., 1986 ; Johnson et al., 1986).

### **La Famille des facteurs de croissance hématopoïétiques.**

Jusqu'à présent, 5 principaux facteurs de croissance hématopoïétiques ont été identifiés. Il s'agit de :

- L'érythropoïétine, dont deux formes différentes par leur niveau de glycosylation ont été isolées, favorise la maturation des érythroblastes (revue dans Goldwasser et al. 1989).
- Les Colony Stimulating Factor (CSF). Les CSF1 (M-CSF) et CSF- $\beta$  (G-CFS) de PM 70-90 et 19 kDa induisent respectivement la formation de macrophages et de granulocytes à partir des cellules souches (Stanley et Heard, 1977). Par contre, le CSF-a (GM-CSF) est capable d'induire à la fois la formation des macrophages et des granulocytes à partir des cellules souches (Stanley et Heard, 1977).

## **La famille des facteurs de croissance intervenant dans la réponse immunitaire.**

Cette famille comprend les interleukines 1 à 6. Les interleukines sont toutes des glycoprotéines présentant des effets multiples sur les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire, mais aussi parfois sur d'autres types cellulaires.

L'interleukine 1 (revue dans Schmidt et Tocci, 1989) produite essentiellement par les macrophages et les monocytes active les lymphocytes T, la différenciation des cellules B, mais aussi la sécrétion des prostaglandines et l'activation des ostéoclastes. L'interleukine 2 (revue dans Hatakeyama et Taniguchi, 1989) de pM 15 kDa stimule la prolifération des lymphocytes T et B, des cellules tueuses (Natural Killer) et la production d'interféron par les cellules B. L'interleukine 3 (revue dans Ihle, 1989) a déjà été décrite dans la partie correspondant à la famille des facteurs de croissance intervenant dans l'hématopoïèse ; elle stimule aussi la croissance des macrophages. L'interleukine 4 (revue dans Yokota et al., 1989), l'interleukine 5 (revue dans Honjo et Takatsu, 1989) et l'interleukine 6 (revue dans Hirano et Kishimoto, 1989) activent la croissance et la différenciation des lymphocytes T et B mais aussi des hépatocytes et des plasmocytes.

Une classification des facteurs de croissance par familles, basée essentiellement sur des critères structuraux et/ou fonctionnels est nécessairement artificielle de par la grande diversité des propriétés biologiques de ces molécules. En effet, ces facteurs apparaissent véritablement multi-fonctionnels (Sporn and Roberts, 1988). La plupart d'entre eux, non seulement sont capables de stimuler la prolifération cellulaire de certaines cellules, alors qu'ils inhibent celle d'autres cellules, mais de surcroît, ils possèdent divers effets sans rapport avec le contrôle de la croissance. Ainsi l'EGF, qui stimule la prolifération des kératinocytes, inhibe celle des cellules folliculaires, mais possède également la propriété de supprimer la sécrétion d'HCl par les cellules gastriques. De même, le TGF $\alpha$  active la croissance des cellules épithéliales, inhibe celle de nombreuses cellules tumorales, mais peut aussi inhiber la lipoprotéine lipase et stimuler la collagénase.

### III- MECANISMES D'ACTION

Les facteurs de croissance sécrétés par une cellule productrice atteignent leurs cellules cibles selon trois modes d'action représentés sur la figure 1. Le mode endocrine dans lequel le facteur libéré et transporté dans la circulation sanguine est utilisé pour les hormones mais également pour les IGFs. Le mode paracrine, ou par diffusion, implique une action à courte distance et est utilisé pour la plupart des facteurs de croissance. Enfin, le mode autocrine, dans lequel la cellule est stimulée par le facteur qu'elle a produit ; ce facteur peut agir, après avoir été sécrété via des récepteurs extérieurs ou sans être sécrété via des récepteurs intracellulaires. Le mode autocrine est hautement probable pour les facteurs de croissance de type TGF et FGF.

L'action au niveau cellulaire des facteurs de croissance est médiée par des récepteurs membranaires spécifiques. Bien que la structure de tous les récepteurs ne soit pas connue, il semble que la diversité structurale et fonctionnelle des facteurs de croissance ne se retrouve pas au niveau de leurs récepteurs qui présentent de nombreuses homologues structurales et paraissent utiliser des voies de transduction voisines et qui avaient déjà été décrites pour les hormones. Tous les récepteurs de facteur de croissance, dont la structure est actuellement connue, contiennent : 1) Un domaine extra-cellulaire contenant un ou plusieurs sites de fixation du ligand, 2) Une chaîne polypeptidique hydrophobe traversant la membrane cellulaire, 3) Une chaîne peptidique intracellulaire. Trois familles de récepteurs présentant des homologues de structure primaire ont été identifiées. Il s'agit des familles de type 1) Insuline/IGFI, 2) EGF et 3) PDGF et CSFI.

Les récepteurs de la famille Insuline/IGF et de la famille EGF possèdent un domaine tyrosine kinase dans leurs fragments intracellulaires, domaine impliqué dans la transduction du signal ; par contre, les récepteurs de type PDGF activent par l'intermédiaire d'une protéine G la voie des inositides phosphates. La structure du récepteur et les voies de transduction de nombreux facteurs de croissance restent à définir, c'est le cas notamment des récepteurs de la famille des HBGFs.

Les étapes ultérieures à la fixation des facteurs de croissance sur leur récepteur, et notamment l'induction de l'expression de certains gènes demeurent très mal connues.

#### IV- ANALOGIES AVEC LES ONCOGENES

Un certain nombre de produits d'oncogènes présentent des analogies avec les facteurs de croissance. De façon schématique, on peut classer ces oncogènes en 3 catégories : 1) Les oncogènes codant pour des facteurs de croissance. Il s'agit notamment de *v-sis* et de *int 2/ hst /K FGF* qui codent pour des peptides ayant un haut degré d'homologie respectivement avec la chaîne B du PDGF et le bFGF. 2) Oncogènes codant pour des récepteurs aux facteurs de croissance. Dans cette catégorie, *c-erb* qui code pour un récepteur tronqué de l'EGF, de *v-fms* codant le récepteur du CSF1 et de *v-ros/met/vsea* qui présentent de grandes homologies avec le récepteur de l'insuline. 3) Oncogènes codant pour des signaux de transduction des facteurs de croissance, par exemple *src* code pour une tyrosine kinase membranaire.

#### V - CONCLUSION.

Les données acquises jusqu'à présent, sur les facteurs de croissance nous permettent de définir leurs caractéristiques biochimiques ainsi que celles de leurs récepteurs et leurs propriétés biologiques *in vitro*. L'ensemble de ces connaissances permet d'entrevoir de fortes potentialités d'application thérapeutiques pour ces molécules. Cependant, celles-ci restent encore très limitées à l'heure actuelle, notamment par le fait que la biologie "*in vivo*" des facteurs de croissance est très mal connue, en effet, dans la grande majorité des cas, on ignore presque tout de la fonction de ces molécules dans l'organisme. C'est en particulier le cas des FGFs que nous allons maintenant décrire.

## FIBROBLAST GROWTH FACTORS

### I - INTRODUCTION

La présence de substances capables de stimuler la prolifération des fibroblastes dans des extraits de cerveau et d'hypophyse a été établie dès 1939 (Trowell et al., 1939 ; Hoffman, 1940) et confirmée plus récemment (Armelin et al., 1973). Sur la base de ces travaux, un facteur mitogène actif sur les fibroblastes a pu être partiellement purifié à partir d'extraits de cerveaux et d'hypophyses et fut nommé le Fibroblast Growth Factor (FGF) (Gospodarowicz 1974, 1975). La molécule décrite possédait un PM de 12 kDa, un point isoélectrique basique et était sensible à des variations de pH et de température. Quelques années plus tard, l'existence d'un autre facteur de croissance des fibroblastes fut établie à partir des mêmes sources (cerveau et hypophyse) et, en raison de son pI acide, fut nommé FGF acide (Thomas et al., 1980 ; Gambarini et Armelin, 1982) par rapport à son homologue à pI bas : le FGF basique. Pendant les années qui suivirent, les recherches se porteront sur la structure de ces facteurs qui finirent par être purifiés à homogénéité : le FGF basique à partir de l'hypophyse (Böhlen et al. , 1984) et le FGF acide à partir du cerveau (Thomas et al., 1984). Les éléments de séquence en acides aminés de ces polypeptides indiquèrent que leur activité mitogène commune pour les fibroblastes était imputable à leurs homologues de structure. Il a été montré ensuite que ces facteurs de croissance possèdent une forte affinité pour l'héparine (Gospodarowicz et al., 1984 ; Böhlen et al., 1985) ce qui simplifia grandement leur purification par des méthodes de chromatographie d'affinité et donna naissance à une autre appellation pour ces molécules : les "Heparin Binding Growth Factors", dont la famille ne cesse de s'agrandir depuis quelques années.

## II - SEQUENCES EN ACIDES AMINES.

Le FGF basique initialement isolé d'extraits hypophysaires est constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 146 acides aminés d'un pM de 16,5 kDa (Esch et al., 1985 ; Simpson et al., 1987). D'autres formes possédant une partie N terminale plus étendue (155-157 acides aminés au total) ont également été isolées (Ueno et al., 1986a ; Story et al., 1987 ; Sommer et al., 1987) ou clonées (Abraham et al., 1986a).

La signification biologique de ces différentes formes n'est pas connue et pourrait traduire soit une hétérogénéité résultant des différents modes d'extraction, soit l'existence de formes précurseurs. Moscatelli et al (1987b) ont décrit l'existence dans le cerveau de porc d'une forme de FGF basique de 25 kDa, capable d'avoir un effet biologique et pouvant être converti en une forme de 18 kDa après digestion trypsique.

Les FGFs acides bovin et humain initialement purifiés d'extraits de cerveaux sont constitués d'une chaîne polypeptidique de 140 acides aminés et possèdent un pM de 15,5 kDa (Gimenez-Gallego et al. 1986a, Gautschi-Sova et al., 1986) (Fig. 2). Comme dans le cas du FGF basique, une forme possédant une partie N terminale plus étendue a également été décrite (Jaye et al., 1986), ainsi que l'existence de formes tronquées (Harper et al., 1986 ; Gimenez-Gallego, 1986a).

L'analyse des structures primaires des FGF acide et basique montre que ces facteurs présentent 53% d'homologie ainsi qu'une alanine acétylée en position N terminale (Fig. 2). De plus, il existe une homologie entre ces facteurs et l'IL1 $\alpha$  et l'IL1 $\beta$  (19 et 20% respectivement), la Tachykinine et la Bombésine (Gimenez-Gallego et al., 1985). La signification de ces homologies n'est pas connue.

Cinq autres polypeptides ont été classés dans la famille des FGFs. Le premier est la protéine codée par l'oncogène *hst/ks* qui possède 206 acides aminés et une homologie de 40% avec le FGF basique (Yoshida et al., 1987 ; Barr et al., 1988). Le second est codé par l'oncogène *int-2*, comprend 243 acides aminés et est l'homologue des FGFs acide et basique. Le troisième appelé FGF5 est un

Basic FGF	-----	
Acidic FGF	-----	
hst/KS3	---MSGPGTAAVALLPAVLLALLAPWAGRGGAAAPTAPNGTLEAELEERRWESLVALS	54
int-2	-----MGLIWLLLLSLLEPSW	16
FGF-5	MSLSFLLLLFFSHLILSAWAHGEKRLAPKGQPGPAATDRNPRGSSSRQSSSSAMSSSS	58
Basic FGF	MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNG-GFFLRIHPDGRVDGVRE	54
Acidic FGF	MAEGEITTFALTEK---FNLPPGNYKKPKLLYCSNG-GHFLRILPDGTVDGTRD	51
hst/KS3	LARLPVAAQPKEAAVQSGAGDYLLGIKRLRRLYCNVIGIFHLQALPDGRIGGAHA	109
int-2	PTTGPGLRLRRDAGGRGGVYEHLLGGAPRRRKLKLYCATK--YHLQLHPSGRVNGSLE	69
FGF-5	ASSSPAASLGSQSGLEQSSFQWSLGARTGSLYCRVIGIFHLQIYPDGKVNGSHE	113
Basic FGF	KSDPHIKLQLQAEERGTVSISKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLES	109
Acidic FGF	RSDQHIQLQLSAESVGEVYIKSTETGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEE	106
hst/KS3	DTRDSL-LELSPVERGVVSIKGLFSGRYLAMNKRGRLYASDHNAECEPFVERIHE	163
int-2	NSAYSI-LEITAVEGVVAIKGLFSGRYLAMNKRGRLYASDHNAECEPFVERIHE	123
FGF-5	ANMLSV-LEIFAVSQIGIRGVFVSNKFLAMSKKGLHASAKFTDDCKFRERFQE	167
Basic FGF	NNYNTYRSRKYTS-----WYVALKRTGQYKLG--SKTGPGQKAI	146
Acidic FGF	NHYNTYISKKHAEN-----WFVGLKKNKSGCKRG--PRTHYGQKAI	145
hst/KS3	NNYNAYESYKYPG-----MFIALSNGKTKKG--NRVSPMTMKT	200
int-2	LGYNTRYASRLYRTGSSGPGAQRQPGAQRPWYVSVNGKGRPRRGFKTRRT--QKSS	176
FGF-5	NSYNTYASAIHRTEKTGRE-----WYVALNKRKAKRGCSPRVKPQHIST	212
Basic FGF	LFLPMSAKS-----	155
Acidic FGF	LFLPLPVSSD-----	155
hst/KS3	HFLPRL-----	206
int-2	LFLPRVLGHKDHDMVRLQSSQPRAPGEGSQPRQRQKQSPGDHGKMETLSTRA	229
FGF-5	HFLPRFKQSEQPELSFTVTVPKKNPPSPIKSKIPLSAPRKNNTNSVKYRLKFRFG	267
Basic FGF	-----	
Acidic FGF	-----	
hst/KS3	-----	
int-2	TPSTQLHTGGLAVA	
FGF-5	-----	

**Figure 2 :** Structure primaire des FGFs. Les séquences en acides aminés pour le FGFb humain (Abraham et al., 1986b), le FGFa humain (Jaye et al., 1986), hst/ks (Delli Bovi et al., 1987 ; Barr et al., 1988), le FGF5 (Zhan et al., 1988) et int-2 (Dickson et Peters, 1987) sont alignées, les séquences communes aux 5 formes sont indiquées par un trait noir, et les homologies significatives par un astérisque (d'après Baird et Böhlen, 1989).

protooncogène de 267 acides aminés présentant 50% d'homologie avec les FGFs acide et basique (Zhan et al., 1988). Récemment, les FGF6 (Marics et al., 1989) et KGF/FGF7 (Rubin et al. 1989) ont été décrits.

### III - BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOSYNTHESE ET SECRETION.

Les ADNc codant pour le FGF acide humain (Jaye et al., 1986) et le FGF basique bovin (Abraham et al., 1986a), humain (Abraham et al., 1986b) et murin (Shimasaki et al., 1988) ont été clonés et séquencés. Leurs séquences sont en accord avec les données biochimiques précédemment rapportées. Le FGF acide et son homologue basique sont codés par des gènes différents qui sont présents en une seule copie dans le génome. Chez l'homme, le gène du FGF acide est positionné sur le chromosome 5 (Jaye et al., 1986) alors que celui du FGF basique se trouve sur le chromosome 4 (Mergia et al., 1986). Les 2 gènes sont similaires dans leur organisation générale et contiennent 3 exons séparés par 2 larges introns. Comme dans le cas des protéines correspondantes, les structures primaires des gènes des FGFs acide et basique sont très homologues, ce qui suggère l'existence d'un gène ancestral commun.

Les ARNm transcrits à partir de ces gènes sont constitués de 4,8 Kb pour le FGF acide et de 7-3,7 Kb pour le FGF basique, dans ce dernier cas, une forme de 1,4 Kb est parfois détectée. Un fait intrigant est l'absence de séquence signal pour les FGFs basique et acide (Jaye et al., 1986 ; Abraham et al., 1986c). La présence d'une séquence signal est jusqu'à présent considérée comme indispensable pour la sécrétion d'un peptide hors de la cellule productrice. Ceci est en contradiction avec le fait que les FGFs : 1) sont présents dans des milieux de culture contenant des cellules productrices de ces facteurs de croissance 2) sont détectés dans les matrices extra-cellulaires *in vitro* (Friesel et al. 1988) et *in vivo* (Gonzalès et al. 1990) 3) possèdent des récepteurs extracellulaires comme en témoigne la stimulation par du FGF exogène. Quoique cette contradiction apparente ne soit pas encore expliquée, il faut noter que d'autres membres de la famille FGF, *hst/Ks* et

FGF5 possèdent une séquence signal. L'absence de séquence signal constitue une parenté supplémentaire entre les FGFs acide et basique et les interleukines (March, 1985).

#### IV - DISTRIBUTION TISSULAIRE ET CELLULAIRE.

La découverte du fait que les FGFs possèdent une forte affinité pour l'héparine a permis de purifier jusqu'à homogénéité de nombreuses molécules mitogènes incomplètement caractérisées qui se sont avérées être semblables aux FGFs acide ou basique. Ces différents facteurs, homologues des FGFs basique et acide sont rapportés dans les tableaux 2 et 3 .

Le FGF basique originellement purifié à partir de l'hypophyse et du cerveau à une concentration de 0,5 mg/Kg est présent dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, à des concentrations cependant 10 à 50 fois moindre (tableau 2) ; il est également synthétisé par une grande variété de types cellulaires normaux et transformés en culture (tableau 2). Le FGF acide fut longtemps considéré comme plus spécifique du tissu nerveux puisqu'il n'avait été isolé que du cerveau (Lobb et Fett, 1984), de la rétine (Courty et al., 1985) dans lequel il est présent à forte concentration : 0,4 mg/Kg. Récemment, il a aussi été identifié dans le rein (Gautshi-Sova et al., 1987), le coeur (Thompson et al., 1986) et l'os (Hauschka et al., 1986). De plus, de nombreux types cellulaires en culture synthétisent le FGF acide (tableau 3).

#### V - PROPRIETES BIOLOGIQUES *IN VITRO*.

Le caractère pléiotropique des facteurs de croissance se trouve particulièrement bien illustré au niveau des FGFs qui se révèlent être mitogènes, différenciateurs ou chémoattractifs.

- *Effets mitogènes.* Les FGFs acide et basique sont de puissants inducteurs des synthèses d'ADN pour une grande variété de cellules essentiellement d'origine

TISSUS	APPELLATIONS	REFERENCES
Cerveau	FGF acide	Thomas et al., 1984
	Astroglial growth factor I (AGF I)	Pettmann et al., 1985
	Heparin binding growth factor I (HBGF I)	Lobb et Fett, 1984
	Endothelial cell growth factor (ECGF)	Maciag et al., 1982
	Brain derived growth factor I (BDGF I)	Jaye et al, 1986
Oeil	Eye derived growth factor II (EDGF II)	Courty et al., 1985
	Retina derived growth factor I (RDGF I)	D'Amore et Klagsbrun, 1984
Rein	Embryonic kidney derived angiogenic factor (EKdAF)	Risau et Ekblom, 1986
	FGF acide	Gautschi-Sova et al., 1987
Coeur	FGF acide	Thompson et al., 1986
Os	FGF acide	Hauschka et al., 1986

Tableau 2 : Distribution tissulaire et cellulaire du FGF acide

TISSUS	APPELLATIONS	REFERENCES
Hypophyse	FGF basique	Böhlen et al., 1984
Cerveau	FGF basique	Gospodarowicz et al., 1984
	Astroglial growth factor II (AGF II)	Pettman et al., 1985
	Heparin binding growth factor II (HBGF II)	Lobb et Fett 1984
	Brain derived growth factor II (BDGF II)	Jaye et al., 1986
Oeil	Eye derived growth factor I (EDGF I)	Courty et al, 1985
	Retina derived growth factor II (RDGF II)	D'Amore et Klagsbrun, 1984
Surrenale	Adrenal growth factor (AGF)	Gospodarowicz et al., 1986b
Ovaire	Ovarian growth factor (OGF)	Makris et al., 1984
Testicule	Seminiferous growth factor (SGF)	Bellvé et Feige, 1984
Rein	Kidney angiogenic factor (KAF)	Baird et al., 1985b
Thymus	Heparin binding growth factor	Gospodarowicz et al., 1987
Foie	Hepatocyte growth factor (HGF)	Ueno et al., 1986b
Muscle	Myogenic growth factor (MGF)	Kardami et al., 1985
Coeur	Heparin binding growth factor	Thompson et al., 1986
Placenta	Placental angiogenic factor	Moscatelli et al., 1987
Os	Bone growth factor (BGF)	Matsuo et al., 1987
Cartilage	Cartilage derived growth factor (CDGF)	Klagsbrun et Beckoff, 1980
Prostate	Prostate growth factor (PGF)	Story et al., 1987

Tableau 3 : Distribution tissulaire et cellulaire du FGF basique

mésodermique et neuroectodermique telles que les cellules endothéliales (Maciag et al., 1982 ; Folkman et Klagsbrun, 1988), les cellules musculaires lisses (Winkles et al., 1987 ; Gospodarowicz et al., 1985), les cellules épithéliales (Courty et al., 1985 ; Barritault et al., 1981), les fibroblastes (Gospodarowicz et al., 1974), les myoblastes (Kardami et al., 1985), les myocytes (Lathrop et al., 1985a), les ostéoblastes (Canalis et al., 1987), les chondrocytes (Kato et Gospodarowicz, 1985), les cellules corticosurréaliennes (Schweigerer et al., 1987a), les oligodendrocytes (Eccleston et Silverberg, 1985), les astrocytes (Pettmann et al., 1985), les précurseurs neuronaux (Gensburger et al. 1987). Le cas des cellules tumorales sera abordé dans le paragraphe FGF et cancer.

Un effet différent des deux formes de FGFs a pu être rapporté sur les mélanocytes qui répondent à la forme basique exclusivement (Halaban et al., 1987).

- *Effets sur la différenciation cellulaire.* De nombreux types cellulaires répondant aux FGFs par une stimulation de leurs synthèses d'ADN peuvent également se différencier sous l'action de ces facteurs. C'est le cas notamment des cellules endothéliales (Presta et al., 1986), des myoblastes (Olwin and Hauschka, 1986), des myocytes (Lathrop et al., 1985a), des chondrocytes (Kato et Gospodarowicz, 1985), des oligodendrocytes (Rogister et al., 1988), des astrocytes (Morrisson et al., 1985). Pour certains types cellulaires, les FGFs n'ont pas d'effet mitogène mais agissent exclusivement sur la différenciation, c'est le cas des cellules lactotropes et thyrotropes de l'hypophyse (Baird et al., 1985e) des cellules tumorales (Mormède et al., 1988), et surtout des neurones (Morrisson et al., 1986, Walicke et al., 1986 ; Unsicker et al., 1987 ; Lipton et al., 1988) et des cellules de phéochromocytomes PC 12 (Togari et al., 1985) sur lesquelles les FGFs induisent la poussée de neurites.

- *Effets chémotactiques.* Une action chémotactique du FGF acide a été rapportée pour les cellules endothéliales (Terranova et al., 1985), les fibroblastes

et les astrocytes (Senior et al., 1986) et les cellules épithéliales (Vallès et al., 1990).

Le fait que les phénomènes de chémoattractisme nécessitent une réorganisation du cytosquelette, tout comme les phénomènes de prolifération et de différenciation, suggère que les effets chémoattractifs ne seraient que des conséquences secondaires de l'action du FGF sur les cellules. Cependant, de fortes concentrations de FGF acide qui inhibent les synthèses d'ADN des cellules BALB/c 3T3 permettent de stimuler leur mobilité (Chambard et al., 1987). Sur les cellules de carcinomes de vessie (NBTII), les FGFs acide et basique apparaissent mitogènes, alors que seul le FGF acide stimule la mobilité (Vallès et al., 1990). Ces résultats laissent supposer que les effets mitogènes et chémoattractifs des FGFs sont indépendants l'un de l'autre.

## VI - MECANISME D'ACTION

Le FGF, comme toutes les molécules "signal" de nature protéique interagit avec ses cellules cibles par l'intermédiaire de sites de fixation membranaires. Cette interaction déclenche un signal de transduction qui permettra d'aboutir à l'effet biologique. De plus, les FGFs sont capables de se fixer au niveau de certains éléments de la matrice extra-cellulaire. Nous aborderons successivement chacun de ces points.

### A) Détection des sites de fixation membranaires

Les sites de fixation membranaires des FGFs ont été détectés *in vitro*, à partir de cultures cellulaires et *in vivo* à partir de préparations membranaires. Les techniques classiques de la réceptologie ont été utilisées : dosages radiorécepteurs, pontages moléculaires.

### Dosages radiorécepteurs

Les études radiorécepteurs menées avec du FGF acide ont permis d'établir la présence de sites récepteurs de haute affinité sur de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les hépatocytes et les cellules épithéliales ainsi que sur les membranes cellulaires de cerveau, d'embryons de *Xenope* et de blastème de régénération du membre (tableau 4). Ces récepteurs ont une constante de dissociation (Kd) comprise entre 10 et 500 pM et leur nombre est compris entre 2000 et 180 000 sites par cellule. Dans le cas des cellules d'hépatome, de carcinome de vessie ainsi qu'au niveau des blastèmes de régénération du membre, une seconde catégorie de sites d'interaction, qualifiés de sites à basse affinité parce qu'ils présentent un Kd compris entre 2 et 10nM, ont pu être détectés. Leur capacité voisine de 200 000 sites par cellule apparaît, dans les mêmes conditions expérimentales, 10 fois supérieure à celle des sites de haute affinité.

Les dosages radiorécepteurs réalisés avec du FGF basique ont montré la présence de sites récepteurs à haute affinité sur les fibroblastes, les myoblastes, les cellules endothéliales et divers types de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* au niveau des membranes cellulaires de cerveau, de foie et de placenta (tableau 4). Ces récepteurs présentent un Kd compris entre 20 et 500 pM et une capacité comprise entre 5000 et 20000 sites par cellule. Comme dans le cas du FGF acide, des sites à basse affinité ont été détectés *in vitro* au niveau des cellules endothéliales, des cellules de cancer du sein et *in vivo*, au niveau des membranes cellulaires de cerveau, de placenta et de tumeurs mammaires. Ces sites d'interaction ont un Kd compris entre 2 et 10nM et une capacité de 200 000 à 600 000 sites par cellules.

### Pontages moléculaires

Les expériences de pontage covalent réalisés entre entre FGFs radiomarqués et protéines membranaires ont permis d'identifier des éléments récepteurs de PM compris entre 65 et 190 kDa (tableau 4). Le fait que la migration

	Kd	Nombre de sites/Cellule	Poids moléculaire kDa	Références
Fibroblastes 3T3 BHK	250 pM <sup>ab</sup> 46 pM <sup>a</sup>	87000 <sup>a</sup> /120000 <sup>b</sup> 60 000 <sup>a</sup>	145/125 <sup>ab</sup> 165 <sup>a</sup>	Neufeld et Gospodarowicz, 1985, Olwin et Hauschka, 1986 86
Cellules endothéliales	[ 20 pM <sup>b</sup> 2 nM <sup>b</sup>	80 000 <sup>b</sup> 600 000 <sup>b</sup>	150 <sup>a</sup>	Moscattelli, 1987
Cellules épithéliales	53 pM <sup>b</sup>	20 000 <sup>b</sup>	130 <sup>b</sup>	Friesel et al., 1986 Moënner et al., 1986
Cellules musculaires lisses	nd	nd	150 <sup>a</sup>	Winkles et al., 1987
Neurones	[500 pM <sup>b</sup> 120 pM <sup>b</sup>	16 500 <sup>b</sup> 35-60 000 <sup>b</sup>	135/85 <sup>b</sup>	Walicke et al, 1989
PC 12	258 pM <sup>b</sup>	100 000 <sup>b</sup>	145 <sup>b</sup>	Sharma et Dahiya, 1988
Hépatocytes	62 pM <sup>a</sup>	5 000 <sup>a</sup>	120000 <sup>a</sup>	Kan et al., 1989
Myoblastes	10 pM <sup>a</sup>	2 000 <sup>a</sup>	165 <sup>a</sup>	Olwin et Hauschka, 1986
Cellules tumorales				
Sein	300-700 pM <sup>b</sup>	100-200 000 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	Peyrat et al., en préparation
Rhabdomyosarcome	2 nM <sup>b</sup> nd	1000000 <sup>b</sup> nd		Hondermarck et al., 1990e
Bladder	[25 pM <sup>a</sup> 3 nM <sup>b</sup>	5 000 <sup>a</sup> 116 000 <sup>b</sup>	160 <sup>b</sup> 190/150/130 <sup>a</sup>	Schweigerer et al., 1987 Vallès et al., 1990
Hépatome	[ 9 pM <sup>a</sup> 2 nM <sup>a</sup>	15 000 <sup>a</sup>		Kan et al., 1988
Myoépithéliales	35-276 pM <sup>b</sup>	180 000 <sup>a</sup>	130 <sup>a</sup>	Ferning et al., 1990
<b>Tissus</b>		Nombre de sites/ mg protéines		
Cerveau	[30 pM <sup>b</sup> 3 nM <sup>b</sup>	0,24 pmoles <sup>b</sup> 51 pmoles <sup>b</sup>	170 <sup>b</sup>	Courty et al., 1988 Ledoux et al., 1989
Placenta	[10 pM <sup>b</sup> 60 nM <sup>b</sup>	10 fmoles <sup>b</sup> 26-240 fmoles <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup> /65 <sup>b</sup>	Hondermarck et al., 1990b
Blastème	[25 pM <sup>a</sup> 10 nM <sup>a</sup>	30 fmoles <sup>a</sup> 30 pmoles <sup>a</sup>	110/95 <sup>a</sup>	Boilly et al., 1990 Hondermarck et Boilly, 1990
Photorécepteurs de la rétine	[40 pM <sup>b</sup> 300000 pM <sup>b</sup>	nd	160 <sup>b</sup>	Mascarelli et al, 1989
Embryon entier de poulet	100 pM <sup>a</sup> 30 pM <sup>b</sup>	0 à 500 fmoles	150 <sup>a,b</sup>	Olwin et Hauschka, 1990 ab
Xénope embryon	140 pM <sup>a</sup>	nd	130/140 <sup>a</sup>	Gillespie et al, 1989
Invertébrés Néréis	[ 40 pM <sup>b</sup> 4 nM <sup>b</sup>	140 fmoles <sup>b</sup> 25 pmoles <sup>b</sup>	165/105/55 <sup>b</sup>	Blanckaert et al., 1990
<b>Tumeurs</b>				
Sein	500 pM <sup>b</sup> 5 nM <sup>b</sup>	200-500 fmoles <sup>b</sup> 15 pmoles <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	Peyrat et al., en préparation Hondermarck et al. 1990e
Gliomes	[16 pM <sup>b</sup> 61 nM <sup>b</sup>	13000 <sup>b</sup> 95000 <sup>b</sup>	145/130 <sup>b</sup>	Morrisson et al., 1990
Prostate	[43 pM <sup>a</sup> 238 pM <sup>a</sup>	11000 <sup>a</sup> 32000 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>	Manson et al., 1989

**Tableau 4** : Détection et caractérisation des récepteurs aux FGFs. Les études ont été réalisées avec le FGF acide <sup>a</sup> et/ou avec le FGF basique <sup>b</sup>.

électrophorétique des complexes FGF-récepteurs ne soit pas altérée en présence d'agents réducteurs (Kan et al., 1988 ; Olwin et Hauschka, 1986 ; Friesel et al., 1986) indique que le récepteur est probablement constitué d'une seule chaîne polypeptidique. L'hétérogénéité des PM recensés au niveau des différents types cellulaires se retrouve également pour un même type cellulaire au niveau duquel plusieurs formes de récepteurs avec des poids moléculaires variables peuvent être détectés. Quoique mal comprise, cette variabilité pourrait correspondre à l'existence de différentes formes de récepteurs, mais s'explique peut-être aussi par des dégradations protéolytiques et/ou glycolytiques intervenant pendant la préparation et le traitement des échantillons. En effet, le récepteur des cellules endothéliales peut être clivé chimiquement (Bromure de Cyanogène) et enzymatiquement (Trypsine) (Friesel et al., 1986), de plus, sur les neurones hypothalamiques, le récepteur apparaît sensible à la N-glycosidase F, enzyme glycolytique qui peut diminuer de 15% son PM (Feige et al., 1988).

Lorsque les expériences de pontage moléculaire sont menées simultanément avec les FGFs acides et basiques, il apparaît que ces deux facteurs se fixent au niveau d'éléments de même poids moléculaires. Ainsi, au niveau des cellules BHK-21 deux formes de PM 145 et 125 kDa fixent les deux formes de FGFs avec cependant une différence d'affinité : la forme de 145 kDa possédant une affinité plus importante pour le FGF basique et la forme de 125 kDa pour le FGF acide (Neufeld et Gospodarowicz, 1986). De même, au niveau des membranes cellulaires de cerveau (Ledoux et al., 1990) et de placenta (observations personnelles), les deux formes de FGs entrent en compétition au niveau d'éléments de même PM.

## **B) Sites de fixation à haute affinité**

### 1 - PURIFICATION

Le récepteur des FGFs a été purifié à partir de cellules d'hépatocarcinomes, de cerveau de rat et de boeuf, ainsi qu'à partir d'embryon de poulet.

Disorbo et al. (1988) purifient à partir de cellules d'hépatocarcinomes

(HepG2) une glycoprotéine membranaire avec des propriétés de récepteur pour le FGF acide. La technique utilisée, basée sur une chromatographie d'affinité sur Wheat germ agglutinine (WGA) a permis de purifier un élément récepteur de PM 130 kDa. Un traitement par la N-glycanase révèle que ce récepteur est glycosylé, le poids moléculaire de la fraction glycosidique étant de 17 kDa.

La nature glycoprotéique du récepteur fut confirmée par Feige et Baird (1988) sur les cellules BHK 21. Ces auteurs démontrèrent la présence de deux éléments récepteurs de PM 100 et 125 kDa qui sont glycosylés en deux formes mannosidiques de 115 et 140 kDa. Parce que la N-glycosidase et non l'endo  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase diminue le PM des récepteurs, ceux-ci sont considérés comme des glycoprotéines uniquement N-glycosylés. Par ailleurs, cette glycosylation est indispensable à la fixation du FGF basique.

Imamura et al. (1988) à partir du cerveau de rat et par utilisation de chromatographies d'affinité sur WGA et sur colonne de FGF basique immobilisée purifient deux éléments récepteurs de PM 140 et 110 kDa.

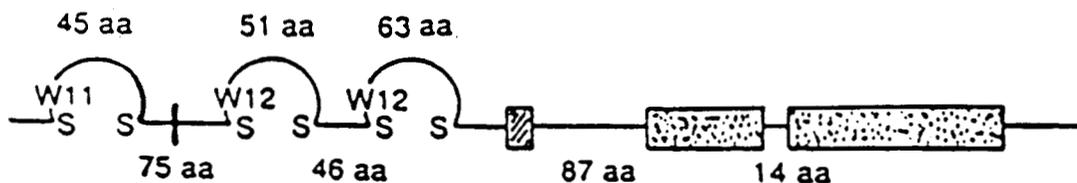
Méreau et al. (1989), à partir de cerveau de boeuf, par utilisation de chromatographie sur DEAE séphacryl et sur colonne Mono Q, suivie d'une chromatographie d'affinité sur bFGF immobilisé purifient deux éléments récepteurs de PM 120 et 100 kDa.

Burrus et Olwin (1990) par chromatographie sur WGA et aFGF-Sépharose et à partir d'embryons de poulet isolent un élément de PM de 150 kDa qui fixe à la fois le FGF basique et le FGF acide. Un traitement par la N-glycanase démontre que 10 kDa correspondent à une fraction oligosaccharidique N liée.

Aucun des travaux précités n'a permis d'établir la séquence en acide aminés ni la structure primaire oligosaccharidique des récepteurs purifiés.

Lee et al. (1989), à partir d'embryons de poulet par chromatographie d'affinité sur WGA et bFGF immobilisé purifient un récepteur pour le FGF basique de PM 130 kDa dont les fragments obtenus après digestion trypsique seront séquencés. Sur la base des éléments de séquence obtenus et à partir d'une banque d'ADNc d'embryon de poulet, la séquence déduite en acides aminés a pu être complètement déterminée. Le récepteur obtenu (Fig.3) est une protéine

transmembranaire qui contient 3 domaines extracellulaires de nature immunoglobulinique, une région acide, une région transmembranaire et un domaine tyrosine-kinase intracellulaire.



**Figure 3** : Schématisation de la structure du récepteur du FGF basique chez l'embryon de poulet (Lee et al., 1989). Les régions acides sont en noir, la région transmembranaire est hachurée, la région cytoplasmique de type tyrosine kinase est en pointillée. S : résidu cystéine - W : résidu tryptophane.

Les domaines extracellulaires sont qualifiés d'immunoglobuline-like sur la base de trois critères 1) La présence de deux résidus cystéine en position caractéristique dans chaque domaine 2) La présence de séquences composées de 11 ou 12 résidus tryptophane sur la liaison-COOH de la première cystéine et 3) La présence d'une séquence consensus DXGXYXC sur la liaison NH<sub>2</sub> de la deuxième cystéine de chacun des domaines. La présence de domaines immunoglobuline-like est fréquente au niveau des récepteurs de facteurs de croissance. Ainsi, les récepteurs de interleukine 1 possèdent également 3 domaines immunoglobuline-like (Sims et al., 1988), ceux du PDGF (Yarden et al., 1986) et du CSF1 (Coussens et al., 1986) en possèdent cinq. Cependant, entre le premier et le second domaine immunoglobulin-like, le récepteur du bFGF possède en plus une série consécutive de huit résidus acides (EDDDDEDD) complétés par 3 résidus sérine puis par 2 nouveaux résidus acides, ce qui n'est retrouvé chez aucun

autre membre de la famille des immunoglobulines. Quoique des séries de 17 à 35 résidus acides aient déjà été décrites pour des protéines intracellulaires et en particulier nucléaire, les régions acides sont inhabituelles dans la partie extracellulaire de récepteurs membranaires. En ce qui concerne la région juxtaposée à la membrane, elle comprend 87 acides aminés, ce qui est inhabituellement long par rapport aux récepteurs du PDGF (Yarden et al., 1986), du CSF 1 (Coussens et al., 1986) de l'EGF (Ulrich et al., 1984) et de l'insuline (Ulrich et al., 1985) qui n'en comprennent que 49 à 51.

La partie cytoplasmique du récepteur est composée de 424 acides aminés et contient une séquence de type tyrosine kinase (résidus 483 à 759). Cette séquence tyrosine kinase présentant 51 et 53% d'homologie avec les séquences tyrosine kinase des récepteurs du PDGF et du CSF1 (Hanks et al, 1988) est caractérisée par un motif GXGXXG et des résidus lysine conservés qui forment le site de fixation de l'ATP. Deux autres séquences caractéristiques de tyrosine kinase : HRDLAARNVL et DFGLAR ainsi qu'une tyrosine (position 651) sont homologues du site de phosphorylation de pp60<sup>v-src</sup>. Enfin, la séquence tyrosine kinase du récepteur au bFGF est interrompue par une séquence d'insertion de 14 acides aminés. La taille de cette séquence est similaire à celle présente chez le récepteur de l'insuline et des IGF 1 (Ulrich et al., 1985) mais plus courte que celle des récepteurs du PDGF et du CSF1 (104 et 70 acides aminés respectivement (Yarden et al., 1986 ; Coussens et al., 1986).

Lee et al., (1989) rapportent également que l'ADNc correspondant au récepteur du FGF basique des cellules endothéliales humaines, présente une grande homologie avec celui du poulet : 98-100% dans la région tyrosine kinase, 86% dans la région transmembranaire, 92% dans la région juxtaposée à la membrane, 79% dans la séquence d'insertion de la kinase et 80% dans la région C terminale, ce qui laisse supposer, comme dans le cas des FGFs eux-mêmes, un haut niveau de conservation de leurs récepteurs.

## 2 - BIOLOGIE MOLECULAIRE

Comme précédemment décrit, Lee et al. (1989) furent les premiers à avoir cloné et séquencé un ADNc codant pour le récepteur au FGF basique. Cet ADNc, obtenu sur la base de séquences tryptiques du récepteur purifié et par criblage d'une banque d'ADNc de poulet se révéla posséder une forte homologie avec deux autres ADNc partiellement clonés et séquencés : Flg et Bek. Flg et Bek possèdent tous deux une séquence tyrosine-kinase et furent isolés et partiellement clonés et séquencés respectivement chez l'humain (Ruta et al., 1988) et chez la souris (Kornbluth et al., 1988). De plus, Ruta et al. (1989), démontrent par utilisation d'anticorps dirigés contre un peptide synthétique de Flg, que ce gène correspond à une protéine membranaire capable de fixer spécifiquement les FGFs acide et basique et de déclencher des activités tyrosine kinase. Récemment, Dionne et al., (1990) ont complètement clonés et séquencés Flg et Bek chez l'humain confirmant ainsi leur homologie avec l'ADNc aviaire isolé par Lee et al. (1989).

Après transfection dans les cellules NIH 3T3, ces auteurs ont montré que Flg et Bek codent pour deux protéines membranaires de 150 et 135 kDa respectivement, dont 40 kDa correspondent dans les deux cas à une partie glycosidique. Ces deux protéines fixent de façon spécifique (Kd égal à 20-150 pM) les FGFs acide et basique. Par ailleurs, Pasquale et Singer (1989) ont cloné et séquencé à partir de l'embryon de poulet un ADNc appelé CeK1 qui s'avère être homologue de Flg. Enfin récemment, par la technique du polymérase chain reaction (PCR), Reid et al. (1990) ont montré que deux formes d'ARNm codant pour le récepteur du FGF basique sont exprimés dans le neuroépithélium d'embryon de souris. La première forme correspondant à la structure de l'ADNc décrit par Lee et al. (1989) chez le poulet, la seconde forme ne possède que 75% de correspondance (délétion de 89 acides aminés) et pourrait correspondre à une autre forme de récepteur.

### 3 - EXISTE-T-IL UNE OU PLUSIEURS FORMES DE RECEPTEURS POUR LES FGFs ?

La question de savoir si les FGFs interagissent avec les mêmes récepteurs membranaires n'est pas encore résolue. Sur les fibroblastes des lignées BHK, sur les NIH-3T3 (Neufeld et Gospodarowicz, 1986) et les myoblastes MM14 (Olwin et Hauscka, 1986), il a été montré que la fixation du FGF acide pouvait être déplacée par le FGF basique. De plus, au niveau de membranes de cerveau de cochon d'Inde (Ledoux et al., 1990), bien que le FGF basique possède un Kd de 15pM alors que celui du FGF acide est de 180 pM, ces facteurs entrent en compétition au niveau des sites récepteurs de haute affinité. Ces travaux suggèrent que les FGFs acide et basique agissent au niveau de leur cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs communs. Cependant, certains types cellulaires apparaissent stimulables par une seule des deux formes de facteur. Ainsi, les mélanocytes (Halaban et al., 1987, 1988) et les cellules épithéliales de cancer du sein (Takahashi et al. 1989) sont sensibles au FGF basique exclusivement. Par ailleurs, les cellules de carcinomes de vessie prolifèrent sous l'action des FGFs acide et basique mais seul le FGF acide est capable de modifier leur mobilité (Vallès et al., 1990). Les récentes données obtenues par des techniques de biologie moléculaire indiquent que les protéines codées par les gènes Flg et Bek reconnaissent avec une haute affinité les FGFs acide et basique, ce qui permet dans les 2 cas de déclencher une activité Tyrosine kinase (Ruta et al., 1989, Dionne et al., 1990). Cependant, le fait 1) qu'une multitude de séquences de type Flg aient été décrites (Lee et al., 1989 ; Pasquale et al, 1989 ; Safran et al., 1990 ; Reid et al., 1990) 2) que deux formes d'ARNm codant pour des FGFs-récepteurs ont été détectées dans le cerveau de souris (Reid et al., 1990) suggèrent l'existence de nombreuses formes de récepteurs qui pourraient réagir différemment vis-à-vis des différentes formes de FGFs.

Concernant les autres membres de la famille FGF (hst/ks ; int-2 ; FGF 5 ;

FGF 6 ; KGF/FGF7), bien que Mansukhani et al. (1990) aient montré que le récepteur du FGF basique transfecté dans les cellules CHO soit activé par le FGFb et le KFGF, on ne sait pas si les autres formes de FGFs interagissent par l'intermédiaire des mêmes récepteurs.

### C) Sites de fixation à basse affinité

Les FGFs acide et basique peuvent se fixer au niveau des surfaces cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs à haute affinité ( $K_d=10-500$  pM) mais aussi par l'intermédiaire de sites de fixation à basse affinité ( $K_d=2-10$ nM) qui ont été décrits pour certains types cellulaires ou certains tissus (cf dosages radiorécepteurs). Moscatelli (1987a) montre que ces sites de basse affinité pour le FGF basique sont sensibles à un lavage en présence de 2M NaCl et à un traitement par l'héparinase, contrairement aux sites récepteurs à haute affinité. Ces constatations ont permis de définir les sites de fixation de basse affinité comme étant des molécules "heparin-like". Par ailleurs, cet auteur rapporte que ces sites n'interviennent pas dans la stimulation des cellules endothéliales par le FGF basique. Récemment, Kiefer et al. (1990) ont pu définir la structure d'un protéohéparane sulfate qui pourrait correspondre aux sites de basse affinité. Pour ce faire, des cellules humaines dépourvues de sites de fixation du FGF ont été transfectées avec des ADNc clonés à partir des cellules BHK 21 (possédant des sites de fixation au FGF). Les clones qui exprimaient les protéines membranaires capables de fixer les FGFs ont été isolés par leur propriété à se fixer sur des boîtes de culture recouvertes de FGF. Les séquences des ADNc responsables de cette fixation ont été déterminées ; elles codent pour une protéine transmembranaire de PM 30 kDa ayant un domaine extracellulaire possédant des sites de fixation pour les protéohéparane sulfate et un domaine cytoplasmique capable de se lier à l'actine. Cette protéine est l'homologue d'un protéoglycane transmembranaire isolé chez la souris et appelé "Syndecan" (Saunders et al., 1989).

Cependant, aucun rôle n'a pu être attribué jusqu'à présent aux sites de fixation à basse affinité présents au niveau de la surface membranaire.

## D) Transduction

Les FGFs sont capables d'induire une grande variété d'effets biologiques au niveau de leurs cellules cibles. Cette grande variété semble se retrouver au niveau des signaux de transduction mis en jeu.

Dans les quelques minutes qui suivent la mise en contact des FGFs avec leurs cellules cibles, de nombreuses réactions de phosphorylation protéiques sont déclenchées. Ainsi, sur les cellules fibroblastiques 3T3, la fixation du FGF acide (Huang et Huang, 1986 ; Coughlins et al., 1988 ; Friesel et al., 1989) et du FGF basique (Coughlins et al., 1988 ; Pasquale et al., 1988) déclenche la phosphorylation de 3 protéines de PM 150, 130 et 90 kDa. Des expériences de pontage moléculaire utilisant des  $^{125}\text{I}$ -FGFs, ont montré que les protéines de PM 150 et 130 kDa, qui sont phosphorylées après action des FGFs, correspondent à des formes de récepteurs membranaires de ces facteurs de croissance (Huang et Huang, 1986 ; Coughlins et al. 1988 ; Friesel et al., 1989). L'analyse des acides aminés phosphorylés de la protéine de 90 kDa révèle que la phosphorylation porte pour 20% au niveau des tyrosines, pour 35% au niveau des thréonines et 45% au niveau des sérines. Sur les cellules CCL39, la fixation des FGFs acide et basique déclenche la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (Magnaldo et al., 1986), enfin, les phosphorylations d'une protéine de 34 kDa, apparentées à la lipocortine au niveau des cellules épithéliales du cristallin (Blanquet et al., 1988) ainsi que celles de protéines diverses au niveau des cellules PC12 (Togari et al., 1985) ont été relatées.

Les réactions de phosphorylation sont catalysées par une catégorie d'enzymes appelées kinases. Différentes kinases intervenant dans la transduction de signaux de communication cellulaire ont été recensées. On peut les regrouper en a) kinases activées par les nucléotides monophosphate cycliques, il s'agit de la kinase A et de la kinase G activées respectivement par l'AMPc et le GMPc. b) protéin kinase C

(PKC), kinase membranaire activée par le diacylglycérol (DAG). c) kinases  $Ca^{2+}$ /CAM, qui sont calcium calmoduline dépendante. Le calcium cytoplasmique pouvant provenir du milieu extracellulaire et entrer dans la cellule par l'intermédiaire de canaux ioniques, ou du réticulum endoplasmique duquel il peut être libéré sous l'action de l'IP3. d) Kinase faisant partie d'un récepteur membranaire dont l'activation pourra ainsi déclencher directement des phénomènes de phosphorylation.

Dans le cas des FGFs, l'activation kinasique semble être due à différents mécanismes suivant le type cellulaire considéré et la réponse cellulaire déclenchée.

- Une activation de la guanylate cyclase avec corrélativement une augmentation du taux de GMPc a été décrite sur les fibroblastes NIH-3T3 (Rudland 1974), de même une activation de l'adénylate cyclase avec production d'AMPc a été montrée sur les NIH-3T3 (Tsuda et al., 1986) et sur les cellules musculaires lisses humaines (Mioh and Cheng, 1987). Par contre, sur les PC12, la stimulation de la croissance des neurites et de l'ornithine décarboxylase par les FGFs n'entraîne pas une augmentation du taux d'AMPc (Damon et al., 1990).

- Une activation de la PKC a été décrite sur les cellules 3T3 (Tsuda et al. 85,86 ; Takeyama et al. ; Nanberg et al., 1990). De façon curieuse, alors que Tsuda et al. (1985) rapportent une mobilisation du calcium, Nanberg et al., (1990) ne constatent ni mobilisation du calcium, ni accumulation d'IP3. Sur les cellules endothéliales aortiques, l'activation de la PKC semble impliquée dans la transduction d'un signal mitogène, mais pas dans l'activation du plasminogène par le FGF basique (Presta et al., 1989 a-b). Cependant, dans le cas des fibroblastes CCL39, l'effet mitogène des FGFs acide et basique n'apparaît pas être médié par l'activation de la PKC (Magnaldo et al., 1986 ; Moenner et al., 1987) et dans le cas des PC12, ni l'activation de l'ornithine décarboxylase, ni la croissance des neurites stimulées par les FGFs ne nécessite une activation de la PKC (Damon et al., 1990).

De façon contradictoire, la production de diacylglycérol et la stimulation de la PKC ne semble pas accompagnée par la formation d'IP3 sur les types cellulaires jusqu'à présent étudiés (Magnaldo et al., 1986 ; Mioh et Chen 1987 ; Chambard et al., 1987 ; Moscat al., 1988). De plus, le fait que l'inositol monophosphate peut être formé en réponse au FGF suggère une formation de diacylglycérol par un autre mécanisme que celui faisant intervenir la phosphodiesterase (Moscat et al., 1988).

- La détermination de la structure primaire du récepteur au bFGF chez le poulet (Lee et al., 1989) indique la présence de séquence tyrosine kinase. Le récepteur du FGF, comme celui du PDGF (Yarden et al., 1986) peut donc déclencher lui-même des réactions de phosphorylation. Le fait qu'après action des FGF sur les cellules NIH-3T3, leurs récepteurs soient phosphorylés suggère une possibilité d'autophosphorylation du récepteur (Huang et Huang 1986 ; Blanquet et al., 1989),

- Une translocation et une accumulation du FGF basique dans le nucléole ont été rapportées et permettent une stimulation de la transcription de gènes ribosomiaux des cellules ABAE (Bouché et al., 1987). Par ailleurs ces phénomènes de translocation apparaissent spécifiques à la phase G1 du cycle cellulaire (Baldin et al., 1990).

- Enfin, une activation de divers mouvements ioniques a été décrite. Sur les 3T3, les FGFs déclenchent une augmentation du niveau de calcium cytoplasmique; ce calcium provenant uniquement de l'extérieur de la cellule (Magnaldo et al., 1986). De même une activation du transport de cations monovalents a été décrite sur les cellules Balbc 3T3 (Panet et al., 1986 ; Halperin et al., 1987).

L'ensemble de ces résultats montre une apparente diversité des voies de transduction utilisées par les FGFs, dont les mécanismes d'action permettant des effets pléiotropiques restent, comme dans le cas des autres facteurs de croissance,

à élucider.

### **E) Le devenir du ligand**

La fixation des facteurs de croissance au niveau de leur cellule cible peut être suivie d'une internalisation et d'une dégradation de ces facteurs. Cela a d'abord été montré pour le PDGF (Nilson et al., 1983), pour l'EGF (Plank et al., 1984) et plus récemment pour les FGFs basique (Moenner et al., 1987, 1989) et acide (Friesel et al., 1988).

Friesel et al., (1988) indiquent qu'après fixation sur son récepteur le FGF acide est rapidement internalisé par les cellules endothéliales mais n'apparaît pas dégradé avant les 2 heures suivant son internalisation. Cette dégradation donne lieu à la formation de deux fragments de PM 10 et 15 kDa qui persistent dans les cellules jusqu'à 24 heures après internalisation, alors que le FGF acide intact ne persiste que 6 heures. Le fait que la dégradation du FGF acide internalisé soit inhibée par des agents lysozomotropiques tels que la chloroquinine, indique une dégradation de ce facteur dans les lysozomes.

Moenner et al., (1987, 1989) montrent que le FGF basique est internalisé par les CCL39 après 5 heures d'incubation et que sa dégradation commence dès 30 minutes pour donner lieu à la formation de 2 fragments de 9 et 6 kDa qui sont encore détectables après 13 heures d'incubation. Comme dans le cas du FGF acide, l'utilisation de chloroquinine indique une dégradation dans le compartiment lysozomal. Moscatelli (1988), utilisant des cellules de capillaires bovins, rapporte une dégradation du FGF basique après internalisation qui après 2 heures aboutit à la formation de deux fragments de 18 et 16 kDa qui persisteront jusque 24 heures. Enfin, Bikfalvi et al., (1989) montrent que la dégradation du FGF basique par les cellules endothéliales humaines aboutit à la formation de 3 fragments de PM 15,10 et 8 kDa. Une étude cinétique de la dégradation suggère que le FGF basique est d'abord dégradé pour donner le fragment de 15 kDa qui donnerait ensuite un fragment de 10 puis 8 kDa.

L'ensemble de ces données montre que, contrairement à d'autres facteurs de croissance (James et Bradshaw, 1984), les FGFs sont faiblement et surtout lentement dégradés après leur internalisation dans la cellule.

#### **F) Interaction avec l'héparine et les matrices extra-cellulaires**

Les FGFs possèdent une forte affinité pour l'héparine (Gospodarowicz et al., 1984 ; Lobb and Fett, 1984), ce qui a permis leur purification à partir de nombreux tissus (cf paragraphe : distribution tissulaire et cellulaire). De plus, l'interaction de l'héparine avec ces facteurs de croissance permet leur stabilisation vis-à-vis des changements de température, de pH (Gospodarowicz et al., 1986) et des dégradations protéolytiques (Rosengart et al., 1988 ; Sommer and Rifkin, 1988). Enfin, l'activité biologique du FGF acide est fortement potentialisée par l'héparine (Thomas et al., 1984 ; Ulrich et al., 1986 ; Wagner et Damore, 1986), alors que celle du FGF basique est inhibée par cette catégorie de glycosaminoglycannes (Gospodarowicz et al., 1986 ; Ulrich et al., 1986).

Cependant, l'héparine est un mélange hétérogène de glycosaminoglycannes sulfatés. Barzu et al., (1989) ont dépolymérisé par l'acide nitreux une préparation standard d'héparine de mucus de porc de façon à obtenir un mélange d'oligosaccharides (tétra-déca-saccharides) puis ont soumis ces oligosaccharides à une chromatographie d'affinité sur FGF basique immobilisé. Après séparation des oligosaccharides obtenus sur la colonne de FGF basique, par chromatographie de gel filtration, les fractions obtenues sont testées pour leurs aptitudes à protéger et à potentialiser le FGF acide au niveau des cellules endothéliales humaines. Il a ainsi pu être montré que la capacité de protection et de potentialisation du FGF acide augmente en fonction de la taille des fragments et pour une même taille, en fonction de la charge anionique des fragments oligosaccharidiques. Sudhalter et al., (1989), utilisant un protocole expérimental similaire, montrent que les oligosaccharides faiblement sulfatés sont incapables de potentialiser le FGF acide, alors que les oligosaccharides moyennement sulfatés le potentialisent modérément si leur taille est de 8 à 10 monosaccharides. Pour les formes hautement sulfatées,

une stimulation équivalente à celle de l'héparine est atteinte pour une taille d'au moins 12 monosaccharides ; les octo-décasaccharides stimulent modérément, les hexasaccharides sont sans effet.

Les propriétés de fixation, de protection, de modulation de l'activité des FGFs sont retrouvées pour les héparanes sulfates protéoglycannes (HSPG) (Vigny et al., 1988) et les glycosaminoglycannes (GAGs) de type héparane-sulfate (Saksela et al., 1988 ; Gordon et al., 1989). L'héparine et les héparanes sulfates sont trouvés naturellement dans les matrices extracellulaires (MEC) (Revue dans Ruoslahti, 1988), de fait les MEC *in vitro* (Baird et al., 1987 ; Bashkin et al., 1989) et *in vivo* (Jeanny et al., 1987 ; Vigny et al., 1988 ; Hondermarck et al., 1990ab ; Hondermarck and Boilly, 1990) peuvent fixer les FGFs acide et basique par l'intermédiaire de molécules "heparin-like", alors que les chondroïtines sulfates, kératanes sulfates ou l'acide hyaluronique ne semblent pas intervenir dans la fixation de ces facteurs de croissance. Par ailleurs, le FGF basique se fixe de façon plus importante que le FGF acide au niveau des matrices extracellulaires, ce qui reflète probablement la différence d'affinité de ces facteurs pour l'héparine. De plus, les FGFs sont présents naturellement dans les MEC *in vitro* (Baird et al., 1987 ; Vlodavsky et al., 1987 ; Folkman et al., 1988) et *in vivo* (Vigny et al., 1988 ; Silverstein et al., 1989 ; Dimario et al., 1989 ; Gonzalès et al., 1990). La signification biologique de la présence des FGFs dans les matrices extracellulaires n'est pas clairement établie, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. Baird et al., (1987), Folkman et al. (1988), Vlodavsky et al. (1987) ont proposé que les MEC seraient un lieu de stockage des FGFs, ces facteurs pouvant être remis à disposition des cellules après hydrolyse de la MEC. De fait, les FGFs stockés dans les MEC peuvent en être libérés sous l'action d'enzymes de type héparinase (Gajdusek et Cardon, 1989 ; Bashkin et al., 1989 ; Presta et al., 1989) et protéolytiques (Saksela et al., 1989b ; Mignati et al., 1989) sous une forme biologiquement active. Moscatelli et al., (1988) ont montré que des FGFs basiques ajoutés à une culture cellulaire s'équilibrent entre les sites de fixation membranaires et les sites de fixation matriciels et que les FGFs fixés sur ces récepteurs membranaires peuvent, après décrochage (par diminution du pH)

regagner la MEC dont la fonction pourrait donc être de réguler la disponibilité de ces facteurs pour leurs récepteurs cellulaires. Flaumenhaft et al., (1989) démontrent que les cellules endothéliales bovines en culture sont stimulables à long terme par le FGF basique et ce, que l'exposition à ce facteur soit brève (10-30 mn.) ou continue. De plus, une élimination du FGF basique des MEC (2M NaCl) ne permet plus un effet à long terme de ce facteur. Ces résultats suggèrent qu'une occupation permanente des récepteurs est nécessaire pour une action à long terme du FGF basique et que la MEC serait une source continue de ce facteur pour les cellules.

L'ensemble de ces résultats permet de proposer un schéma général des interactions FGF-MEC. Les FGFs seraient 1) fixés dans les MEC et ainsi protégés des phénomènes de dégradation 2) libérés par dégradation des MEC sous la forme de complexes FGF-HSPG ou FGF-GAG qui, ne se fixant plus aux MEC, pourraient diffuser jusqu'à leurs cellules cibles et se fixer au niveau des récepteurs membranaires. La MEC constituerait ainsi un réservoir de FGFs mais de plus, régulerait leur biodisponibilité.

### **G) Relation structure-fonction**

L'étude de la relation structure-fonction des protéines est basée sur 4 types de méthodologies : 1) l'utilisation de peptides synthétiques dérivant de la protéine à étudier 2) l'utilisation d'anticorps dont la spécificité a été préalablement définie 3) la modification chimique et enzymatique de la protéine 4) la modification de la structure de la protéine directement par mutagenèse (site-directed mutagenesis).

Dans le cas des FGFs, différentes techniques (1+3+4) ont été utilisées, cependant les éléments structuraux qui permettent l'activité des FGFs sont encore mal connus.

Schubert et al., (1987) démontrent que le peptide FGF (24-68) - NH<sub>2</sub> ainsi que les fragments (1-24) - NH<sub>2</sub> et (93-120) - NH<sub>2</sub> sont capables de favoriser l'adhésion des cellules PC12 à leur substrat. Ces auteurs concluent de leur étude que ni la charge nette, ni la structure secondaire, ni une combinaison de ces deux

paramètres ne suffisent à modifier l'adhésion cellulaire par les FGFs qui serait donc attribuable à des séquences spécifiques.

Baird et al., (1988) ayant synthétisé 25 peptides dont les séquences englobent la structure primaire complète du FGF basique (décrite par Ueno et al., 1986a), ont pu identifier deux domaines fonctionnels de liaison aux récepteurs et à l'héparine. Les peptides correspondants aux séquences FGF (24-68) - NH<sub>2</sub> et FGF (106-115) - NH<sub>2</sub> apparaissent capables de se fixer au niveau du récepteur des cellules BHK21 ainsi qu'au niveau de l'héparine et de moduler la réponse cellulaire au FGF basique.

Utilisant la fabrication par génie génétique de formes tronquées du FGF basique, Seno et al. (1990), montrent que l'affinité du FGF basique pour l'héparine dépend significativement de sa structure carboxy-terminale et particulièrement de la séquence Asp41-Ser100. De plus, la séquence Phe139-Leu 140-Pro141, présente chez tous les membres de la famille des FGFs, contribue fortement à la stabilité de la structure du FGF basique.

Concernant le rôle d'acides aminés particuliers, Harper et Lobb (1988), par méthylation réductive du FGF acide identifient la Lys 118 comme étant impliquée dans la fixation de ce facteur au niveau du récepteur et de l'héparine. Le rôle des résidus cystéïnes dans la maintenance de la structure tertiaire n'est pas encore bien défini. Deux résidus cystéïnes (position 34,101) apparaissent positionnellement conservés, suggérant qu'elles sont impliquées dans l'élaboration de ponts disulfures (Thomas, 1987). Cependant une alkylation du FGF basique suggère que ces résidus cystéïnes sont libres (Esch et al., 1985). De plus, une réduction du FGF acide (Mc Keehan et Crabb, 1987) ou un remplacement des résidus cystéïnes par des résidus sérines (Seno et al., 1988) n'affecte que faiblement l'activité biologique. Enfin, Esch et al. (1985b) ont proposé que les résidus cystéïnes pourraient être impliqués dans une liaison avec d'autres molécules.

Le FGF basique possède des séquences consensus pour la phosphorylation par la protéine kinase A et la protéine kinase C. De fait, Feige et al., (1988a ; 1989) ont montré que le FGF basique est un substrat pour la PKA et la PKC et que le FGF acide peut être phosphorylé par la PKC uniquement. Par ailleurs, les cellules

endothéliales en culture sont capables de phosphoryler le FGF basique (Feige et al., 1989b). La signification physiologique de cette phosphorylation n'est pas claire : en effet, la phosphorylation du FGF basique par la kinase A concerne la Thréonine 121 qui est située dans le domaine de fixation au récepteur, ce qui confère une plus forte affinité au FGF basique ; mais cela n'augmente pas son activité biologique au niveau des cellules endothéliales par rapport à une forme non phosphorylée.

La structure primaire du récepteur ayant été découverte récemment (Lee et al., 1989), aucun renseignement n'est disponible actuellement sur la relation structure-fonction du/des récepteur(s) aux FGFs. Néanmoins, Feige et al., (1988b) démontrent que sur les cellules 3T3, la déglycosylation du récepteur s'accompagne d'une perte de sa capacité à fixer le FGF basique.

## VII - FGFs ET PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES

Les propriétés *in vitro* des FGFs indiquent que ces facteurs de croissance ont des effets très divers sur de nombreux types cellulaires, cependant leurs fonctions et effets *in vivo* sont moins bien connus mais suscitent un intérêt croissant motivé notamment par les importantes potentialités thérapeutiques qu'offrent ces molécules.

### A) Angiogenèse

La formation des vaisseaux et capillaires sanguins fait intervenir des phénomènes de migration, de prolifération, de différenciation des cellules endothéliales, la formation de nouveaux capillaires, la digestion et la production de MEC.

Chacun de ces processus peut être régulé par les FGFs qui sont capables :

1) de stimuler la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Böhlen et al., 1984-1985 ; Conn et Hatcher, 1984 ; Maciag et al., 1982 ; D'Amore et Klagsbrun, 1984 ; Gospodarowicz et al., 1976) et *in vivo* (Buntrock et al., 1984 ;

Linder et al., 1990) ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses (Gospodarowicz et al., 1985 b) ;

2) de favoriser la migration des cellules endothéliales (Presta et al., 1986 ; Herman et D'Amore, 1984 ; Terranova et al., 1985) ;

3) d'induire la différenciation des cellules endothéliales (Gospodarowicz et al., 1980) notamment par la production d'un revêtement non thrombogénique (Vlodavsky et al., 1979), la synthèse préférentielle de certains types de collagène (Scheffer et al., 1982) et l'organisation en structure tubulaires *in vitro* (Montaseno et al., 1986) ;

4) d'induire la formation de nouveaux capillaires (Lobb et al., 1985 ; Gospodarowicz et al., 1985 ; Cuevas et al., 1988c) ;

5) d'activer la dégradation des MEC en augmentant la libération par les cellules endothéliales de protéases : la collagénase (Presta et al., 1986 ; Chua et al., 1987) et l'activateur du plasminogène (Presta et al., 1986 ; Montaseno et al., 1986). Par ailleurs, les FGFs peuvent stimuler la production de nouveaux composants matriciels comme le collagène (Gospodarowicz et al., 1980 ; Davidson et al., 1985) la fibronectine (Gospodarowicz et al., 1980) et les glycosaminoglycannes (Gordon et al., 1985). La production d'inhibiteurs de la dégradation des matrices tels que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène a également été rapportée après stimulation par les FGFs (Saksela et al., 1987).

La plupart des propriétés précédemment rapportées, ont été observées *in vitro* et il n'est pas certain que l'on puisse toutes les extrapoler *in vivo*. Néanmoins, les FGFs déclenchent la croissance de nouveaux capillaires et vaisseaux sanguins après implantation dans la membrane chorio-allantoïque d'embryon de poulet, dans la cornée de lapin ou dans la joue du hamster (Lobb et al. 1985) qui constituent les tests d'évaluations classiques de l'activité angiogène *in vivo*. Une stimulation de l'angiogenèse a également été observée après injection dans le cerveau (Cuevas et al, 1988c) ainsi qu'au niveau du mur aortique (Baird et al, 1987). De plus, des anticorps anti-FGF basique sont capables d'inhiber la vascularisation lorsqu'ils sont injectés chez des embryons de rat (Liu et Nicoll, 1988).

Ces propriétés angiogènes des FGFs laissent entrevoir des potentialités

thérapeutiques pour ces facteurs de croissance dans le traitement des ischémies ou la réparation des endothéliums après lésion. Nous avons montré (Hondermarck et al., 1990a) qu'après injection dans la circulation sanguine, les FGFs acide et basique disparaissent rapidement du flux sanguin pour se fixer au niveau des endothéliums de divers organes et particulièrement au niveau du foie, de la rate et des reins. Les caractéristiques de cette fixation (sensibilité au 2M NaCl, compétition avec l'héparine) montrent que celle-ci s'effectue par l'intermédiaire de composés "héparine-like" présents à la surface des endothéliums. Des travaux antérieurs ont montré qu'*in vitro*, la fixation des FGFs au niveau des MEC des cellules endothéliales permet d'une part la protection de ces facteurs de croissance (Gospodarowicz and Cheng 1986 ; Presta et al., 1989) et d'autre part, la stimulation à long terme des cellules endothéliales (Flaumenhaft et al., 1989). Ainsi, ces résultats permettaient de penser que les FGFs pouvait être utilisés en injection intravasculaire pour la réparation des endothéliums. Cette hypothèse fut récemment confirmée (Linder et al., 1990).

## B) Cancer

Les FGFs acide et basique :

1) sont produits par de nombreuses cellules tumorales en culture telles que les cellules dérivées d'hépatomes (Klagsbrun et al., 1986) de médulloblastomes (Lobb et al., 1986) de rhabdomyosarcomes (Schweigerer et al., 1987a) de rétinoblastomes (Schweigerer et al., 1987c), de neuroblastomes (Huang et al., 1987), de gliomes (Libermann et al., 1987), de leucémies (Moscatelli et al., 1986) et de tumeurs mammaires (Flamm et al. 1989);

2) sont présents dans de nombreuses tumeurs telles que les chondrosarcomes (Shing et al., 1984), les mélanomes (Lobb et al., 1986a), les tumeurs du sein (Rowe et al., 1986), de la vessie (Chodak et al., 1986) et de la prostate (Matsuo et al., 1987). Par ailleurs, l'expression d'oncogènes de la famille des FGFs : int 2, hst/KFGF, FGF5 et FGF6 a été rapportée dans diverses cellules tumorales (Zhan et al., 1988 ; Marics et al., 1989) ;

3) possèdent des récepteurs qui ont pu être caractérisés au niveau des cellules de phéochromocytomes PC12 (Sharma and Dahiya, 1989), de rhabdomyosarcomes (Schweigerer et al., 1987), d'hépatomes (Kan et al., 1989), de gliomes (Morrison et al., 1990), des cellules carcinomaires de vessie (Vallès et al., 1990).

Récemment, nous avons montré la présence de récepteurs pour les FGFs sur différentes lignées cellulaires de cancer du sein, ainsi qu'au niveau de biopsies obtenues chez les malades (Peyrat et al., en préparation ; Hondermarck et al., 1990e);

4) sont actifs sur la prolifération et la différenciation des cellules tumorales en accord avec leurs effets pléiotropiques déjà reportés (cf propriétés biologiques *in vitro*).

Les FGFs acide et basique apparaissent transformant après transfection de leur ADNc dans les cellules NIH 3T3, cependant, cet effet n'est obtenu que si une séquence signal (permettant leur sécrétion) est présente (Rogeljer et al., 1988 ; Blam et al., 1988) ; d'ailleurs, les oncogènes hst/KFGF qui possèdent une séquence signal ont un pouvoir transformant 10 à 100 fois supérieur à celui du FGF basique (Quarto et al., 1989). Outre leur action au niveau des cellules tumorales elles-mêmes, les FGFs par leurs propriétés angiogéniques pourraient activer la vascularisation et donc la croissance des tumeurs (Folkman, 1972). Les données acquises jusqu'à présent sur les relations FGFs et cancer permettent d'entrevoir des possibilités d'applications dans le diagnostic ou le traitement des cancers. La distribution différente des FGFs et de leurs récepteurs au niveau des cellules tumorales et des biopsies permet de mieux caractériser les tumeurs, de définir leur sensibilité aux FGFs et d'espérer pouvoir intervenir sur leur croissance.

### C) Cicatrisation et réparation tissulaire

Le fait que les FGFs sont retrouvés dans la plupart des tissus de l'organisme (cf : paragraphe distribution tissulaire) et sont actifs sur tous les types cellulaires impliqués dans les processus de cicatrisation et de réparation tissulaire (Dijke and Iwata, 1989, paragraphe propriétés biologiques *in vitro*) laisse supposer que ces facteurs interviennent naturellement pendant ces processus et que leurs potentialités thérapeutiques sont importantes.

Ainsi, il a pu être montré que les FGFs qui sont présents dans l'oeil (Courty et al., 1985 ; D'Amore et Klagsbrun, 1984) sont capables *in vitro*, de stimuler la prolifération des cellules épithéliales de la cornée (Gospodarowicz et al., 1977 ; Barritault et al., 1981), du cristallin (Gospodarowicz et al., 1987 ; Barritault et al., 1981) et des cellules endothéliales de la rétine (Bensaïd et al., 1989). *In vivo*, les FGFs favorisent la cicatrisation de l'épithélium (Smith et al., 1981 ; Petroutos et al., 1984 ; Muller et al., 1985 ; Thompson et al., 1982) et de l'endothélium (Gospodarowicz and Greenburg, 1979), de cornée après lésion.

De même, les FGFs stimulent la croissance des cellules osseuses *in vitro* (Rodan et al., 1987 ; Globus et al., 1988) et favorisent la régénération du cartilage (Jentzsch et al., 1980 ; Cuevas et al., 1988a) et la vascularisation d'une greffe osseuse (Eppley et al., 1988).

Au niveau de la peau, les FGFs sont mitogènes *in vitro* pour les fibroblastes (Gospodarowicz et al., 1976), les kératinocytes (Halaban et al., 1987 ; O'Keffe et al., 1988) et les mélanocytes (Halaban et al., 1988) et paraissent pouvoir être utilisés *in vivo* dans la cicatrisation de l'épiderme (Fourtanier et al., 1986 ; Barritault et al., 1990).

Enfin, les FGFs pourraient également trouver une application au niveau des transplantations tissulaires dont ils favoriseraient la survie, notamment en accélérant la vascularisation (Eppley et al., 1988 ; Hayek et al., 1987 ; Thompson et al., 1988).

## D) Régénération du membre et du cristallin

L'un des premiers effets *in vivo* des FGFs à avoir été découvert, est leur propriété à stimuler la régénération du membre des amphibiens. Après amputation de leur membre, les amphibiens Urodèles cicatrisent leur blessure puis régénèrent les structures manquantes. Ce processus commence après la cicatrisation par la formation d'un blastème de régénération constitué d'un massif de cellules mésenchymateuses surmonté d'une enveloppe épidermique. La prolifération des cellules du blastème qui permettra d'aboutir à un nouveau membre est sous le contrôle d'activités facteurs de croissance émanant d'une part, des fibres nerveuses arrivant au contact du blastème et, d'autre part, de l'enveloppe épidermique. La nature de ces activités facteur de croissance reste très mal connue, cependant, les FGFs sont capables de stimuler : 1) l'activité mitotique après injection dans le blastème (Gospodarowicz and Mescher, 1981 ; Mescher and Lobb, 1980) 2) les synthèses d'ADN et de protéines dans des blastèmes placés en culture organotypique (Mescher et lobb, 1980) 3) la prolifération des cellules blastémales en culture (Albert et al., 1987).

Jusqu'à présent, bien que le FGF soit actif sur la prolifération des cellules impliquées dans la régénération du membre, on ne savait pas s'il jouait naturellement un rôle dans ce processus. Récemment, nous avons montré la présence du FGF acide et de ses récepteurs dans le blastème de régénération d'*Axolotl* (Boilly et al., 1990 ; Hondermarck and Boilly, 1990). Le FGF acide identifié sur la base de son affinité pour l'héparine, de son activité biologique potentialisée par l'héparine et de son immunoréactivité vis-à-vis d'anticorps spécifiques apparaît en quantité trois fois plus importante dans le mésenchyme que dans l'épiderme. Les récepteurs du FGF ont été identifiés par analyses de Scatchard sur préparations de membranes et par pontage moléculaire. Une étude radioautographique de leur distribution indique que les récepteurs de haute affinité seraient présents essentiellement dans le mésenchyme. Ces résultats nous permettent de postuler que le FGF acide serait produit par la cape épidermique et diffuserait vers les cellules du mésenchyme sur lesquelles il agirait par

l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Dans le cas de la régénération du cristallin à partir de l'iris (chez les amphibiens), la présence de la rétine est absolument nécessaire. Or, la rétine contient du FGF (Barritault et al., 1981) et le FGF basique est capable de stimuler la croissance des cellules cristallines en culture (Courty et al., 1985 ; Gospodarowicz et al., 1977) et de favoriser la régénération du cristallin *in vivo* (Yamada, 1982).

### E) Régénération nerveuse

Les FGFs ont de nombreux effets sur les cellules nerveuses. En effet, ils apparaissent :

1) mitogènes pour les astrocytes (Pettmann et al., 1985 ; Morrisson et De Vellis, 1981), les oligodendrocytes (Eccleston and Silverberg, 1985 ; Saneto and De Vellis, 1985) et les cellules de Schwann (Pruss et al., 1981),

2) capables de stimuler d'autres paramètres des cellules gliales tels que la migration (Senior et al., 1986), la libération d'activateur du plasminogène (Rogister et al., 1988), la synthèse de GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Morrisson et al., 1985 ; Weibel et al., 1985), l'activité 5'- déiodinase (Courtin et al., 1990), des astrocytes ; par ailleurs, ils peuvent modifier la morphologie de ces cellules (Weibel et al., 1985),

3) capables de favoriser la survie et la croissance des neurones en culture (Morrisson et al., 1986 ; Walicke et al., 1986 ; Unsicker et al., 1987 ; Schubert et al., 1987) et de stimuler divers autres propriétés des neurones comme la synthèse de choline acétyl-transférase (Unsicker et al., 1987).

Des études récentes ont montré que les FGFs administrés dans le système nerveux central et périphérique peuvent exercer des effets neurotrophiques. L'administration de FGF basique dans les ventricules prévient la mort des neurones cholinergiques après lésion de l'hippocampe (Anderson et al., 1988). Après injection dans la circulation de l'embryon de poulet, le FGF basique prévient la mort des neurones cholinergiques (Dreyer et al., 1989) et après

administration dans du "gelfoam", il apparaît capable de diminuer la mort neuronale, en particulier celle des neurones cholinergiques après blessure (Otto et al., 1989). Enfin, une réaction astrocytaire et une augmentation de l'activité acétyl choline transférase sont observées après injection de FGF basique dans le cerveau de rat après section partielle de la fimbria (Barotte et al., 1989). Concernant le système nerveux périphérique, le FGF basique a été montré favoriser la régénération du nerf optique (Sievers et al., 1987), du nerf sciatique (Danielsen et al., 1988 ; Otto et al., 1987 ; Cordeiro et al., 1989 ; Aebischer et al., 1989). Le FGF acide apparaît favoriser la régénération des neurones de rétine en culture (Lipton et al., 1988), dans ce cas, les auteurs rapportent un effet différentiel des FGFs acide et basique ; le FGF acide étant beaucoup plus actif que son homologue basique.

Ces effets des FGFs sur la régénération nerveuse *in vivo* ne doivent pas s'interpréter uniquement comme un reflet des propriétés neurotrophiques de ces facteurs *in vitro*. En effet, la régénération nerveuse fait intervenir de nombreux processus physiologiques (migration, prolifération cellulaire, angiogenèse) dans lesquels divers types cellulaires (cellules neuronales mais aussi gliales et endothéliales) interviennent ; chacun d'entre eux pouvant être stimulé par les FGFs.

L'ensemble de ces données permet d'entrevoir d'énormes possibilités thérapeutiques pour les FGFs dans le domaine de la régénération nerveuse.

## **F) Développement embryonnaire**

Le développement embryonnaire étant marqué par d'intenses phases de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire, il constitue un modèle de choix pour appréhender le rôle *in vivo* des facteurs de croissance et en particulier des FGFs.

Chez tous les vertébrés, la totalité des organes provient des trois feuilletts fondamentaux de l'embryon : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Au cours des phases précoces du développement, ces 3 feuilletts vont progressivement

se déterminer. Le premier feuillet à être déterminé est l'endoderme, qui, au stade blastula induira la formation du mésoderme à partir des cellules de la zone marginale. Chez le Xénope, cette induction du mésoderme peut être provoquée expérimentalement sous l'action des FGFs (Slack et al., 1987 ; Kimelman et Kirschner, 1987). Par ailleurs, les FGFs (Kimelman et al., 1988 ; Slack et Isaacs, 1989) et leurs récepteurs (Gillespie et al., 1989) sont naturellement présents dans l'oeuf de Xénope. L'ensemble de ces résultats suggère que les FGFs seraient les inducteurs naturels du mésoderme ; une fonction similaire a été proposée pour le TGF  $\beta$  (voir revue Paterno et Gillespie, 1989). Cette hypothèse d'une fonction des FGFs dans l'induction du mésoderme, élaborée chez le Xénope, a récemment été confirmée chez le poulet (Mitrani et al., 1990).

Durant les phases ultérieures du développement, les FGFs et leurs récepteurs ont également été recherchés.

Le premier organe impliqué dans le développement embryonnaire à avoir fait l'objet de recherches a été le placenta. Gospodarowicz et al. (1985) ont montré la présence de FGF basique dans le placenta humain. Cependant, on ne savait pas si le FGF basique était utilisé sur place ou transitait simplement à travers le placenta . Nous avons résolu cette question en démontrant la présence dans le placenta de souris, de récepteurs pour le FGF basique (Hondermarck et al., 1990b). De plus, le fait que le nombre de ces récepteurs diminue de façon importante entre 12 et 14 jours de grossesse, en même temps que le niveau de synthèse d'ADN, suggère que le FGF basique serait impliqué dans le contrôle des phénomènes de prolifération cellulaire inhérent à la croissance placentaire (Hondermack et al., 1990d). Enfin, par radioautographie, nous avons montré une fixation du FGF basique au niveau des vaisseaux et capillaires sanguins, ce qui nous amène à penser que ce facteur pourrait contrôler la mise en place de la vascularisation du placenta (Hondermarck et al., 1990d).

Concernant l'embryon lui-même, Seed et al., (1988) ont détecté la présence de FGF dans l'embryon de poulet entier et ont mesuré l'évolution de sa quantité au cours du développement. Il apparaît que le taux de FGF dans l'embryon est relativement stable de E2 (2ng/mg de protéine) à E9 (3,6 ng/mg de protéine) et

augmente spectaculairement de E11 (5,7ng/mg de protéine) à E13 (15ng/mg de protéine). La localisation immunocytochimique du FGF montre que celui-ci se retrouve dans l'ensemble de l'organisme, soit associé aux matrices extra-cellulaires (Gonzalès et al., 1990) soit à l'intérieur des cellules et particulièrement des cellules musculaires (Silverstein et al., 1989). Olwin and Hauschka (1990a) ont montré que le taux de récepteurs au FGF diminue entre E7 (56 fmole/mg de protéine) et E13 (18 fmole/ng de protéine). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité des FGFs *in vivo* est régulée par l'expression de leurs récepteurs. Olwin et Hauschka (1990a) indiquent également que le nombre de récepteurs au FGF basique présents au niveau des muscles squelettiques, diminue entre E13 (15 f mole/ng de protéine) et E18 où ils ne sont plus détectables. Ces résultats sont à rapprocher du fait que les cellules musculaires squelettiques contiennent du FGF basique (Silverstein et al., 1989) et perdent leurs récepteurs durant la phase finale de différenciation (Olwin et Hauschka.,1988), ce qui suggère que la présence des récepteurs au FGF est associée aux phases de prolifération cellulaires. Liu and Nicoll (1988) ont montré que des anticorps anti-FGF basique étaient capables de retarder la croissance et la différenciation de l'ensemble des tissus embryonnaires et particulièrement des tissus d'origine mésodermique.

La présence de FGF au niveau d'organes embryonnaires particuliers a été rapportée dans le cas du bourgeon de membre (Seed et al., 1988 ; Munaim et al., 1988), du rein (Risau and Ekblom 1986), de la rétine et de l'humeur vitrée (Mascarelli et al., 1987). L'évolution de la quantité de FGF n'a été étudiée que dans le cas du bourgeon de membre dans lequel le taux de FGF est plus élevé aux environs du 3e jour de développement qu'aux autres stades étudiés (Seed et al., 1988 ; Munaim et al., 1988). Le fait que le FGF stimule, *in vitro*, la prolifération des cellules du bourgeon et que le niveau de stimulation dépende de la position d'origine des cellules dans le membre, suggère une propriété morphogène du FGF au cours du développement (Aono et al., 1988).

Concernant la rétine, la présence de FGF montrée chez le poulet à 11 jours de développement (Mascarelli et al., 1987), a été complétée par la détection de sites

de fixations spécifiques pour le FGF basique dans la rétine de souris (Jeanny et al., 1986 ; Fayein et al., 1990). Par des techniques de radioautographie sur coupes d'oeil, ces auteurs ont mis en évidence deux catégories de sites de fixation. Une première catégorie de sites sont héparinase sensibles, possèdent un Kd de 2,5 nM et apparaissent au 9<sup>e</sup> jour de développement. Une deuxième catégorie de sites est N-glycannase mais non héparinase sensible, possède un Kd de 280 pM et apparaît à partir de 17-18 jours de développement. Quoique la signification de ces deux catégories de sites ne soit pas connue, ces résultats suggèrent un rôle effectif du FGF basique dans le développement de la rétine.

Le développement du cerveau, qui présente à la fois des phénomènes de prolifération et de migration cellulaire, de survie et de croissance neuronale, d'angiogenèse, apparaît être un modèle de choix pour l'étude du rôle des FGFs *in vivo*. En effet, le FGF est mitogène pour les précurseurs neuronaux (Gensburger et al., 1987), pour les astroblastes et les astrocytes (Pettmann et al., 1985), favorise la survie et la croissance neuronale (Morrison et al., 1986; Wallicke et al., 1986; Unsicker et al., 1987; Schubert et al., 1987). De plus, les FGFs acide (Risau et al., 1988 ; Mascarelli et al., 1987 ; Caday et al., 1990) et basique (Mascarelli et al., 1987 ; Kalcheim et al. 1990 ; Caday et al., 1990) et les récepteurs des FGFs (Olwin et Hauschka, 1990a) sont présents dans le cerveau embryonnaire. Cependant, on ignore tout de la régulation de la production des FGFs et de leurs récepteurs au cours du développement. Il apparaît donc difficile d'établir l'implication et la fonction de ces facteurs de croissance pendant l'embryogenèse du cerveau.

# MATERIELS ET TECHNIQUES

## I - MATERIELS.

### 1 - Obtention des cerveaux.

Les oeufs (*White Leghorn*), fécondés et non incubés, sont obtenus au couvoir industriel de Bersée (Nord) et incubés à 38°C en atmosphère saturée en humidité. Les cerveaux sont prélevés à partir d'embryon de 7 jours (E7), 10 jours (E10), 15 jours (E15) d'incubation, de nouveaux-nés de 1 jour (P1) et de poule adulte (Ad).

### 2 - Obtention des FGFs acide et basique.

Les FGFs acide et basique utilisés ont été obtenus soit par purification à partir de cerveaux de boeufs, selon la technique définie par Courty et al. (1987) soit par génie génétique. Les FGFs ont été purifiés au laboratoire ou ont été fournis par D. Barritault (Paris XII). Les FGFs recombinant ont été fournis par M. Jaye (Rorer, Central research, PA19406) et M. Miskulin (Paris XII).

## II - TECHNIQUES.

### 1 - Iodation des FGFs.

Les FGFs sont radioiodinés selon une méthode à la chloramine T avec quelques modifications (Moenner et al., 1986). Brièvement, 3 µg de FGF sont dilués dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) contenant 1% de polyéthylène glycol 1000 et incubés en présence de  $37 \cdot 10^6$  Bq de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (ORIS-France) et 20 µM de chloramine T à température ambiante pendant 90 secondes. La réaction est

arrêtée par addition de 100 mM de N-acétyl tyrosine. Les FGF acide et basique ainsi radiomarqués sont séparés du  $I^{125}$  libre par chromatographie d'affinité sur héparine-Sépharose (Pharmacia). L'activité spécifique est déterminée par calcul du rapport de la radioactivité présente sur la protéine sur la radioactivité totale. L'activité mitogène des FGFs est vérifiée avant et après radiomarquage par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée sur les fibroblastes CCL39 (paragraphe 4).

#### **4 - Mesure de l'activité mitogène.**

Les fibroblastes de la lignée CCL39 (ATCC CCL39) sont cultivés dans un milieu essentiel minimum (MEM, sels de Earles, Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco), 0,4% de pénicilline, 0,4% de streptomycine et 0,5% de fungizone. Les cultures sont placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de  $CO_2$ . La mesure de la synthèse d'ADN est menée selon la méthode de Plouët et al. (1984) avec quelques modifications. Les cellules sontensemencées dans des puits (plaque 24 puits Nunclon, Nunc) à raison de  $4 \cdot 10^4$  cellules dans 0,5 ml de milieu par puits. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, le milieu de culture est remplacé par 0,5 ml de MEM sans SVF. Après 24 heures, les fractions à tester (volume maximum 50  $\mu$ l) sont ajoutées dans le milieu. Après 4 heures d'incubation, l'incorporation de thymidine tritiée est stoppée par lavage des cellules par du PBS. Les cellules sont ensuite fixées par l'acide trichloroacétique à 10% (0,5 ml/puits) pendant 30 min. à 4°C, lavées à l'eau courante et lysées par la soude 0,1 N (0,5 ml/puits) pendant 2 h. à 37°C. Le contenu de chaque puits est alors transféré dans une fiole à scintillation dans laquelle sont ajoutés 3 ml de liquide scintillant (Ready-Safe). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur Beta (LKB, Wallac).

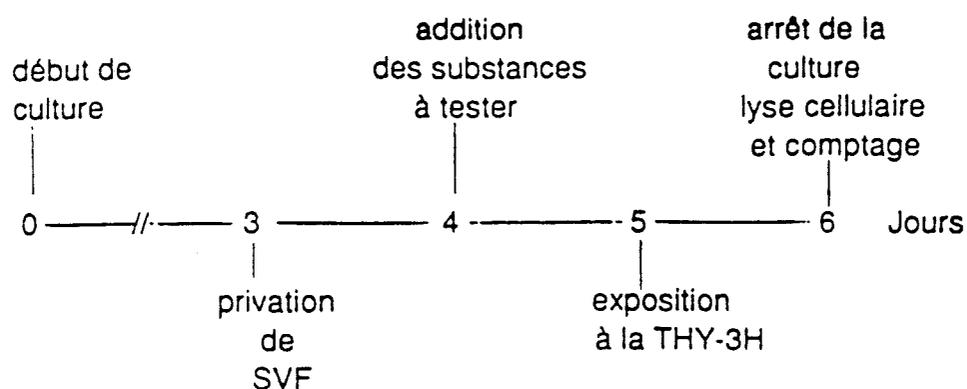


Figure 4 : Protocole de mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes CCL 39.

## 5 - Techniques spécifiques.

Les techniques spécifiques seront exposées dans les chapitres correspondants.

# CHAPITRE I

## DEVELOPPEMENT DU CERVEAU DE POULET

### I - INTRODUCTION

Le développement du cerveau des Vertébrés est un phénomène complexe qui, quoique relativement bien connu d'un point de vue morphogénétique, pose encore de très nombreux problèmes sur le plan cellulaire et moléculaire. De fait, actuellement, la compréhension des mécanismes mettant en place la structure du cerveau fait appel à toutes les disciplines de la biologie moderne. Le développement du cerveau de poulet constituant notre modèle biologique, nous nous proposons de décrire les principales étapes de son développement d'un point de vue morphogénétique et histogénétique (paragraphe I) et de compléter ces données par des travaux personnels concernant la prolifération cellulaire, la différenciation nerveuse (paragraphe II) et la production de FGFs, facteurs de croissance susceptibles de contrôler ces phénomènes (paragraphe III).

### II - GENERALITES

#### A) Morphogenèse

Après la fécondation, le développement embryonnaire des Vertébrés peut être divisé en plusieurs phases : 1 - La phase de segmentation durant laquelle l'embryon est le siège d'une activité mitotique intense, 2 - La gastrulation, phase pendant laquelle se mettent en place les 3 feuilletts fondamentaux de l'embryon : ectoderme, mésoderme et endoderme, 3 - La neurulation ou formation du tube neural et enfin, 4 - L'organogenèse pendant laquelle les organes se différencient progressivement.

Dans le cas de l'embryon de poulet, la segmentation débute 5 heures après la

fécondation et s'achève au bout de 24 heures lorsque l'oeuf est pondu. Dans les premières heures de l'incubation, qui chez la poule dure 21 jours à 38°C, débutent les mouvements morphogénétiques de la gastrulation qui se poursuivront jusqu'à la 50<sup>e</sup> heure d'incubation. Dès 20 heures d'incubation, l'ectoderme dorsal de l'embryon s'épaissit pour former la plaque neurale. Cette plaque neurale va progressivement se refermer sur elle-même et se dissocier de l'ectoderme pour donner le tube neural. La fermeture complète du tube neural est atteinte après 44 heures. Apparaissent ensuite les 3 vésicules primaires du cerveau, il s'agit de façon antéro-postérieure du prosencéphale, du mésencéphale et du rhombencéphale (Fig.5). Ces vésicules primaires sont creusées de cavités appelées respectivement : le procoele, le mésocoele et le rhombocoele, cette dernière cavité étant en continuité avec le canal neural. Après 72 heures d'incubation, le prosencéphale s'est nettement subdivisé en deux vésicules : antérieurement, le télencéphale et postérieurement le diencéphale. Dans le diencéphale sont apparues 1 - latéralement, les vésicules optiques droite et gauche qui conduiront, au contact de l'ectoderme céphalique, à la formation des yeux 2 - ventralement, l'infundibulum qui contribuera avec la poche de Ratke à la formation de l'hypophyse 3 - dorsalement, l'épiphyse.

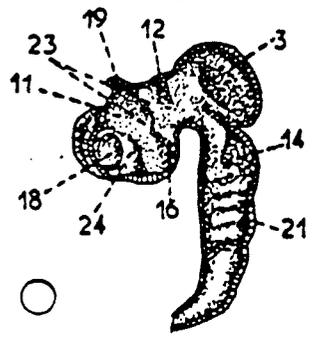
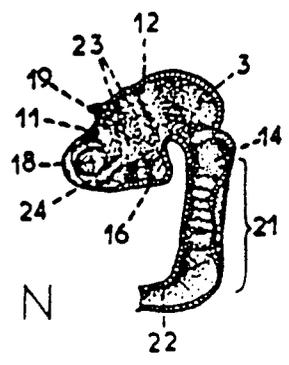
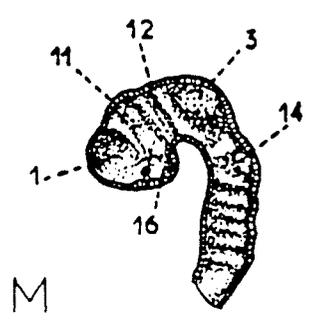
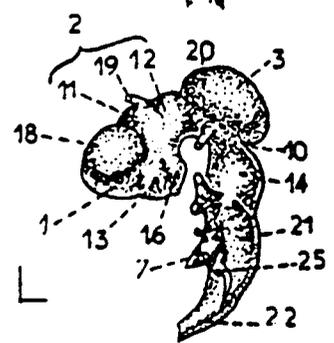
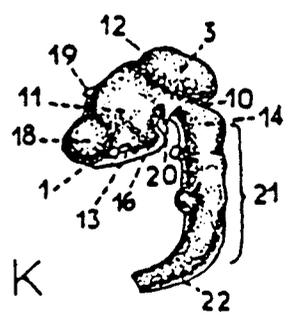
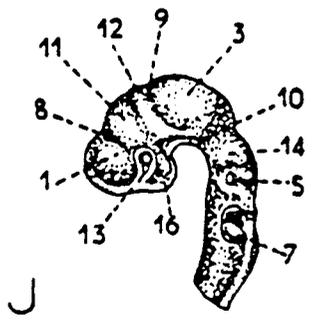
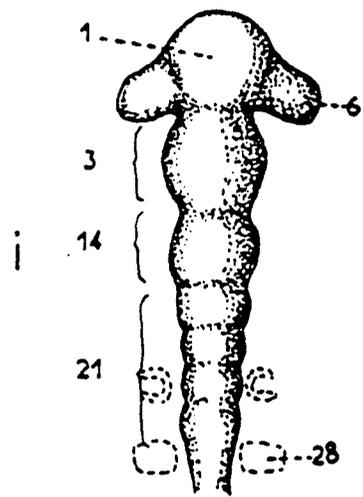
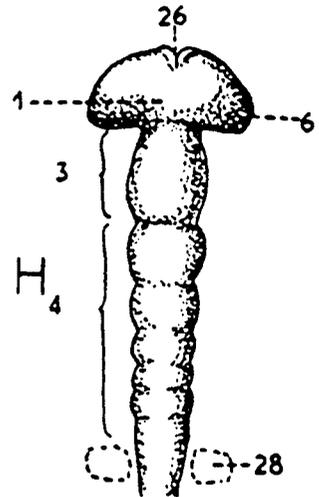
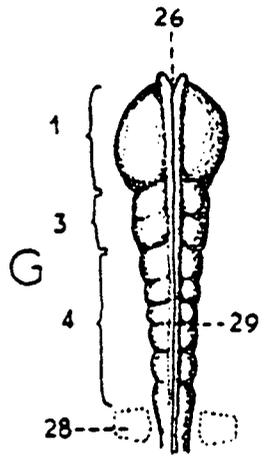
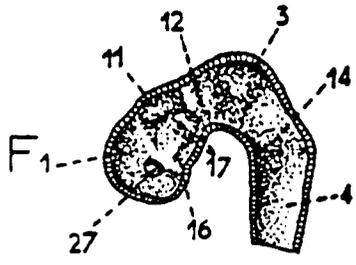
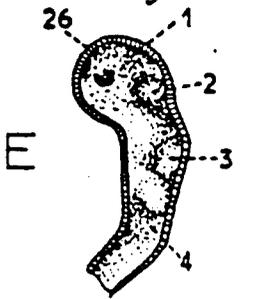
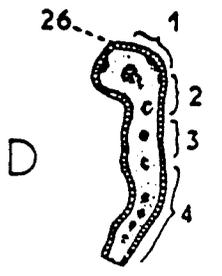
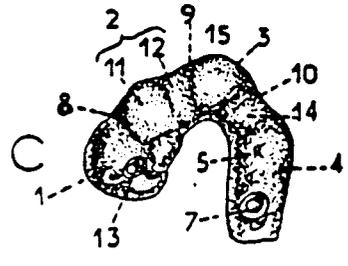
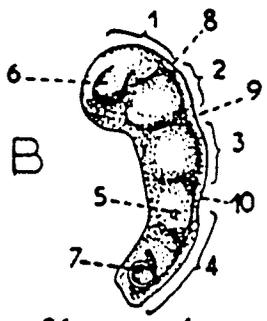
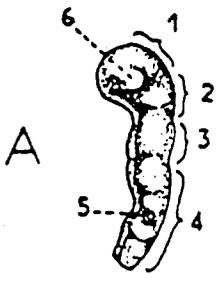
Après 96 heures d'incubation (Fig.6), dans le télencéphale se forment latéralement les 2 vésicules télencéphaliques dont la croissance permettra d'aboutir aux hémisphères cérébraux. A ce stade, le mésencéphale contenant les lobes optiques a considérablement grossi. Le rhombencéphale s'est subdivisé en deux vésicules, de façon antéropostérieure il s'agit : du métencéphale et du myélencéphale. Du 4<sup>e</sup> au 8<sup>e</sup> jour d'incubation, les centres sensitifs et moteurs se sont développés. Les lobes olfactifs sont apparus sur la face antérieure du télencéphale. Au 9<sup>e</sup> jour (Fig.7), la paroi dorsale du métencéphale s'est épaissie pour donner naissance au cervelet. Les phases ultérieures du développement (Fig.7) sont marquées par une croissance importante des hémisphères cérébraux et du cervelet. Le cerveau adulte (Fig.7) est caractérisé par la proéminence des hémisphères cérébraux et du cervelet qui compriment les lobes optiques du mésencéphale.

## Figure 5

Les figures A B C J K L et D E F M N O représentent respectivement des vues latérales externes et des coupes sagittales du cerveau d'embryons de poulet de 11, 15, 20, 36, 40, et 50 somites (d'après ROMANOFF, 1960).

Les figures G H I sont des vues dorsales du cerveau d'embryons de poulet de 7, 10 et 14 somites (d'après PATTEN, 1952).

1 prosencéphale	16 infundibulum
2 diencéphale	17 hypothalamus
3 mésencéphale	18 hémisphère
4 rhombencéphale	19 épiphyse
5 ganglion du N. trijumeau	20 nerf occulo-moteur
6 vésicule optique	21 myélocéphale
7 vésicule optique	22 flexure cervicale
8 sillon télo-diencéphalique	23 thalamus
9 sillon méso-diencéphalique	24 corps striés
10 sillon rhombo-mésencéphalique	25 ganglion des nerfs glosso-pharyngien et vague
11 parencephale	
12 synencéphale	26 neuropore antérieur
13 tige optique	27 ouverture dans la tige optique
14 métencéphale	28 somite I
15 flexure crânienne	29 ligne de fusion des plis neuraux



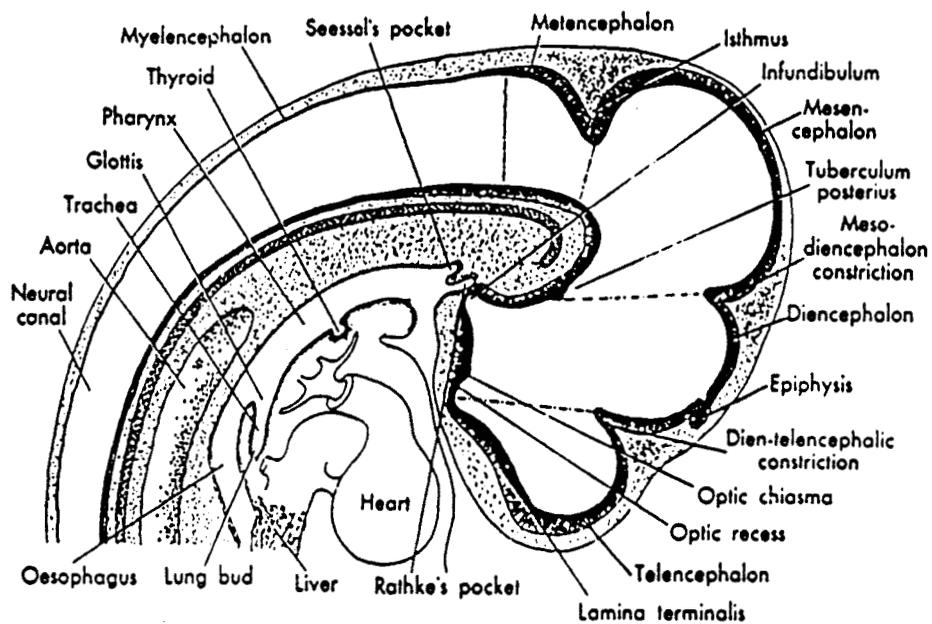


Figure 6 : Coupe sagittale antérieure d'embryon de poulet à 96 h. d'incubation.  
(d'après Huettner, 1968)

## Figure 7

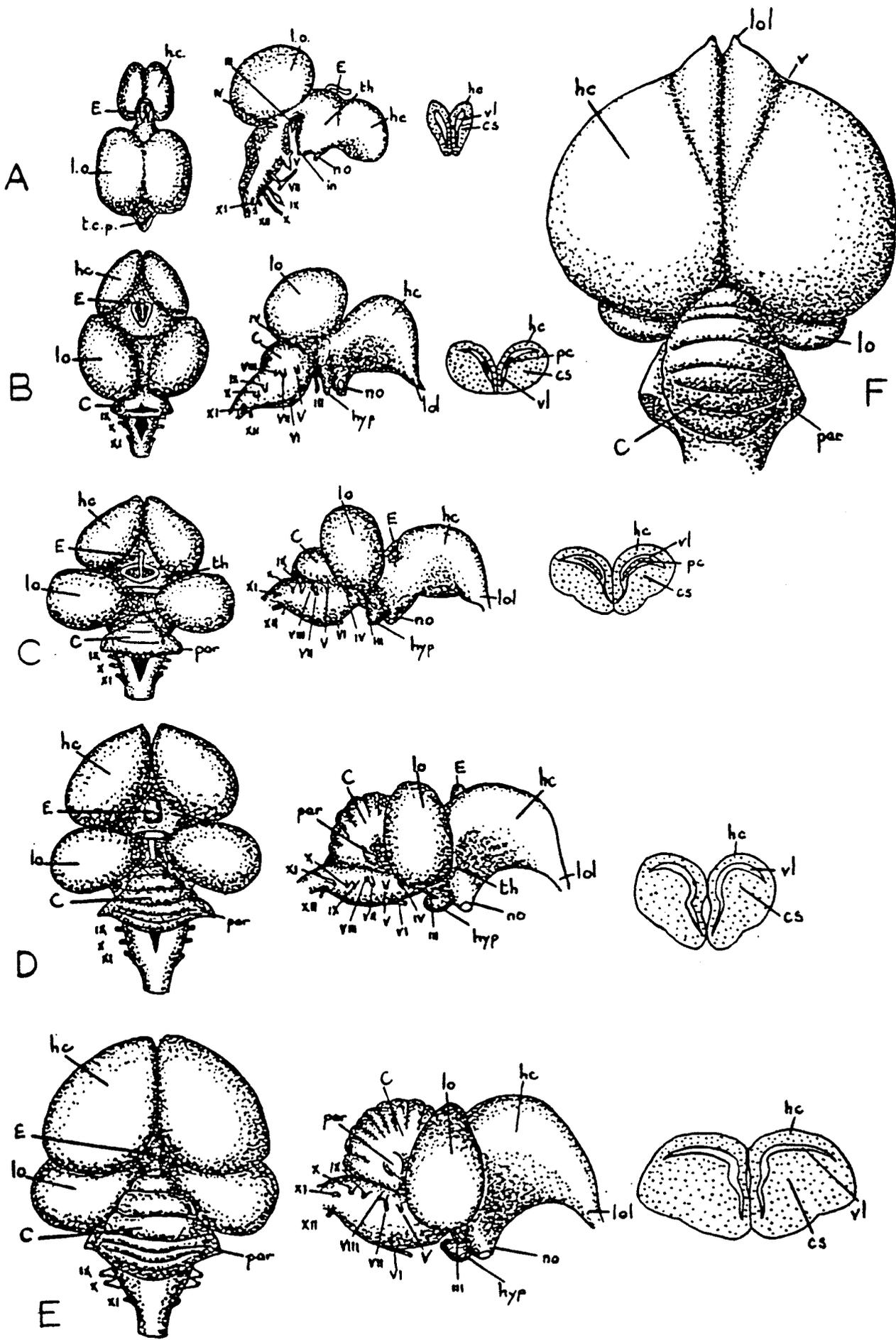
Vues dorsales (1ère colonne), latérales (2e colonne) et coupes transversales (3e colonne) du télencéphale d'embryons de poulet à E6 (A), E8 (B), E10 (C), E13 (D) et E17 (E) (d'après Rogers, 1960).

F est une vue dorsale de l'encéphale d'un poulet adulte (d'après Romanoff, 1960).

Grossissements : X 3,3

### Abréviations

III à XII	nerfs crâniens	l ol	lobe olfactif
C	cervelet	no	nerf optique
CS	corps striés	par	paraflocculus
E	épiphyse	pc	plexus choroïdes
hc	hémisphère cérébral	tcp	toit du cerveau postérieur
hyp	hypophyse	th	thalamus
inf	infundibulum	vl	ventricule latéral
lo	lobe optique		



## B) Histogenèse

Le tube nerveux de l'adulte contient 3 grands types cellulaires :

1 - Les neurones, d'origine neurectodermique. Il existe différents types de neurones : les neurones multipolaires (constitués d'un corps cellulaire et de nombreuses dendrites), les neurones bipolaires (une seule dendrite) et les neurones unipolaires (dendrites et axones sont issus du même prolongement).

2 - Les cellules gliales. On distingue quatre types principaux de cellules gliales: - les oligodendrocytes, d'origine neurectodermique sont responsables de la myélinisation des axones du système nerveux central. - les astrocytes, d'origine neurectodermique, dont le rôle n'est pas complètement connu, sont le support architectural des neurones et contrôlent les échanges métaboliques des neurones entre eux et avec le sang. - les cellules microgliales, d'origine mésodermique, sont capables de se transformer en cellules phagocytaires et sont considérées comme faisant partie du système immunitaire. - les cellules épendymaires, d'origine neurectodermique, bordent la paroi des ventricules et du canal médulaire et sont impliquées dans le contrôle des échanges entre tissus nerveux et liquide céphalorachidien.

3 - Les cellules endothéliales, d'origine mésodermique, constituent la paroi des vaisseaux et capillaires sanguins présents à la fois dans les méninges et dans le tissu nerveux.

La mise en place des neurones, de la glie et des cellules vasculaires s'effectue séquentiellement au cours du développement.

### a - Neurogenèse et gliogenèse

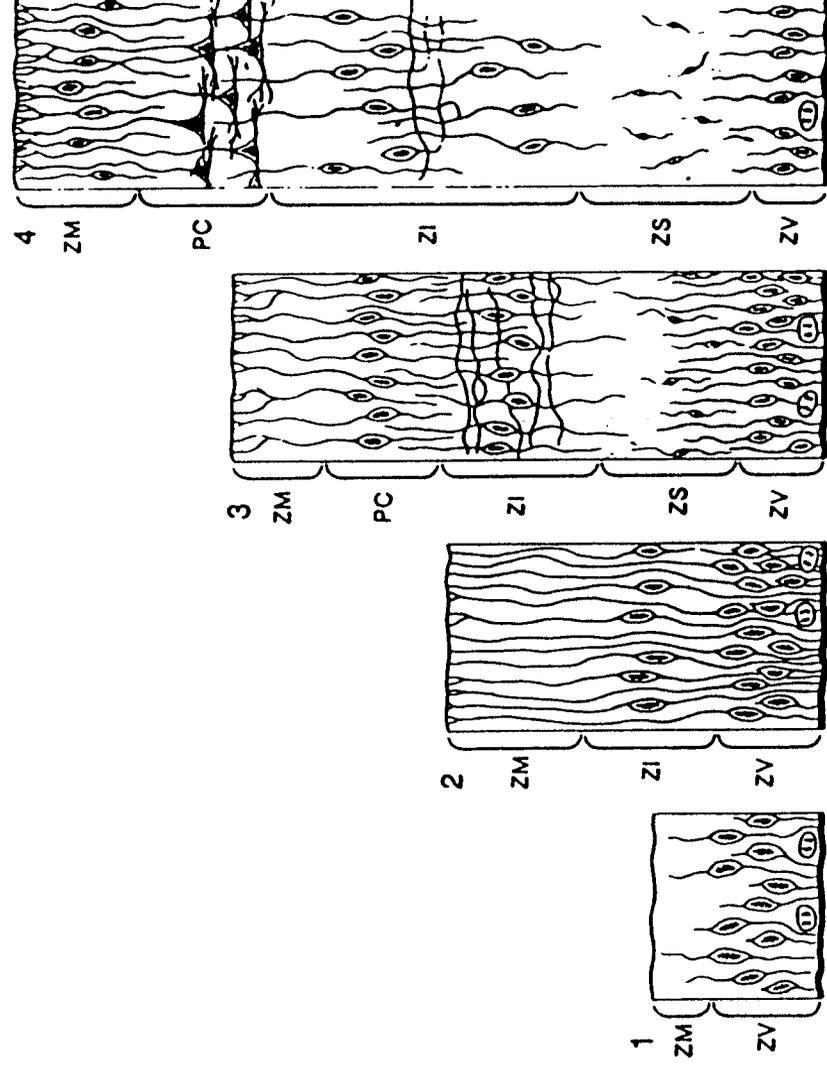
La mise en place des cellules nerveuses peut être divisée en 6 grandes étapes. Dans l'ordre de leur apparition, ce sont :

- 1) la prolifération localisée de cellules précurseurs,
- 2) la migration des cellules de leur lieu de formation vers leur emplacement définitif,

- 3) l'agrégation des cellules pour former des noyaux dans le cerveau,
- 4) la différenciation des neurones,
- 5) l'établissement des connexions entre neurones,
- 6) la mort sélective de certains neurones.

Dès sa fermeture, le tube neural est composé de deux zones (Fig.8) : 1 - la zone ventriculaire (ZV), bordant la lumière interne du tube. Cette zone ventriculaire constitue ce que l'on appelle le "neuroépithélium germinatif", dont les cellules - les cellules neuroépithéliales - sont considérées comme les précurseurs communs des neurones et de la glie. 2 - la zone marginale (ZM), qui est acellulaire borde la face externe du tube neural. Au cours du cycle cellulaire, le corps cellulaire des cellules neuroépithéliales migre à l'intérieur de la zone ventriculaire. Les synthèses d'ADN s'effectuent lorsque leur noyau se situe dans la partie externe de la zone ventriculaire, alors que la mitose s'effectue au contact de la lumière ventriculaire. Ces mouvements caractéristiques des cellules neuroépithéliales au cours de leur cycle cellulaire sont appelés "to and fro" migration (Sidman et al., 1959). Les cellules ainsi générées peuvent continuer leur cycle cellulaire et répéter un cycle "to and fro" ou donner naissance à des neuroblastes et à des glioblastes qui vont migrer vers la partie externe du tube nerveux. Les premières cellules à être générées au cours du développement sont les neuroblastes. Cependant, la migration des neuroblastes vers les couches externes du tube neural peut être guidée par une catégorie de cellules appelées les cellules gliales radiales (Rakic, 1972).

La prolifération des cellules neuroépithéliales entraîne un épaississement de la paroi du tube nerveux et les neuroblastes néoformés vont constituer une autre couche appelée zone intermédiaire (ZI). Dans le télencéphale, les cellules qui passent au travers de la zone intermédiaire se regroupent pour former la plaque corticale (PC), région dont les différentes couches formeront le cortex cérébral. Durant les stades ultérieurs, la zone ventriculaire originelle est réduite à une couche épendymaire limitant les ventricules cérébraux. La zone sous-ventriculaire (ZS) représente une seconde région de prolifération cellulaire où seront formées essentiellement les cellules gliales.



**Figure 8** : Epaissement progressif de la paroi du cerveau en développement. A un stade précoce (1) la paroi est constituée par un épithélium "pseudo-stratifié", dont la zone ventriculaire (ZV) contient les corps cellulaires et la zone marginale (ZM) ne contient que les prolongements cellulaires. Quand certaines des cellules perdent leur capacité de synthèse du DNA et quittent le cycle mitotique (2), elles forment une seconde couche, la zone intermédiaire (ZI). Dans le télencéphale, les cellules qui passent à travers cette zone s'amalgament pour former la plaque corticale (PC), région dont les différentes couches se transforment en cortex cérébral (3). Au dernier stade (4), la zone ventriculaire originelle n'est plus qu'une couche épendymaire limitant les ventricules cérébraux. La zone sous-ventriculaire (ZS) est une seconde région de prolifération cellulaire où sont formés de nombreuses cellules gliales et quelques neurones télencéphaliques. (d'après Cowan, 1987)

Dans le télencéphale du poulet, il a pu être montré, par incorporation de thymidine tritiée et radioautographie, que la plupart des neurones sont générés entre E4 et E9. Les cellules gliales par contre apparaissent générées essentiellement après E10 (Tsaï et al. 1981a).

En ce qui concerne le cervelet, la prolifération des cellules neuroépithéliales est complétée, après E10, par la prolifération des cellules de la couche granulaire externe (Hanaway, 1967).

Le développement du tissu nerveux est aussi caractérisé par de nombreux phénomènes de mort cellulaire et en particulier de mort neuronale. Chez le poulet, certains noyaux cellulaires et surtout la moelle épinière ont servi de modèles d'études des phénomènes de mort neuronale. Ainsi, dans le noyau isthmo-optique, les neurones sont générés essentiellement entre E5 et E7. Jusqu'à E13, ce noyau contient 22000 neurones, à partir de E18, il en reste 13000 et après la naissance seulement 9500 neurones sont encore présents (Cowan and Wenger, 1968a ; Clarke and Cowan 1976 ; Cowan and Clarke, 1976). Dans le noyau magnocellulaire, les neurones sont générés entre E4 et E5, entre E5 et E7, ils migrent vers leur zone de différenciation et les quatre jours suivant, leur nombre diminue de 84% (Rubel et al., 1976). Dans la moelle épinière complète du poulet, le nombre de motoneurones de 20000 à E6, n'est plus que de 12000 à E10 (Hamburger, 1975). De façon générale, on considère que les neurones qui dégénèrent durant cette période sont ceux qui n'ont pas établi de connexions fonctionnelles (revue dans Jacobson, 1978).

Dans le cerveau adulte, les phénomènes de prolifération cellulaire sont peu importants, cependant, après blessure du tissu nerveux chez le rat, une importante gliose apparaît dans la zone bordant la blessure (Cavanagh, 1970). Par ailleurs, des processus de neurogenèse ont été détectés dans la zone ventriculaire du cerveau de canari adulte et ce, au moment où chaque année, cet oiseau commence à chanter (Alvarez-Buylla, 1988).

### b - Angiogenèse.

Dès la 50<sup>e</sup> heure d'incubation, se met en place la vascularisation externe du cerveau qui débute par la formation d'un plexus qui se différenciera en artères et veines leptoméningeales. A partir de ce réseau vasculaire externe, les capillaires sanguins vont progressivement et radialement envahir le tube nerveux (Atterbury,1923 ; Auerbach,1976). Ce processus commence vers E 3,5 et se poursuit durant toute la croissance du cerveau. La barrière hémocéphalique se met en place progressivement, elle fait intervenir les cellules endothéliales et gliales (astrocyte notamment) qui, par leurs propriétés morphologiques et biochimiques, permettent une régulation très précise des échanges entre le sang et le tissu nerveux (Delorme, 1971).

### C) Facteurs trophiques

Les phénomènes de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire, tout comme l'élaboration des contacts et circuits neuronaux se déroulant au cours du développement cérébral, font intervenir de nombreuses molécules trophiques.

Des extraits bruts de cerveau embryonnaire et adulte présentent des activités mitogènes, neurotrophiques et angiogènes. De nombreux travaux rapportent la présence d'activité mitogène dans des extraits de cerveau (Thomas et al, 1980 ; Kellett et al., 1981) et de rétine (Barritault et al, 1981). Par ailleurs, il apparaît que des extraits de cerveaux d'embryons et de nouveaux-nés, sont plus actifs que des extraits de cerveau adulte sur la prolifération des astrocytes en culture (Morrisson and De Vellis, 1981). De même, des extraits de cerveaux embryonnaires et adultes sont capables de stimuler la différenciation de cellules PC12 (Rauwala, 1989) ainsi que la croissance des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogénèse *in vivo* (Robertson et al, 1985 ; Risau et al, 1986)

Un certain nombre de facteurs de croissance, capables de stimuler la prolifération et/ou la différenciation des cellules dérivées du tube nerveux, ont été décrits. Le premier facteur de croissance à avoir été caractérisé fut le Nerve

Growth Factor (NGF). Ce facteur isolé originellement à partir d'une tumeur (Sarcome 180) puis à partir de la glande à venin de serpent et enfin de la glande salivaire de souris, a été caractérisé biochimiquement et se montre capable de stimuler la survie et la croissance des neurones sympathiques *in vitro* (revue dans Levi-Montalcini and Angeletti, 1968). *In vivo*, l'injection de NGF dans l'embryon de poulet induit l'excroissance des fibres nerveuses sympathiques (Levi-Montalcini and Booker, 1960a) ; par contre, l'injection d'anti-NGF entraîne une atrophie de ces mêmes fibres nerveuses (Levi-Montalcini and Booker, 1960b). Enfin, *in vitro*, le NGF stimule également la synthèse de neurotransmetteurs (Levi-Montalcini et al. 1973).

Après le NGF, d'autres substances capables de stimuler la survie et la croissance neuronale ont été caractérisées. Le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) isolé de l'oeil de poulet (Barbin et al., 1984), du nerf sciatique de rat (Manthorpe et al., 1986) et du coeur de boeuf (Watters et Hendry, 1987), stimule la survie de cellules de ganglions ciliaires en culture. Le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) purifié du cerveau de porc (Barde et al., 1982) active la survie et la croissance de fibres nerveuses de neurones sensoriels de poulet embryonnaire et de rétine de rats (Davies et al., 1986 ; Johnson et al., 1986 ; Hoffer et Barde, 1988).

De plus, d'autres facteurs de croissance isolés d'abord à partir de leurs effets sur les tissus non nerveux se sont avérés avoir un effet sur les cellules du cerveau. Ainsi, l'insuline et les insuline like growth factor I et II favorisent la survie (Aizenman and De Vellis, 1987 ; Recio-Pinto et al., 1986), la croissance (Aizenman and De Vellis, 1987 ; Bhat et al., 1983 ; Diccico-Bloom et al., 1988 ; Mill et al., 1985 ; Recio-Pinto et al., 1986) et la différenciation (Aizenman et al., 1986 ; Avola et al., 1988 ; Kyriakis et al., 1987 ; Mill et al., 1985) neuronale. Un effet stimulateur des synthèses d'ADN dans les astrocytes a également été rapporté (Lenoir et Honegger, 1983). L'epidermal growth factor (EGF) est un puissant mitogène des astrocytes (Avola et al., 1988) et favorise la croissance de neurones de rats nouveaux-nés (Morrisson et al., 1987-1988). Le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) est actif sur la différenciation des cellules gliales (Noble et al.,

1988 ; Raff et al., 1988 ; Richardson et al. 1988).

D'autres molécules isolées à partir du tissu nerveux tels que les Astroglial Growth Factors (AGF I et II) (Pettmann et al., 1985), les Eye Derived Growth Factors (EDGF I et II) (Barritault et al. 1981), l'Embryonic Brain-derived Angiogenic Factor (EBdAF) (Risau, 1986) se sont avérées structurellement identiques aux FGF acide et basique isolés du cerveau de boeuf. Par ailleurs, les propriétés multiples des FGFs au niveau des cellules nerveuses sont maintenant bien connues (Chapitre Généralités). De plus, ces facteurs de croissance sont présents dans le cerveau au cours du développement. En 1986, Risau montre que l'activité mitogène présente dans un extrait de cerveau d'embryon de poulet est élevée à E4, baisse jusqu'à E6 et augmente ensuite jusqu'à E17. A partir d'un extrait de cerveau à E14, Risau et al. (1988) purifie une molécule angiogène qui s'avère être du FGF acide. Cependant, on ignore si l'activité angiogène, à tous les autres stades de développement, correspond ou non au FGF acide. D'autres molécules angiogènes ont été détectées dans le cerveau et pourraient également intervenir (Robertson et al. 1985), par conséquent, le profil d'activité angiogène au cours du développement rapporté par Risau ne peut être assimilé au profil d'activité du FGF acide. Caday et al. (1990) montrent que l'activité mitogène de cerveau de rat augmente jusqu'à P40, et qu'entre P10 et P40, les quantités de FGF acide et basique augmentent considérablement. Dans notre laboratoire, il a été montré que dans le cerveau de souris, la quantité de FGF acide et l'expression de ses ARN messagers augmentent régulièrement de E14 jusqu'au stade adulte (Thomas et al., 1990).

L'ensemble de ces résultats indiquent que les FGF acide et basique, facteurs de croissance mitogènes, neurotrophiques, chémotactiques et angiogènes, sont présents au cours du développement du cerveau et pourraient donc y avoir une fonction importante.

### III - PROLIFERATION CELLULAIRE ET MATURATION NEURONALE.

La prolifération cellulaire et la différenciation nerveuse ont été évaluées au cours du développement du cerveau, respectivement par mesure des synthèses d'ADN et dosages des taux de neurotransmetteurs aminergiques.

#### A) Matériels et Techniques

##### 1 - Mesure des synthèses d'ADN.

Les cerveaux de poulet à E5, E7, E10, E15, E17, E19, P1 et au stade adulte sont disséqués à température ambiante et immédiatement coupés en fragments de 5mm<sup>3</sup> environ. Les fragments sont aussitôt incubés dans du milieu essentiel minimum (Dubelco) pendant 4 heures (sauf pour l'étude cinétique) en présence de 2  $\mu$  Ci/ml de thymidine marquée au carbone 14 (CEA ; activité spécifique 50 m Ci/m mole). A la fin de la période d'incubation, les fragments sont rincés par du milieu de culture dépourvu de précurseur radioactif, et broyés à l'aide d'un homogénéiseur de Potter dans un tampon Tris 10 mM, pH 7, EDTA 10mM, NaCl 100 mM, selon un rapport poids/volume égal à 3. L'homogénat est ensuite transféré dans un tube à hémolyse maintenu à 0°C par de la glace fondante. Un aliquote est prélevé pour le dosage de la quantité d'ADN. Le volume restant est précipité par l'acide trichloroacétique à 10% pendant 30 mn. à 0°C. Le précipité est recueilli sur un filtre en fibres de verre (Whatman GF/C). Ce dernier est placé dans un tube contenant du liquide scintillant (Lipoluma) et la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (LKB, Wallac 1215). Pour le dosage de l'ADN, l'homogénat précédemment prélevé est complété par 30 ng/ml de diaminophénylindolamine (DAPI) (Sigma), intercalant fluorescent spécifique de l'ADN (Brunk et al., 1979). La quantité d'ADN est déterminé par mesure au spectrofluorimètre (Perkin Elmer LS3). La courbe étalon est réalisée à partir d'ADN de thymus de veau (Sigma).

## 2 - Dosage des neurotransmetteurs

### 1) Préparation des échantillons.

Les cerveaux de poulet aux stades E7, E10, E15, P1 et adulte sont homogénéisés avec un micro-broyeur conique verre-verre dans un tampon HCl 0,2 M suivant un rapport poids/volume égal à 3. Un aliquote est prélevé pour le dosage des protéines, les échantillons sont centrifugés (15000 g, 30 mn. , 4°C) et les surnageants sont récupérés pour doser les monoamines.

### 2) Dosage des monoamines.

#### a) Les catécholamines.

Elles sont dosées par HPLC (High pressure liquid chromatography) (Beckman 340). La phase fixe apolaire est formée de billes de silice de 5 µm de diamètre greffées en C18. La phase mobile est formée par le mélange : acétate de sodium 0,1M, acide citrique 0,02M, sodium acétyle sulfate (100 ng/ml), EDTA (50 ng/ml), méthanol 8% (Phase de Mefford, 1981). L'injection (20 µl de surnageant) est réalisée en continu grâce à une pompe (112 solvant delivery, module Beckman) à 1 ml/mn et sous 20 atmosphères. Les monoamines sont détectées électrochimiquement grâce à une cellule de mesure placée à la base de la colonne. Cette cellule comporte 2 cubes de téflon opposés par l'intermédiaire d'un joint de plastique plan, d'épaisseur constante et perforé en son centre d'une fente ovale délimitant un volume de 10 µl. Le cube supérieur de la cellule porte une électrode de mesure en carbone vitreux (Bio Analytical System) connecté par un fil d'or à l'unité ampérométrique (type PRG/DEL-Tacussel). Un potentiel de 600 mV, imposé entre cette électrode et une électrode de référence Ag/Ag Cl provoque l'oxydation des catécholamines en quinones avec libération de 2 électrons par molécule.

b) La sérotonine (5HT).

Elle est dosée de la même façon mais la phase mobile utilisée est différente: acétate de sodium 0,1M, acide citrique 0,1M et méthanol 15%. Les électrons captés par l'électrode de mesure modifient l'intensité du courant de façon proportionnelle au nombre de molécules oxydées.

L'identification et la quantification des catécholamines et de la sérotonine sont faites après injection d'un mélange témoin de noradrénaline, adrénaline, dopamine et 5 HT (1 ng/20  $\mu$ l). Les résultats sont exprimés en ng/mg de protéines.

## B) Résultats

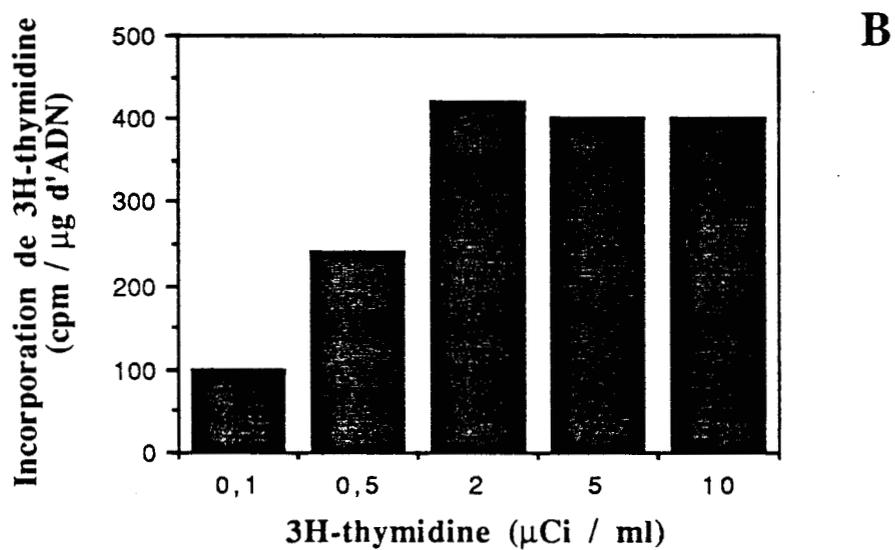
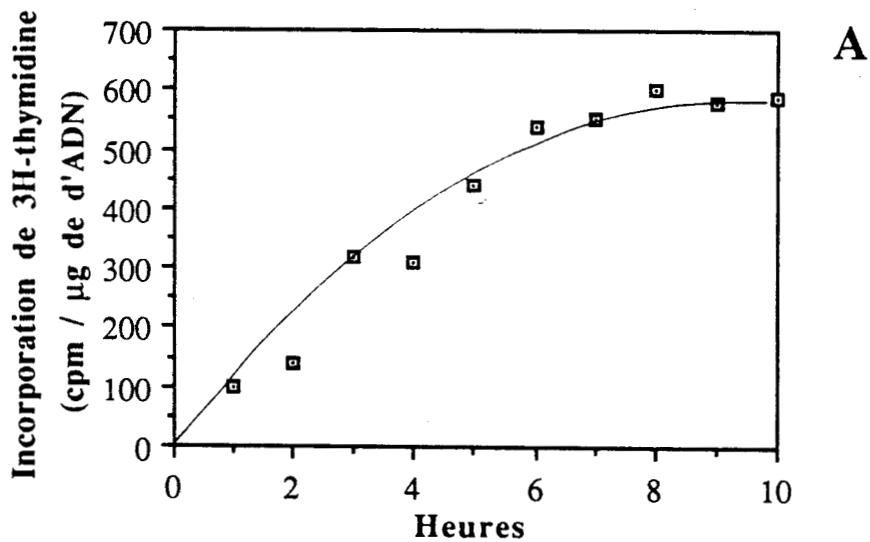
### 1 - Evolution des synthèses d'ADN.

L'étude cinétique réalisée avec des cerveaux au stade E15 (Fig.9A) montre que l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN en fonction du temps est linéaire et ce jusqu'à 8 h. d'incubation, c'est pourquoi, nous avons choisi une période d'incubation de 4 h. Par ailleurs, l'utilisation de doses variables de thymidine indique qu'un niveau maximal d'incorporation est atteint à partir de 2  $\mu$ Ci/ml (Fig.9B), nous avons donc réalisé l'ensemble des expérimentations avec une dose de thymidine tritiée de 2  $\mu$ Ci/ml.

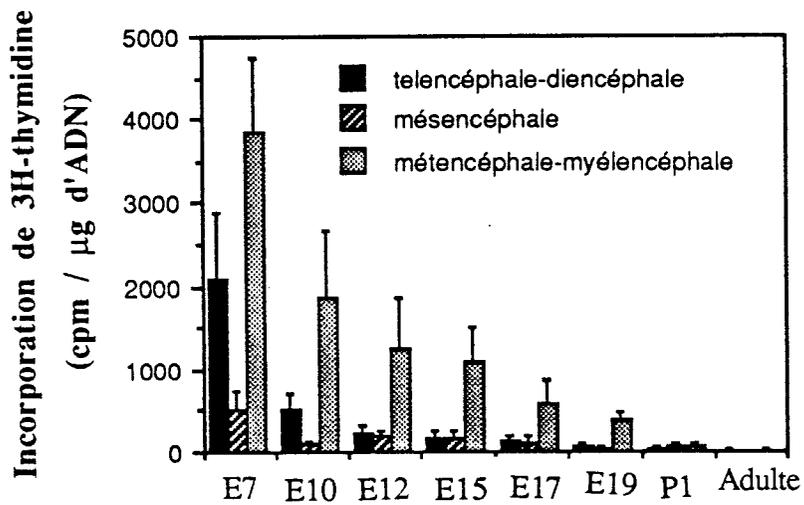
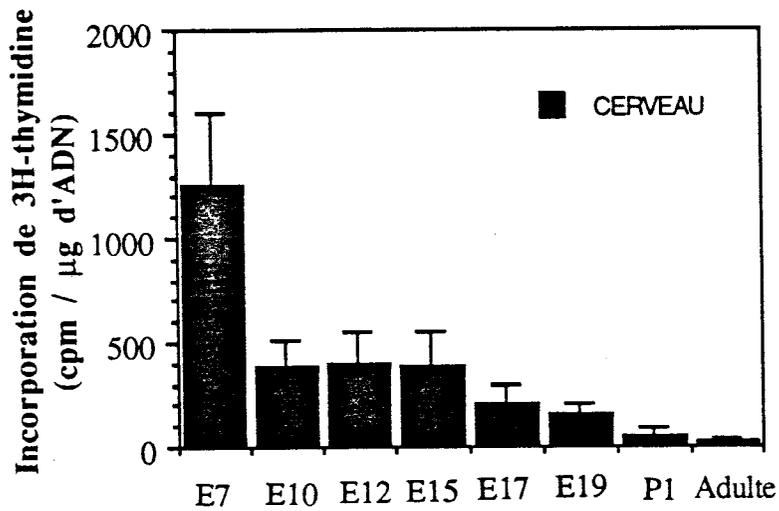
Deux séries expérimentales ont été effectuées : dans la première, la synthèse d'ADN est étudiée dans le cerveau entier, dans la deuxième, elle est étudiée dans chacune de ses vésicules.

#### a) Synthèse d'ADN dans les cerveaux entiers.

Les résultats (Fig. 10A) montrent que la synthèse d'ADN (exprimée en cpm par rapport à la quantité d'ADN) diminue progressivement au cours du développement avec une chute de 70% entre E7 et E10 et 60% entre E15 et E17. Après la naissance, les synthèses d'ADN restent à un niveau minimal.



**Figure 9** : Incorporation de thymidine tritiée dans les fragments de cerveau (E15) en fonction du temps d'incubation (A) et de la quantité de thymidine tritiée, pour une incubation de 4 heures (B). Les résultats représentent la moyenne de 4 déterminations.



**Figure 10** : Evolution de l'incorporation de thymidine tritiée dans le cerveau entier (A) et dans chacune de ses vésicules (B) au cours du développement. Les données représentent la moyenne de 15 déterminations.

### b) Synthèses d'ADN dans chaque vésicule.

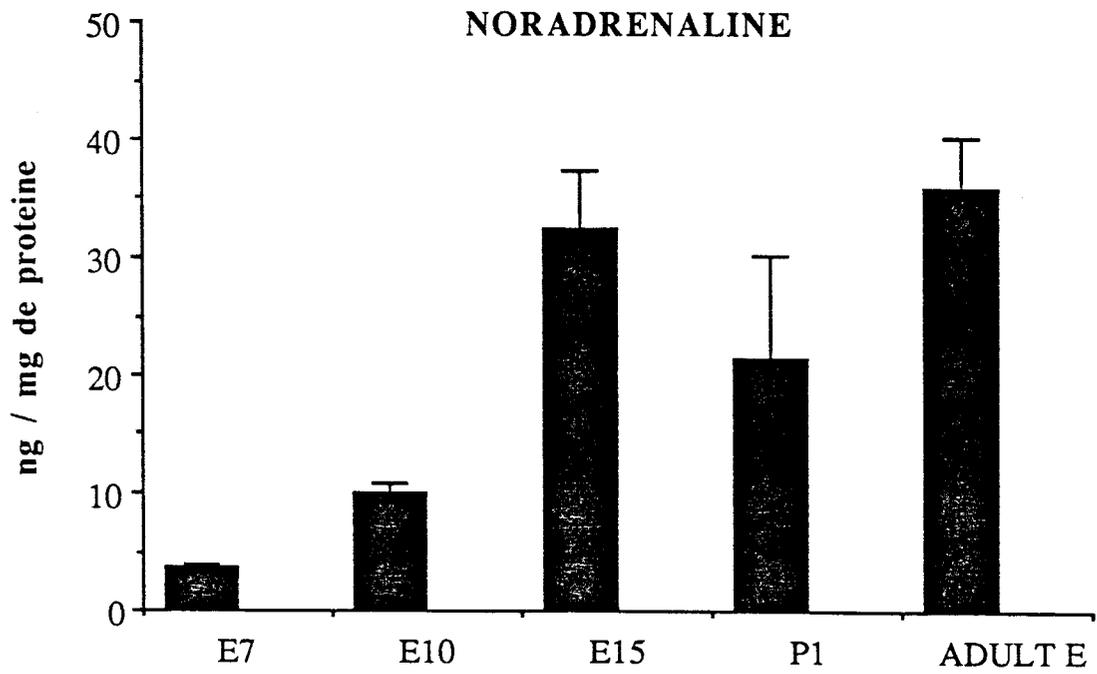
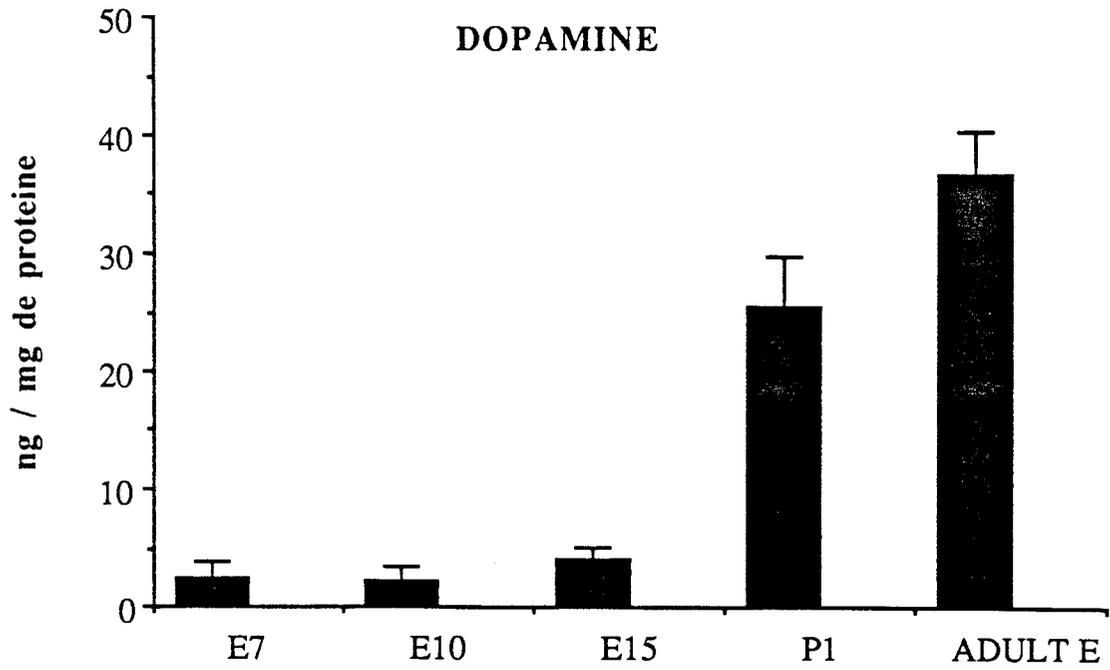
Les résultats (Fig.10B) indiquent que dans chacune des vésicules étudiées, le niveau de synthèse d'ADN (exprimé en cpm par rapport à la quantité d'ADN) diminue au cours du développement. Le mésencéphale est la vésicule cérébrale dans laquelle les synthèses d'ADN sont les moins importantes pour les stades étudiés ; par ailleurs, elles atteignent un niveau minimal dès E10. L'ensemble formé du télencéphale et du diencephale présente un niveau de synthèse supérieur au mésencéphale jusque E15, mais toujours inférieur à l'ensemble métencéphale-myélocéphale. De plus, dans le télencéphale-diencephale, les synthèses d'ADN diminuent de 70% entre E7 et E10 puis de 50% entre E10 et E12 et baissent ensuite progressivement jusqu'à la naissance. Dans l'ensemble métencéphale-myélocéphale, les synthèses sont pour tous les stades embryonnaires supérieures à celles des autres parties étudiées et diminuent de 50% entre E17 et E10 puis progressivement jusqu'à l'éclosion.

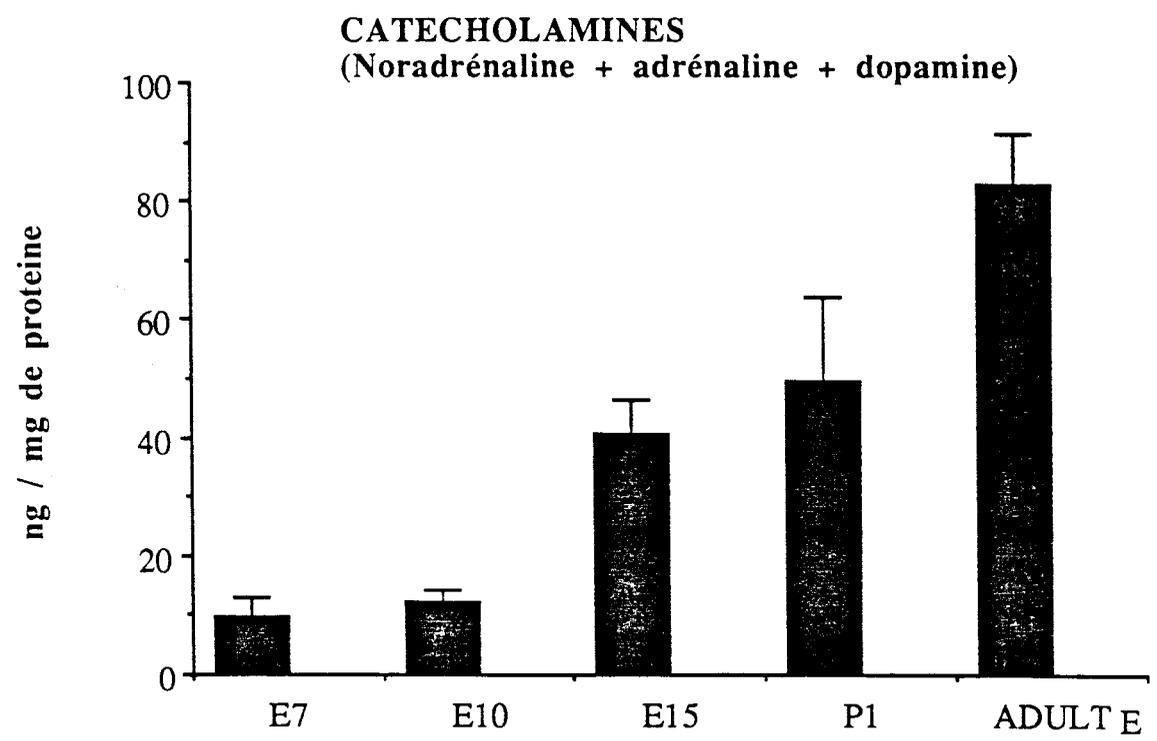
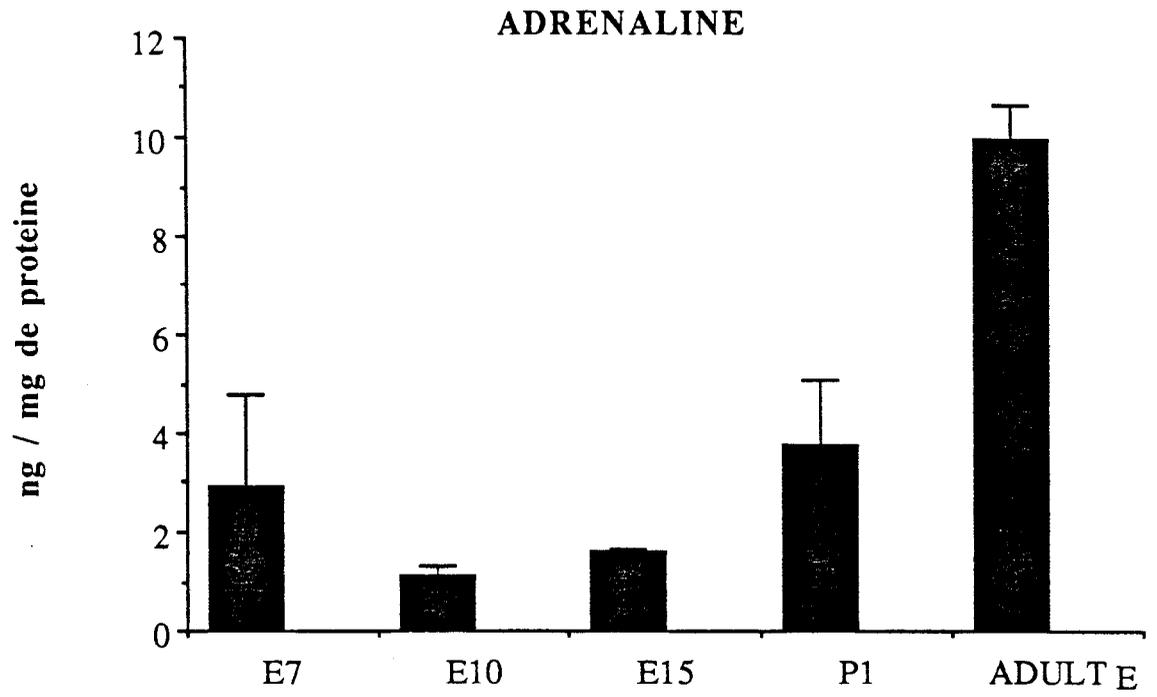
### 2 - Evolution du taux de neurotransmetteurs.

Les résultats obtenus montrent que les quantités de neurotransmetteurs aminergiques augmentent des premiers stades embryonnaires jusqu'à l'état adulte. La quantité de dopamine, constante de E7 à E15 (2,28 - 4,02 ng/mg de protéine) augmente de façon importante à P1 (25 ng/mg de protéine) (Fig.11A). La quantité de noradrénaline est comparable à E7 et E10 (3-10 ng/mg de protéine) puis triple entre E10 et E15 pour se maintenir ensuite constante (Fig.11B). Enfin, la quantité d'adrénaline constante de E7 à P1 (1,20 - 2,95 ng/mg de protéine) augmente fortement chez l'adulte (9,9 ng/mg de protéine) (Fig.11C). Les valeurs ajoutées de ces 3 neurotransmetteurs font apparaître que le taux de catécholamines dans le cerveau est multiplié par 3,5 entre E10 et E15 puis par 2 entre E15 et l'adulte (Fig.11D).

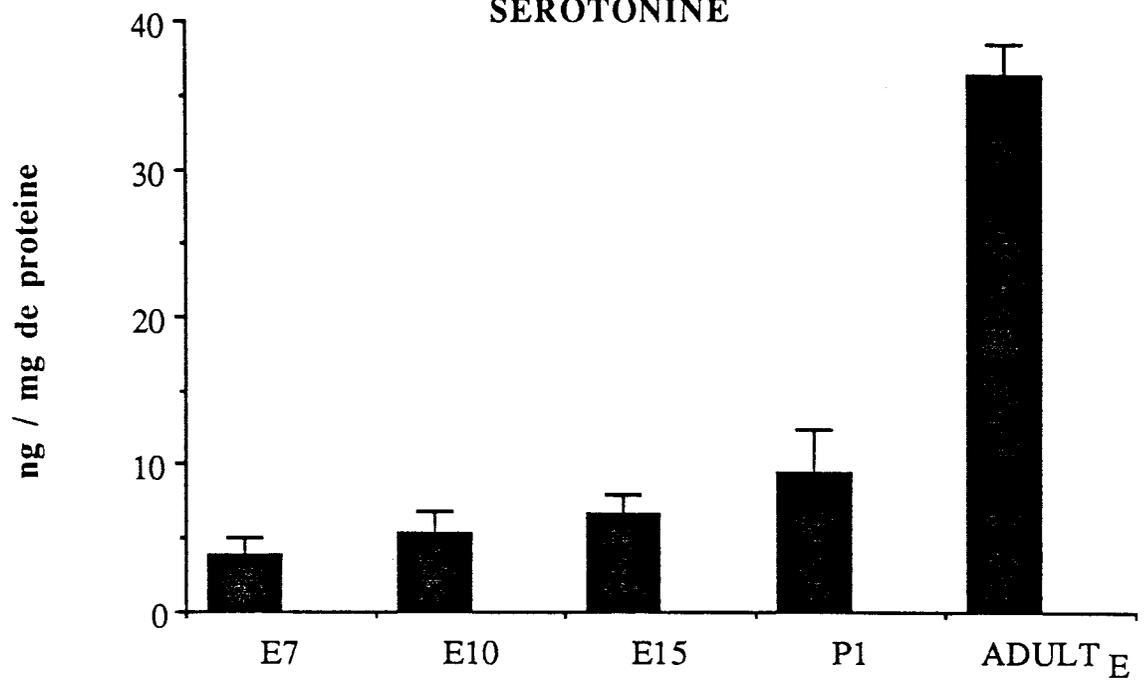
La quantité de sérotonine reste relativement constante de E7 à P1 (3-9 ng/mg de protéine) et augmente chez l'adulte (36 ng/mg de protéine) (Fig.11E).

Figure 11 : Evolution des quantités de neurotransmetteurs aminergiques : dopamine, noradrénaline, adrénaline et sérotonine au cours du développement du cerveau. Les résultats correspondent à la moyenne de 6 à 8 déterminations.





### SEROTONINE



## IV - DOSAGE DES FGF ACIDE ET BASIQUE.

### A) Techniques :

Les FGFs acide et basique ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose et dosés par mesure de l'activité mitogène et par test ELISA.

#### 1 - Purification

Les cerveaux de poulet des stades E7, E10, E15, E17, E19, P1 et adulte sont homogénéisés suivant un rapport volume/poids égal à 1, dans un tampon PBS contenant 0,14M chlorure de sodium, 1mM phényl méthyl sulfonyl fluoride (Sigma), 10 mM sodium phosphate pH 7,4, et après une heure à 0°C sont centrifugés (30000 g, 30 mn., 4°C). Les surnageants obtenus constituent les extraits bruts, un aliquote est prélevé pour les différents dosages. Pour chacun des stades étudiés, un volume d'extrait brut correspondant à 50 mg de protéines est appliqué sur une colonne contenant 50 mg d'héparine-Sepharose (Pharmacia) et préalablement équilibré à l'aide de la solution de PBS précédemment décrite. Après passage de l'extrait brut, la colonne est lavée par 10ml de PBS 0,65 M NaCl et l'élution est réalisée en 2 étapes : d'abord par 2 ml de PBS 1,3 M NaCl puis par 2 ml de PBS 2 M NaCl.

#### 2 - Activité mitogène.

La mesure de l'activité mitogène de 50 µl de chacun des extraits bruts et de 10µl des fractions d'élution 1,3 et 2 M NaCl d'héparine-Sepharose, est réalisée *in vitro* sur culture de fibroblastes CCL39 comme décrit dans le chapitre "Matériels et Techniques".

### 3 - Dosage ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).

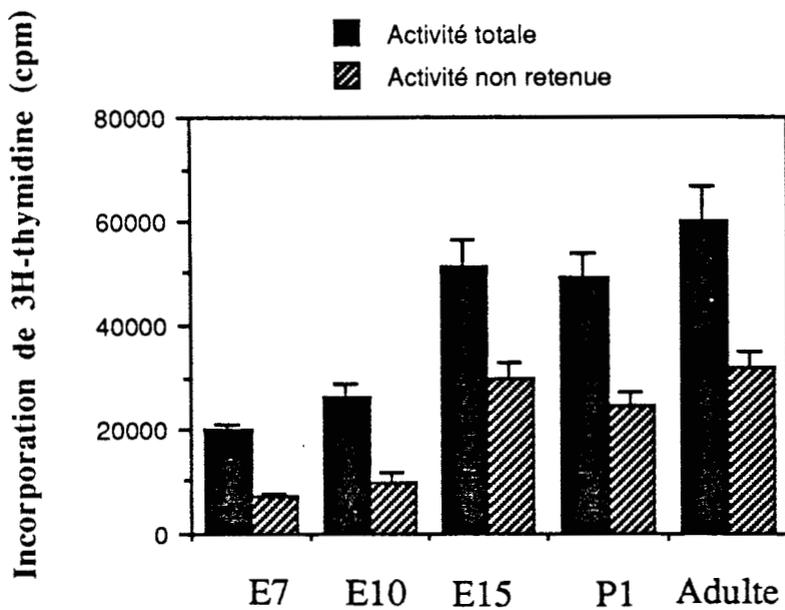
Il a été réalisé sur des extraits bruts et purifiés (1,3 M et 2 M NaCl sur héparine-Sépharose) de cerveaux aux stades E7, E10, E15, P1 et adulte. 5 mg de protéines pour les extraits bruts et 50 µl pour les fractions 1,3 M et 2 M NaCl d'élution d'héparine-Sepharose sont placés sur des puits de plaques de microtitration (Nunc-Immuno I). Après incubation (2 h. à 37°C puis une nuit à 4°C), les puits sont vidés, rincés 5 fois avec du PBS-Tween (PBS, 0,15 M NaCl, Tween 80 0,05%) et saturés par une solution PBS contenant 0,5% BSA pendant 4 h. à 37°C. Les puits sont ensuite rincés par la même solution de PBS Tween 5 fois et incubés avec la solution d'anticorps monoclonaux anti-FGFs reconnaissant les deux formes de FGFs (Boilly Y. Lille). Après 4 h. à 37°C, les plaques sont rincées 4 fois par du PBS-Tween et une fois par du PBS seul. La révélation des complexes antigène-anticorps est alors réalisée avec 100 µl d'une solution d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase (Pasteur) diluée au 1/500 dans du PBS 0,15 M NaCl pendant 2 h. à 37°C. Les puits sont ensuite rincés 3 fois par du PBS 0,15 M NaCl, puis une solution d'orthophénylbenzenediamine (OPD) (Sigma) à 2,2 mM dans le tampon citrate (acide citrique 100 mM, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 100mM, pH5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13 mM) est ajoutée. Après 15 mn. environ, la réaction est stoppée par 100 µl d'H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 4N. La densité optique est lue sur lecteur de plaques (Dynatech MR 700) à 490 nm.

## **B - Résultats :**

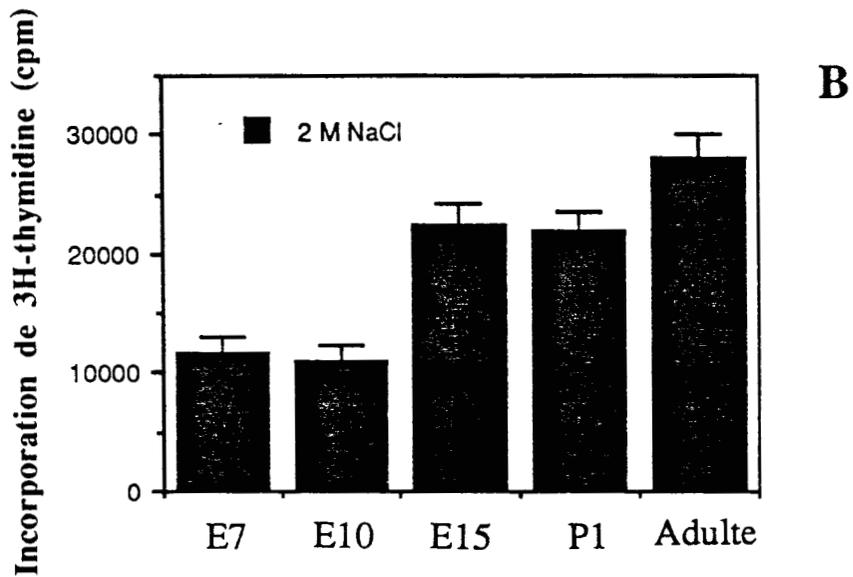
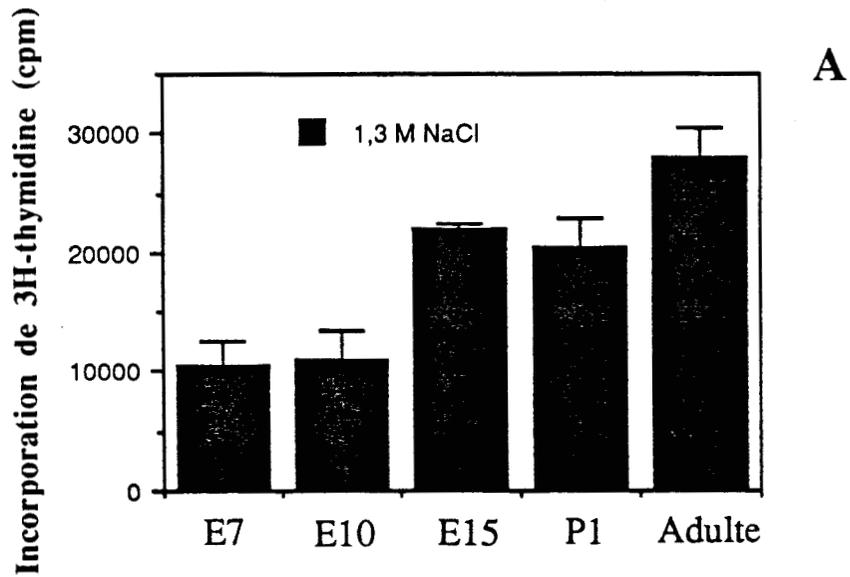
### 1 - Evolution de l'activité mitogène.

Les résultats (Fig.12) font apparaître que l'activité mitogène d'un extrait brut de cerveau est équivalente à E7 et E10, double entre E10 et E15 pour se maintenir ensuite relativement constante.

L'activité non retenue sur colonne d'héparine-Sepharose constitue approximativement 50% de l'activité totale pour chacun des stades étudiés. Cette activité augmente entre E10 et E15.



**Figure 12** : Evolution de l'activité mitogène (pour les fibroblastes CCL 39) totale et non retenue sur héparine-Sépharose, d'extraits de cerveaux au cours du développement. Les résultats correspondent à la moyenne de 5 déterminations.



**Figure 13** : Evolution de l'activité mitogène, retenue sur héparine-Sépharose et éluee en présence de 1,3 M NaCl (A) et 2M NaCl (B), d'extraits de cerveaux, au cours du développement. Les résultats correspondent à la moyenne de 5 déterminations.

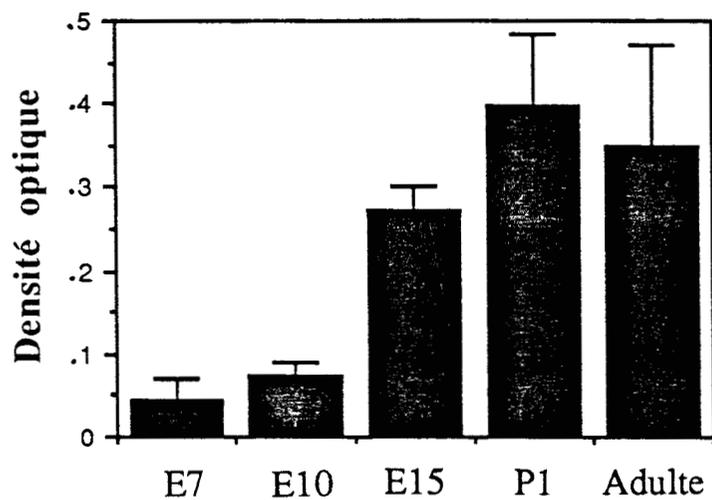


Figure 14 : Evolution de l'immunoréactivité anti-FGF (sans distinction forme acide, forme basique) présente dans les extraits de cerveaux à différents stades du développement. Les résultats correspondent à la moyenne de 5 déterminations.

Les activités retenues sur colonne d'héparine-Sepharose et éluées avec 1,3M (Fig.13A) et 2M NaCl (Fig.13B) apparaissent doubler entre E10 et E15 .

## 2 - Evolution des quantités de FGFs.

Les résultats (Fig.14) montrent que l'immunoréactivité anti-FGFs présente dans le cerveau, triple entre E10 et E15 ; les différences observées entre les stades ultérieurs ne sont pas significatives.

Les fractions 1,3M et 2M NaCl d'élution de la colonne d'héparine-Séparose apparaissent être en-dessous du seuil de sensibilité de notre méthode et n'ont pas pu être correctement dosées (non montré).

## V - DISCUSSION

Nous discuterons successivement les résultats concernant la prolifération cellulaire, la maturation neuronale et l'activité mitogène d'extraits de cerveaux.

### *Prolifération cellulaire.*

Nos résultats montrent que les synthèses d'ADN dans le cerveau complet et dans chacune de ses vésicules subissent une brutale diminution entre E7 et E10. Une diminution de la synthèse d'ADN peut s'interpréter soit comme une diminution du nombre de cellules engagées dans le cycle cellulaire, soit comme une augmentation de la durée du cycle cellulaire, ou bien encore comme une combinaison des 2 propositions précédentes. On sait que la durée du cycle cellulaire des cellules du cerveau embryonnaire diminue au cours du développement, par ailleurs, des expériences de comptage des cellules en mitose et en phase S montrent que la proportion de ces cellules diminue au cours du développement (Korr, 1980). Il est donc vraisemblable que la diminution des synthèses d'ADN observées au cours du développement corresponde à la fois à

une diminution de la prolifération cellulaire et à un allongement du cycle cellulaire. De plus, Tsai et al. (1981a), rapportent par analyse autoradiographique après injection de thymidine tritiée, que la période de génération des neurones est comprise entre E4 et E10 dans le télencéphale de poulet. La diminution brutale des synthèses d'ADN que nous observons à ces stades pourrait donc correspondre à l'arrêt de la production des neuroblastes. Par contre, les cellules gliales sont générées après E10, ce qui pourrait rendre compte du maintien d'une activité de synthèse d'ADN jusqu'à la naissance. Par ailleurs, la multiplication des cellules endothéliales intervenant pendant les processus d'angiogenèse doit également être prise en compte. Ces processus commencent dès E4 et se poursuivent pendant toute la croissance du cerveau. Si les phénomènes de vascularisation du cerveau ont été étudiés (Atterbury, 1923 ; Auerbach et al. 1976; Delorme, 1971), nous ne disposons par contre pas de données quant à l'évolution de la prolifération des cellules endothéliales au cours du développement. Cependant, l'activité angiogène du cerveau de poulet est importante de E12 à E18 (Risau, 1986) ce qui pourrait s'accompagner durant cette période d'une prolifération des cellules endothéliales.

Cependant, la méthodologie que nous avons utilisée permet d'avoir une information globale sur les synthèses d'ADN, mais ne permet pas de distinguer les différents types cellulaires impliqués.

Le deuxième point important de nos résultats est le comportement différent de l'ensemble métencéphale-myélocéphale par rapport aux autres vésicules. La vésicule formée par le télencéphale-diencéphale ainsi que le mésencéphale ont toujours un niveau de synthèse d'ADN inférieur au métencéphale-myélocéphale. Par ailleurs, dans cette dernière vésicule, un important niveau de synthèse se maintient jusqu'à l'éclosion. Ces données sont à rapprocher des données morphologiques qui montrent que le cervelet se forme par épaissement du métencéphale à partir de E8 et que sa croissance reste importante jusqu'à l'éclosion (Hanaway et al. 1967). Par ailleurs, dans le cervelet, la prolifération des cellules neuroépithéliales de la zone ventriculaire est complétée à partir de E12 par la prolifération des cellules corticales (Hanaway et al. 1967).

L'ensemble de nos résultats confirme donc les observations morphologiques et

cytologiques et les complète sur le plan quantitatif.

### *Maturation neuronale.*

Les deux principaux systèmes de neurotransmission chimique sont les systèmes aminergique et cholinergique.

Concernant le système cholinergique, le métabolisme de l'acétylcholine fait intervenir une enzyme de biosynthèse, la cholineacétyltransferase (CAT), qui à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A forme l'acétylcholine (Ach). Après libération dans la fente synaptique, l'acétylcholine est dégradée par une deuxième enzyme, l'acétylcholinestérase (Ach E). La mise en place du système cholinergique a déjà été étudiée au cours du développement du tissu nerveux. Ainsi, dans la rétine de poulet, une activité AchE est détectée dès E7 et augmente régulièrement au cours du développement et ce jusqu'à P21 (Martelly and Gautron, 1988).

Concernant le système aminergique, la biosynthèse des catécholamines débute par une hydroxylation de la tyrosine qui forme ainsi la dopa. Sous l'action de la dopa-décarboxylase se forme la dopamine qui peut être transformée en noradrénaline par la dopamine  $\beta$  hydroxylase. Enfin, une méthylation de la noradrénaline par une N-méthyl transférase permet d'aboutir à l'adrénaline. Les catécholamines peuvent être dégradées à l'intérieur du neurone par la monoamine oxydase (MAO) et dans la fente synaptique par la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT).

Notre étude indique que la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline et la sérotonine sont présents dans le tube nerveux dès E7. Cependant, leurs niveaux y sont très faible, ce qui traduit bien le faible niveau de différenciation neural qui a déjà rapporté à ce stade (Jacobson, 1978). La première catécholamine dont la quantité augmente fortement est la noradrénaline, entre E7 et E10 et surtout entre E10 et E15. Le taux de dopamine, quant à lui, augmente 6 fois entre E15 et P1. Enfin, la quantité d'adrénaline et de sérotonine augmente respectivement 3 et 4

fois entre P1 et l'état adulte. Ces résultats suggèrent que la différenciation des neurones noradrénergiques précède celle des neurones dopaminergiques qui est suivie par la différenciation adrénérergique et sérotoninergique. De façon plus globale, il apparaît que la différenciation catécholaminergique est antérieure à la différenciation sérotoninergique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hevor et al. (1988) qui rapportent que, dans des cultures de neuroblastes d'hémisphères cérébraux d'embryon de poulet, les catécholamines apparaissent à un niveau important dès le 2<sup>e</sup> jour de culture, alors qu'un niveau important de sérotonine apparaît au 4<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jour de culture. Ces auteurs rapportent également que dans les hémisphères cérébraux, la quantité de dopamine augmente régulièrement au cours du développement embryonnaire (E10, E18) et que le taux d'adrénaline et de sérotonine sont plus important à E12 et E14 qu'aux autres stades étudiés. Nous n'avons pas observé ces variations des taux d'adrénaline et de sérotonine ; cependant, notre étude concerne le cerveau dans son ensemble alors que ces auteurs n'ont étudié que les hémisphères cérébraux

#### *Activités mitogènes.*

Nos résultats indiquent que l'activité mitogène présente dans le cerveau de poulet augmente au cours du développement et ce, particulièrement entre E10 et E15. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Risau (1986) qui rapporte que l'activité mitogène du cerveau de poulet pour les cellules endothéliales augmente entre E9 et E17. Risau considère que ses données traduisent une activité angiogénique élevée entre E12 et E18 ; cependant, dans le cerveau adulte, l'angiogenèse est considérablement ralentie (Robertson et al. 1985), alors que nos résultats indiquent que l'activité mitogène se maintient à un haut niveau. Par ailleurs, Caday et al., (1990) montrent également une augmentation de l'activité mitogène du cerveau de rat jusqu'à P40. Dans le cas du poulet comme dans celui du rat, l'activité mitogène du cerveau augmente au cours du développement alors que l'activité mitotique diminue comme en témoignent les observations histologiques (Tsai et al. 1981a; Korr et al., 1980) et nos mesures de synthèse d'ADN. En fait, nous pensons qu'il n'y a pas contradiction entre ces deux

phénomènes puisque la présence de facteurs de croissance dans un tissu ne signifie pas que ces facteurs y exercent un rôle, car la présence de récepteurs spécifiques de ces facteurs sur les cellules est nécessaire à leur action.

L'activité mitogène du cerveau est essentiellement due à des molécules retenues sur héparine (Risau et al., 1986 ; Caday et al., 1990). Dans nos expériences, 50% de l'activité totale sont imputables à des "heparin-binding growth factors". Les 50% restant non retenus sur héparine-Sépharose peuvent rendre compte d'un rendement moyen de notre purification et/ou être dûs à la présence d'autres facteurs de croissance. L'activité retenue sur héparine-Sépharose a été éluée en 2 étapes : la première par 1,3 M NaCl, la seconde par 2 M NaCl. La fraction 1,3 M NaCl montre une augmentation d'activité notamment entre E10 et E15. Risau et al. (1988) montrent que l'activité mitogène du cerveau de poulet à E15 qui est retenue sur héparine et éluée en présence de 1,3 M NaCl correspond à du FGF acide. Cependant, les travaux de Risau ne donnent pas d'indication quant à l'évolution du taux de FGF acide au cours du développement. Par ailleurs, la fraction d'éluion 2 M NaCl contient une activité mitogène qui, dans de nombreux autres modèles, a pu être attribuée au FGF basique (chapitre Généralités) et dont la capacité de stimulation augmente également entre E10 et E15. Une augmentation de l'activité mitogène peut s'interpréter comme une augmentation de la quantité de FGF acide et basique ou comme une maturation de ces molécules qui deviendraient ainsi plus efficaces au niveau de leurs récepteurs. Bien que des phénomènes de maturation des FGFs aient déjà été rapportés (Ueno et al., 1986a ; Story et al., 1987 ; Feige et al., 1988a), nos mesures de l'immunoréactivité anti-FGF associée aux extraits de cerveaux indiquent que la quantité de FGF augmente effectivement au cours du développement. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par Seed et al. (1988) qui rapportent une augmentation de la quantité de FGF (sans distinction de forme acide ou basique) dans l'embryon entier de poulet entre E9 et E13. Par ailleurs, Thomas et al. (1990) indique que dans le cerveau de souris, la quantité de FGF acide, ainsi que l'expression de ces ARN messagers augmentent de E14 jusqu'à l'état adulte.

Il est intéressant de remarquer que la quantité de FGF acide et basique augmente entre E10 et E15 dans le cerveau de poulet, alors que la prolifération des neuroblastes cesse à E10 (Tsaï et al. 1981a). Après E10, les neuroblastes migrent et se différencient (Tsaï et al. 1981b). Le fait que la différenciation des neuroblastes en neurones est accompagnée d'une augmentation du taux de FGFs suggère que ces neurones seraient à l'origine de la production des FGFs. Cette hypothèse est en accord avec l'observation de Pettmann et al. (1986) qui montrent que dans le cervelet, l'immunoréactivité anti-FGF est associée aux neurones. De plus, cette augmentation du taux de FGF est également accompagnée par une augmentation importante dans le cerveau du taux de neurotransmetteurs catécholaminergiques comme le rapportent nos mesures. L'ensemble de ces résultats suggèrent une production du FGF par les neurones et en particulier, par les neurones catécholaminergiques

Cependant, une évolution de la quantité de FGF acide et basique ne peut rendre compte à elle seule de l'activité de ces facteurs au cours du développement du cerveau. En effet, on ne sait quels sont les types cellulaires cibles de ces facteurs et, bien que des récepteurs aux FGFs aient été détectés dans le cerveau adulte (Courty et al., 1988 ; Ledoux et al., 1989) et même récemment dans le cerveau embryonnaire à E17 (Olwin and Hauschka, 1990a), on ne sait pas si ces récepteurs sont présents à tous les stades embryonnaires, ni comment s'effectue la régulation de leur expression au cours du développement.

## **CHAPITRE II**

### **EXPRESSION DE SITES DE FIXATION SPECIFIQUES DES FGFs ACIDE ET BASIQUE**

#### **I - INTRODUCTION**

Comme nous l'avons vu précédemment, les quantités de FGF acide et basique changent au cours du développement du cerveau de poulet. Dans le but de comprendre comment l'activité biologique de ces facteurs de croissance peut être régulée, nous avons recherché la présence de sites de fixation spécifiques des FGFs et étudié leurs régulations au cours du développement du cerveau.

#### **II - MATERIELS ET METHODES**

Nous avons recherché la présence de sites de fixation pour les FGFs par des méthodes de dosage radiorécepteur et de pontage moléculaire sur des préparations membranaires de cerveaux et par mesure de l'expression d'ARN messager spécifiant une forme putative de récepteur des FGFs.

##### **A) Matériels**

Les FGFs acide et basique ont été purifiés au laboratoire à partir de cerveau de boeuf (Courty et al., 1987) ou obtenus par génie génétique et radioiodinés selon la méthode à la chloramine T comme rapporté dans le chapitre Matériels et techniques. Le dissuccinimidyl subérate chez Pierce Chemical Co, les poids moléculaires standards et les réactifs d'électrophorèse chez Biorad.

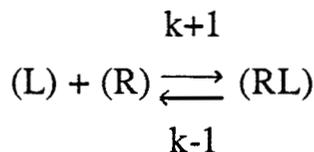
## B) Préparation des membranes

Les membranes de cerveaux sont préparées suivant la méthode développée par Ledoux et al. (1989), à partir de cerveaux de poulets prélevés à E7, E10, E15, P1 et chez l'adulte. Immédiatement après dissection, les cerveaux sont homogénéisés dans 2 volumes de Tampon A (20 mM Hepes pH 7,4 ; 5 mM EDTA ; 1 µg/ml de leupeptine ; 1 µg/ml de pepstatine ; 5 unités Kallikrein inhibitrices/ml d'aprotinine et 0,1 mM phénylméthylsulfonylfluorure) contenant 0,3 M sucrose. L'homogénat est ensuite centrifugé (1000 g ; 15 mn. ; 4°C) et le surnageant est à nouveau centrifugé (30000 g ; 15 mn. ; 4°C). Le culot obtenu est resuspendu dans le Tampon A contenant 3M MgCl<sub>2</sub>, incubé pendant 30 mn. à 4°C et après dilution dans du Tampon B (Tampon A sans EDTA avec 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub> et 0.1 M NaCl), la solution est centrifugée (30000 g, 30 mn., 4°C). Le culot est repris dans du Tampon B et à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions (30000 g, 30 mn., 4°C). Le culot final contenant la préparation membranaire brute est resuspendu dans du Tampon B et stocké à -70°C à une concentration de 1mg/ml. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (cf Matériels et techniques).

## C) Dosages radiorécepteurs

### 1 - Considérations méthodologiques :

L'interaction entre un Ligand et son récepteur peut être modélisée par une réaction à une seule étape, bimoléculaire et réversible :



avec (R) : concentration de récepteurs spécifiques libres

(L) : concentration du ligand libre

(RL) : concentration du complexe ligand-récepteur

$k+1$  : constante de vitesse d'association ( $M \text{ Sec}^{-1}$ )

$k-1$  : constante de vitesse de dissociation ( $M^{-1}\text{sec}^{-1}$ )

La loi d'action de masse permet de définir les constantes d'association ( $K_a$ ) et de dissociation ( $K_d$ ) de l'interaction ligand-récepteur.

$$K_a = \frac{k+1}{k-1} = \frac{(RL)}{(L)(R)} \quad ; \quad K_d = \frac{k-1}{k+1} = \frac{(R)(L)}{(RL)}$$

Pratiquement, l'interaction ligand-récepteur est étudiée par utilisation d'un traceur, le plus souvent un ligand marqué par un isotope radioactif  $L^*$ , la concentration fixée aux récepteurs ( $RL^*$ ) ou libre ( $L^*$ ) pourra aisément être mesurée. La détermination du nombre et de l'affinité des récepteurs se fait soit par saturation par des quantités croissantes du ligand marqué, soit par compétition entre une quantité constante de ligand marqué et des quantités croissantes de ligand froid.

#### a) Etude par saturation

La saturation d'un récepteur par son ligand est représentée par la courbe

$$(RL^*) = f(L^*) \quad (\text{Fig.15})$$

Sachant que :  $K_d = \frac{(R)(L^*)}{(RL^*)}$  (loi d'action de masse)

et que la concentration totale en récepteur  $R_t$ , suivant la loi de conservation, est

définie par :

$$(R_T) = (R) + (RL^*)$$

L'équation d'équilibre peut alors s'écrire :

$$(RL^*) = (L^*) \frac{((R_T) - (RL))}{K_d}$$

moyennant quelques transformations, on aboutit à :

$$(RL^*) = \frac{((L^*)/K_d) (R_T)}{1+((L^*)/K_d)}$$

La fonction  $(RL^*) = f(L^*)$  est une parabole. Les valeurs de  $(R_T)$  et  $K_d$  sont alors directement obtenues sur cette courbe (Fig.15).

- lorsque  $(L^*)$  est grand, alors  $(RL^*) = (R_T)$  (limite de la parabole)
- lorsque  $(RL)^* = \frac{R_T}{2}$  alors  $K_d = (L^*)$

2

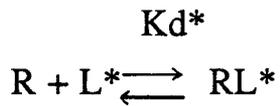
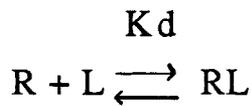
#### b) Etude par compétition

La compétition entre ligand froid et ligand marqué au niveau du récepteur peut être définie par la courbe :

$$RL^* = f(T_T) \quad (\text{Fig.16})$$

où  $(T_T)$  est la concentration totale en ligand marqué et non marqué.

En présence de ligand marqué  $L^*$  et froid  $L$ , le modèle le plus simple pour l'étude de l'interaction ligand-récepteur est représenté par 2 réactions à une seule étape, bimoléculaires et réversibles :



La loi d'action de masse permet de définir :

$$K_d^* = \frac{(R)(L^*)}{(RL^*)} \quad \text{et} \quad K_d = \frac{(R)(L)}{(RL)}$$

d'où

$$RL^* = R_T \frac{L^*/K_d}{1 + L/K_d + L^*/K_d^*}$$

$$\text{où } L^* = T^* - RL^*$$

$$\text{et } L = \frac{1}{2} [T - K_d (1 + L^*) - R_T +$$

$$+ \sqrt{T^2 + 2 (K_d (1 + L^*) - (R_T)) T + (K_d (1 + L^*) + (R_T))^2} \\ K_d^* \qquad \qquad \qquad K_d^*$$

Si l'on considère  $K_d = K_d^*$ , on obtient alors

$$RL^* = \frac{R_T + T + T^* + 1/k_d - (R_T + T + T^* + 1/k_d)^2 - 4(1 + T/T^*)T^*(R_T)}{2(1 + T/T^*)}$$

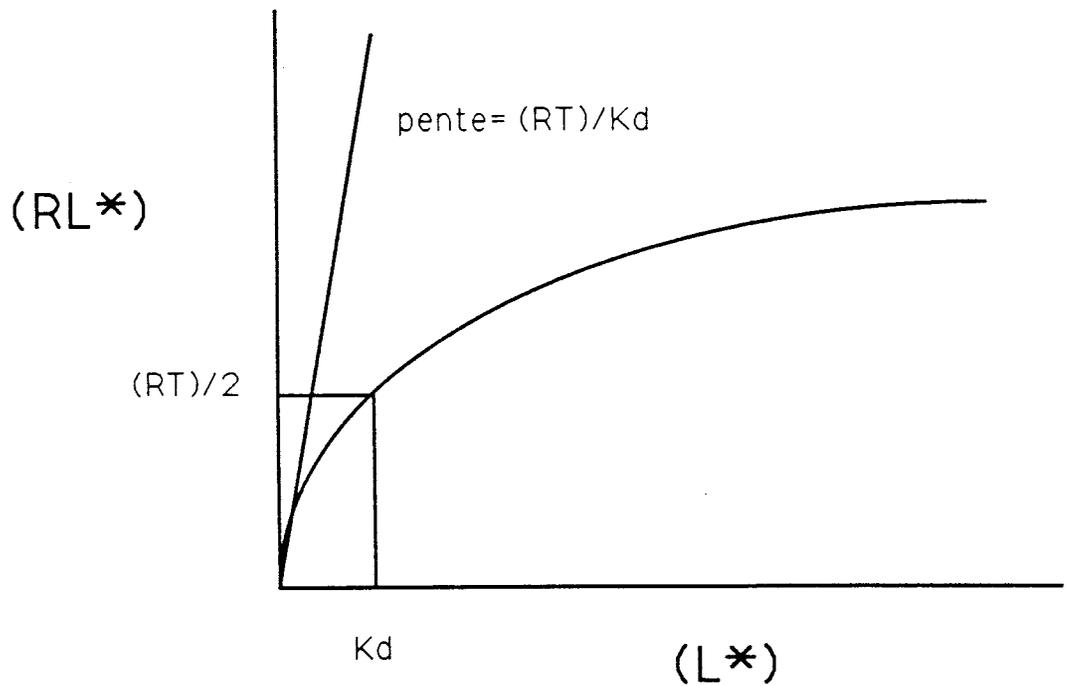


Figure 15 : Représentation de la saturation d'un récepteur R par un ligand radiomarqué ( $L^*$ ).  $R_t$  : concentration totale en récepteurs.  $K_d$  : constante de dissociation du complexe ligand-récepteur.

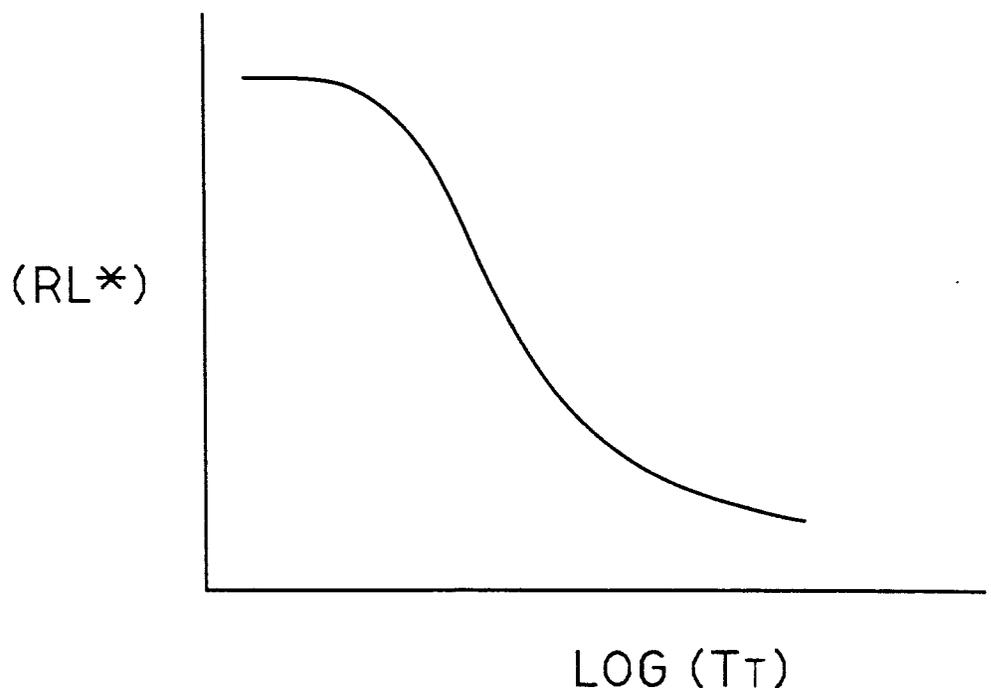


Figure 16 : Représentation de la compétition entre un ligand radiomarqué ( $L^*$ ) et un ligand non radiomarqué ( $L$ ) pour un récepteur R.

Posant  $T_T = T + T^*$ , cette équation définit la courbe  $RL^* = f(T_T)$ , (Fig.16)

à partir de laquelle, il apparaît difficile de retrouver les constantes d'affinités ainsi que le nombre de sites récepteurs. Cependant, des linéarisations apparaissent possibles et permettent de retrouver les valeurs de  $K_d$  et  $(R_T)$ . Il s'agit notamment de la linéarisation de Scatchard.

### c) Linéarisation de Scatchard

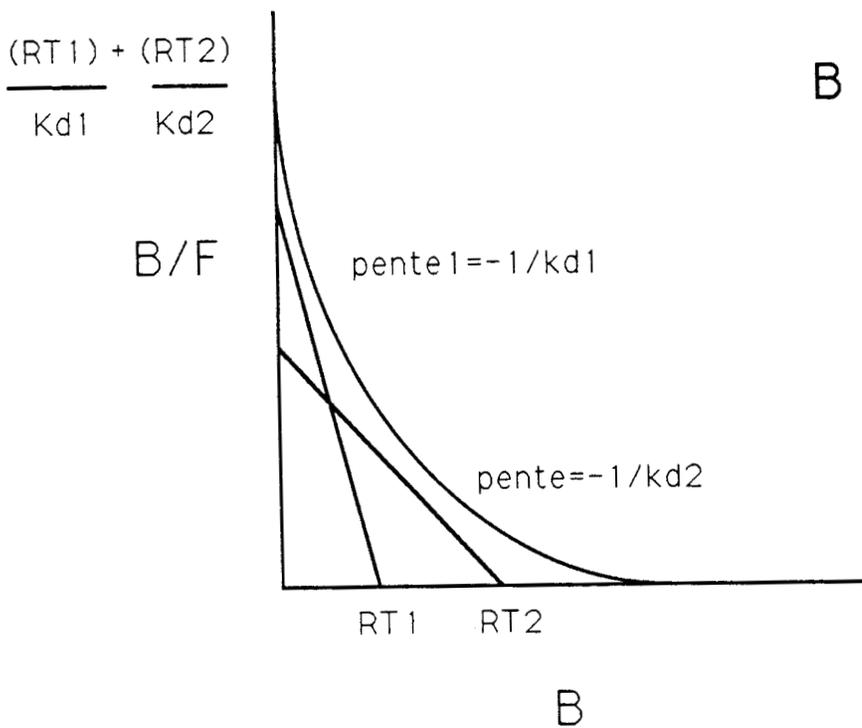
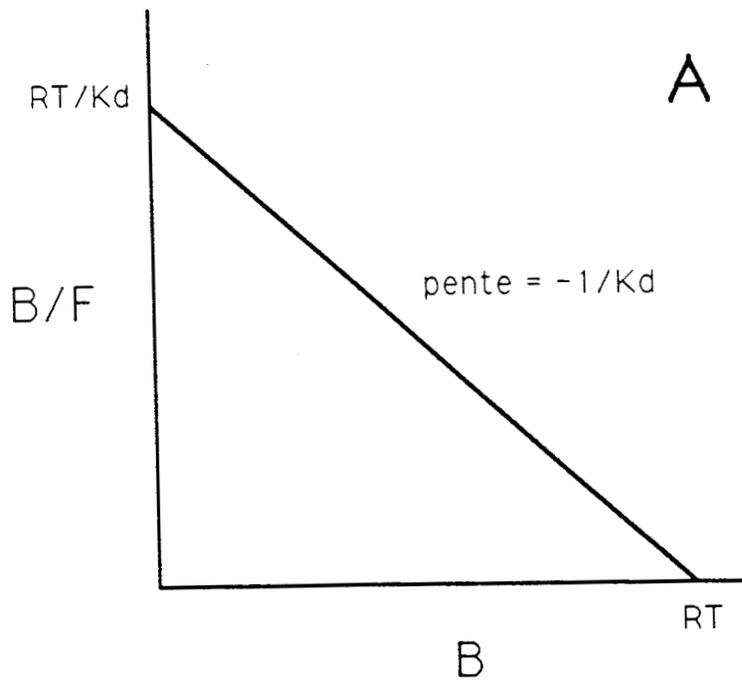
Que la méthode utilisée soit basée sur des expériences de saturation ou de compétition au niveau du récepteur, il est possible de linéariser les courbes obtenues. La méthode la plus couramment utilisée est la représentation de Scatchard :

$$(RL)/L = f(RL) \quad (\text{Fig.17})$$

qui peut être définie par l'équation générale dans laquelle, pour des raisons de simplification, nous ferons abstraction de la répartition ligand marqué/ligand non marqué.

$$\frac{(RL)}{(L)} = \frac{(R_T) - (RL)}{K_d}$$

L'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses définit le nombre de récepteurs  $R_T$  ; l'intersection avec l'axe des ordonnées le rapport  $R_T/K_d$ , la pente de la courbe définit la valeur  $-1/K_d$ . La transformée de Scatchard peut être une droite (Fig.17A), on définit alors une catégorie de sites récepteurs suivant la méthode de calcul précédemment décrite, mais elle peut être également courbe, concave ou convexe. Dans le cas des récepteurs aux FGFs on observe une courbe concave (Fig.17B). Plusieurs interprétations sont alors possibles. L'aspect concave de la courbe peut refléter 1) une différence d'affinité entre ligand marqué et ligand non marqué, lorsque la méthode utilisée est celle de la compétition. Si



**Figure 17** : Représentation de Scatchard monophasique (A) et biphasique (B) permettant de définir les constantes de dissociation ( $K_d$ ) et le nombre de récepteurs  $R$  pour un ligand  $L$ .  $B$  et  $F$  représentent respectivement la concentration en ligand lié au récepteur et la concentration en ligand libre.

l'affinité du ligand marqué est plus faible que celle du ligand non marqué, la courbe de Scatchard est concave. Il est donc indispensable de contrôler la qualité du ligand marqué. 2) un phénomène de coopérativité négative au niveau du récepteur, c'est-à-dire que l'affinité du récepteur diminue en présence de quantités croissantes de ligand ; dans ce cas, la mesure de la dissociation du complexe ligand-récepteur et le calcul du coefficient de Hill permettent de définir un phénomène de coopérativité négative. 3) la présence de deux catégories de récepteurs, une première catégorie de récepteurs à haute affinité et faible capacité et une catégorie de récepteurs à basse affinité et forte capacité. L'affinité et la capacité de ces 2 catégories de récepteurs sont extrapolées à partir d'ajustement par les moindres carrés de courbe théoriques impliquant deux sites (Fig.17B).

L'analyse de Scatchard, qui résulte d'une exploitation mathématique des expériences de saturation ou de compétition réalisées entre le ligand et le récepteur, doit donc s'interpréter avec prudence. Cela est notamment le cas de l'analyse par compétition, qui peut être source d'erreurs étant donné que : 1) la concentration de ligand marqué est fixée au départ de l'expérimentation ; or, cette concentration peut ne pas correspondre à la zone optimale d'étude définie par le  $K_d$  ; de plus, en présence de fortes concentrations de ligand marqué, les erreurs sur l'estimation de la concentration de ligand lié sont grandes. 2) la qualité du ligand marqué peut être différente de celle du ligand froid entraînant ainsi, comme nous l'avons vu, des distorsions de la courbe de Scatchard. 3) l'équation de la courbe de déplacement est complexe et l'ajustement auquel elle donne lieu peut n'être que très légèrement meilleur à l'ajustement d'une courbe impliquant un seul site : il est alors difficile de faire un choix entre un ou plusieurs sites.

## 2 - Réalisation des dosages radiorécepteurs

### a) Optimisation des conditions expérimentales

*Effet de la concentration membranaire* : Des quantités croissantes de membranes (5 à 100 µg de protéine) sont incubées dans des tubes de polystyrène avec une quantité constante (23 pM) de I<sup>125</sup>-FGFa ou I<sup>125</sup>-FGFb, dans un volume final de 500 µl de tampon B, 0,5% BSA pour 60 mn. à 4°C. A l'issue de la période d'incubation, les tubes sont centrifugés et après élimination du surnageant, la radioactivité fixée sur le culot de membranes est mesurée (compteur gamma LKB Wallac). La fixation non spécifique est déterminée en ajoutant un excès de 2000 fois de FGF acide et basique froid au mélange réactionnel.

*Cinétiques de fixation.* : 23 pM de I<sup>125</sup>-FGFa sont ajoutés à 30 µg d'équivalent protéine de la préparation membranaire et incubés pour 5, 15, 30, 40, 50, 60 et 80 mn. à 4°C. Lorsque la situation d'équilibre est atteinte, un excès de 1000 fois de FGF acide ou basique froid est ajouté au mélange réactionnel. La radioactivité fixée est mesurée au niveau du culot membranaire après centrifugation (5000 g, 5 mn., 4°C).

### b) Dosage par compétition.

Le dosage radiorécepteur par compétition est réalisé suivant la méthode développée par Courty et al. (1988). 30 µg (équivalent protéine) de préparations membranaires sont incubés en présence de 23 pM de I<sup>125</sup>-FGFa ou I<sup>125</sup>-FGFb dans un volume final de 500 µl de tampon B, 0,5% BSA avec des quantités croissantes de FGF acide ou basique non marqué (0 à 46 nM). Après centrifugation (5000 g, 5 mn., 4°C), la radioactivité est mesurée au niveau du culot membranaire et les données obtenues sont analysées à l'aide du programme LIGAND (Munson et Rodbard, 1980).

c) Traitements enzymatiques des membranes.

5 mg de protéines membranaires sont incubés 1 heure à température ambiante dans 10 ml de Tampon B contenant 10 U/ml d'héparinase (EC.4.2.2.7., Sigma) ou 10 U/ml de chondroïtinase ABC (EC 4.2.2.4., Sigma). Un témoin est réalisé en l'absence d'enzyme.

d) Traitement des membranes après fixation des  $I^{125}$  - FGFs.

30  $\mu$ g (équivalent protéine) de membranes sont incubés en présence de 23 pM de  $I^{125}$ -FGFa ou b pendant 1 h à 4°C. A l'issue de cette période, le milieu d'incubation est centrifugé (5000 g, 10 mn., 4°C), le culot membranaire est récupéré et resuspendu dans 500  $\mu$ l de tampon de liaison contenant 0,15 M NaCl (témoin), 2 M NaCl, 0,6 M NaCl ou dans 500  $\mu$ l de tampon de liaison à pH 4. Après 2 mn. à 4°C, les tubes sont centrifugés (5000 g, 10 mn., 4°C). Le surnageant est aspiré et la radioactivité contenue dans le culot membranaire est mesurée comme précédemment décrit.

e) Dosage par saturation

30  $\mu$ g (équivalent protéine) de préparation membranaire sont incubés en présence de doses croissantes (3 à 185 pM) de  $I^{125}$ -FGFa ou b dans 500  $\mu$ l de Tampon B 0,5% BSA pour 60 mn. à 4°C. Après cette période, la radioactivité fixée au niveau des membranes est mesurée comme précédemment décrit pour le dosage par compétition, et les données obtenues sont analysées à l'aide du programme LIGAND (Munson and Rodbard, 1980). La fixation non spécifique est obtenue en présence d'un excès de 2000 fois de FGFa ou FGFb non marqué.

#### D) PONTAGE MOLECULAIRE.

Les expériences de pontage covalent entre I<sup>125</sup>-FGFs et protéines membranaires sont réalisées suivant la méthode développée par Ledoux et al. (1989). 500 µg (équivalent protéine) de membranes sont incubés dans 500 µl de tampon B avec 10 nM de I<sup>125</sup>-FGFa ou b en présence ou en l'absence d'un excès de FGF a ou b non radiomarqués de 100 fois. Après 60 mn. d'incubation, la réaction est initiée par addition de 0,1 mM dissuccinimidyl subérate. 15 mn. plus tard, la réaction est arrêtée par 10 mM de méthylamine ; les membranes sont ensuite lavées par des centrifugations répétées dans le Tampon B et solubilisées par incubation dans une solution : Tris 70mM pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, 0,1% Triton X-100, pour 15 mn. à 4°C. Le matériel non solubilisé est éliminé par centrifugation (60 mn., 10000 g, 4°C) et le surnageant analysé par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide (5-10%) en présence de SDS (SDS-PAGE), dans les conditions décrites par Laemmli (1970). Le gel d'électrophorèse est ensuite séché et radioautographié à -70°C à l'aide d'un film Kodak-X omat R.

#### E) Mesure de l'expression des ARNm.

La détection de l'expression d'ARN messagers (ARNm) codant pour un récepteur putatif des FGFs a été réalisée par mesure de l'hybridation d'une sonde ADNc radiomarquée sur des préparations d'ARNm de cerveau de poulet à différents stades du développement

##### *Obtention de la sonde ADNc.*

La sonde ADNc utilisée est composée de 860 bp et comprend la partie 5' non codante et le premier domaine immunoglobuline du gène BEK humain (Dionne et al., 1990). Les plasmides contenant cette sonde nous ont été fournis par le Dr Jaye (Rorer Central Research PA 19406), leur transfection a été réalisée dans E. Coli

; l'amplification, la purification et le radiomarquage de la sonde ADNc ont été réalisés dans le laboratoire de biotechnologie des cellules eucaryotes (Paris XII) par D. Thomas et D. Ledoux.

*Préparation des ARN messagers et Northern-blot.*

Les cerveaux obtenus à E7, E10, E15 et P1 sont pulvérisés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier, puis homogénéisés dans 50 ml de tampon guanidium (Guanidine thyocyanate 4,7M; acétate de sodium 0,02M; Sarcosinate de sodium 0,5%; Tris-HCl 50 mM; pH 7,4 ;  $\beta$  mercaptoéthanol 100 mM). Cet homogénat est déposé sur coussin de chlorure de césium et après centrifugation (125000g, 18 h, 4°C), le culot (contenant les ARN) est rincé par une solution aqueuse d'éthanol à 70% puis séché à température ambiante et enfin repris dans 300  $\mu$ l d'eau stérile (traitée au DEPC et autoclavée). Les ARN sont alors précipités en présence de 30  $\mu$ l d'acétate de sodium dans 2 volumes d'éthanol et conservés à -70°C jusqu'à utilisation.

La purification des ARN poly A<sup>+</sup> (ARN messagers) est réalisée en utilisant le kit de purification fourni par Pharmacia et suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les ARN précédemment purifiés sont centrifugés, séchés à température ambiante et resuspendus dans de l'eau stérile. La concentration en acides nucléiques est obtenue par mesure de la densité optique à 260 nm (une densité optique de 1 est obtenue pour une concentration de 40  $\mu$ g/ml d'ARN). 500  $\mu$ g d'ARN totaux sont déposés sur la colonne oligo dT cellulose. Le matériel retenu est élué à faible force ionique et à 65°C puis précipité par 100  $\mu$ l d'acétate de sodium 2M dans 2 volumes d'éthanol. Le précipité est récupéré par centrifugation (350g ; 2mn) et les ARNm ainsi purifiés sont stockés à -80°C. 10  $\mu$ g d'ARNm sont ensuite dénaturés et soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (1,2%) dénaturant (2,2M formaldéhyde) pendant une nuit sous 20 volts constant en Tampon MOPS (20 mM MOPS; acétate de sodium 50 mM; EDTA 10 mM; pH7). Après migration, le gel est rincé abondamment à l'eau milli Q et les ARNm sont transférés par un flux de tampon SSC (citrate trisodique 15 mM;

NaCl 3M) sur une membrane Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) pendant 16 h. La fixation covalente des ARNm est assurée par un traitement alcalin de la membrane avec de la soude 0.05N pendant 5 mn.. La membrane est ensuite photographiée sous UV (312 nm) et stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

#### *Hybridation de la sonde ADNc sur Northern Blot.*

La membrane de Northern blot est incubée pendant 4 h à 65°C dans le Tampon de préhybridation (SSC 20X, 7,5ml; polyvynilpirodilone 0,1% ; Ficoll 400 0,1%; SAB 0,1%; SDS 0,5%; eau desionisée 25ml; ADN de veau 100 µg/ml). La sonde ADNc marquée au <sup>32</sup>P est ensuite ajoutée à la concentration de 1 à 2. 10<sup>6</sup> cpm/ml. Après une nuit à 65°C, la membrane est lavée 2 fois 15 mn. à température ambiante dans un Tampon SSC 2x , 0,1% SDS, puis 2 fois, 15 mn. en SSC 0,1x, 0,1% SDS à 65°C. L'autoradiographie de la membrane est menée en présence d'écrans intensificateurs à l'aide de films X-Omat S Kodak. L'analyse densitométrique du radioautogramme est réalisée à l'aide de l'analyseur d'images Samba 2005.

### III- RESULTATS

#### A) Dosages radiorécepteurs

##### 1 - Optimisation des conditions expérimentales.

##### *Effet de la concentration membranaire*

- FGF acide : Les résultats obtenus (Fig.18A) montrent que la fixation totale de I<sup>125</sup>-FGFa sur les membranes de cerveau (E15) dépend de la quantité de membranes. Une fixation totale maximale est atteinte pour 100 µg/ml (équivalent protéine) de membranes. La fixation non spécifique (non déplacée par un excès de

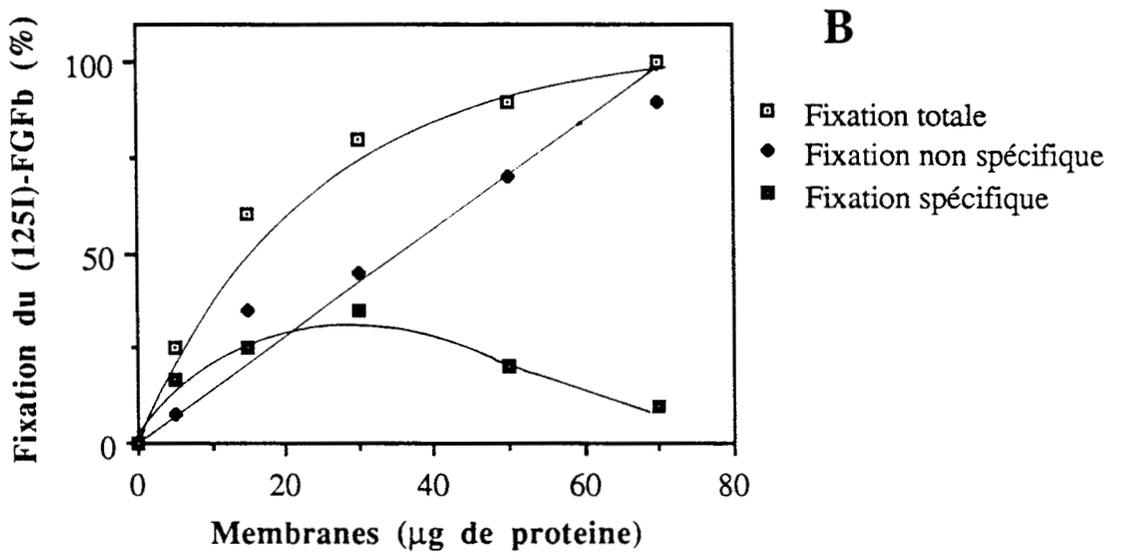
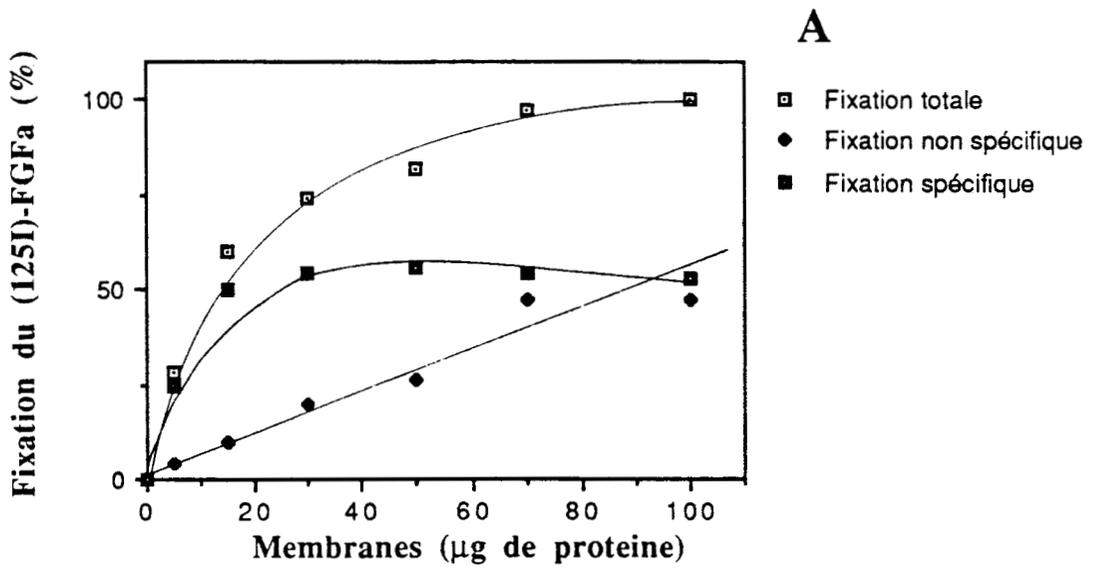


Figure 18 : Effet de la concentration de membranes de cerveaux (E15) sur la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGF acide (A) et du  $^{125}\text{I}$ -FGF basique (B).

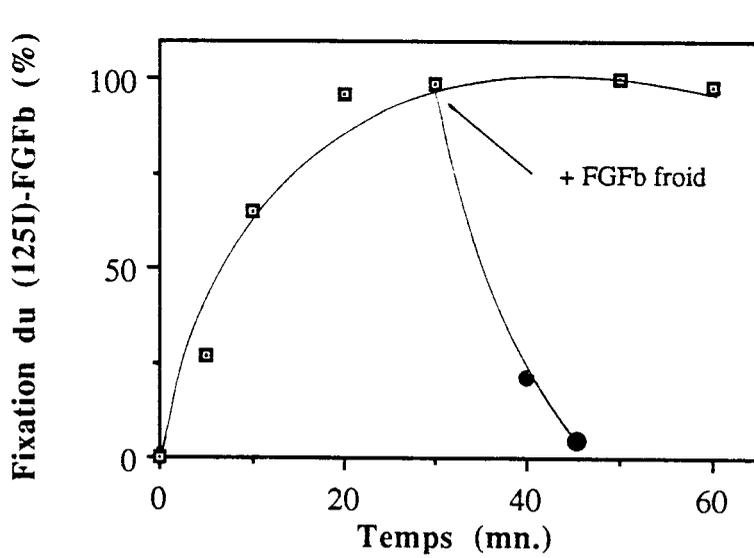
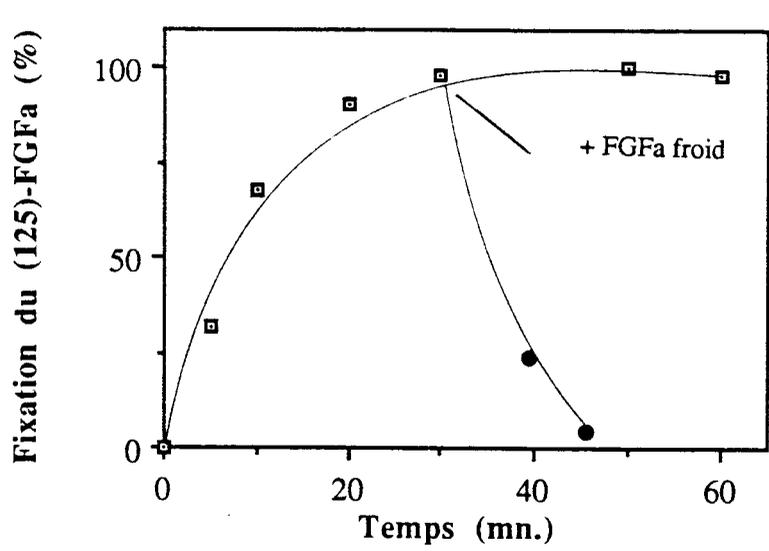


Figure 19 : Cinétique de la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGF acide (A) et du  $^{125}\text{I}$ -FGF basique (B) sur les membranes de cerveaux (E15).

FGF froid) n'apparaît pas saturable. La fixation spécifique (fixation totale - fixation non spécifique) est maximum pour 30  $\mu\text{g}$  (équivalent protéine) de membranes.

- FGF basique : L'évolution de la fixation totale, spécifique et non spécifique du  $I^{125}$ -FGFb en fonction de la concentration membranaire (Fig.18B), indique que la fixation spécifique est maximum pour 30  $\mu\text{g}$  (équivalent protéine) de membranes..

### *Cinétique de la fixation*

Les résultats montrent respectivement les cinétiques d'association et de dissociation des FGFs acide (Fig.19A) et basique (Fig.19B). Dans les 2 cas, une fixation spécifique maximale est atteinte après 30 mn. d'incubation. L'adjonction de FGF non marqué diminue de 70% la fixation spécifique après 10 mn. et de 98% après 15 mn. d'incubation.

## 2) Mesure du niveau de fixation des FGF acide et basique.

### *Evolution de la fixation des FGFs au cours du développement.*

- FGF acide : Les résultats (tableau 5 A) montrent l'évolution la fixation totale, spécifique et non spécifique du FGF acide au niveau des membranes de cerveau à E7 et E10, E15, P1 et au stade adulte. La fixation non spécifique (fixation en présence d'un excès de 1000 fois en FGFa froid) représente 30 à 55% de la fixation totale suivant le stade considéré. Le niveau de fixation spécifique diminue significativement entre E7 et E10, se maintient constant jusque P1 et diminue chez l'adulte.

- FGF basique : Les résultats (tableau 5 B) montrent l'évolution de la fixation totale, spécifique et non spécifique du FGF basique sur les membranes de cerveau au cours de l'embryogenèse. La fixation non spécifique représente 69-77% de la fixation totale. Le niveau de fixation spécifique est maximum à E7, diminue à E10, se maintient relativement constant jusqu'à P1 et diminue de moitié chez

**A**

	<b>E7</b>	<b>E10</b>	<b>E15</b>	<b>P1</b>	<b>Adulte</b>
<b>Fixation totale</b> (cpm)	12384	9441	12487	8833	5033
<b>Fixation non spécifique</b> (cpm)	3496	3039	4467	3850	2900
<b>Fixation spécifique</b> (cpm)	8888 (1200)	6302 (1153)	7020 (990)	4983 (1640)	2133 (1889)

**B**

	<b>E7</b>	<b>E10</b>	<b>E15</b>	<b>P1</b>	<b>Adulte</b>
<b>Fixation totale</b> (cpm)	22193	15935	17878	19726	12900
<b>Fixation non spécifique</b> (cpm)	15471	11360	12300	15040	10700
<b>Fixation spécifique</b> (cpm)	6722 (1824)	4575 (1256)	5578 (1828)	4686 (1510)	2200 (790)

Tableau 5 : Evolution de la fixation totale, spécifique et non spécifique du  $^{125}\text{I}$ -FGF acide (A) et du  $^{125}\text{I}$ -FGF basique (B). Les résultats correspondent à la moyenne de 8 déterminations ; entre parenthèses l'écart type.

**A**

Traitement	Témoin tampon	2 M NaCl	0,6 M NaCl	pH4
Fixation Spécifique (cpm)	6500 (1400)	760 (200)	2215 (705)	5032 (1005)

**A**

Traitement	Témoin	Héparinase	Chondroïtinase
Fixation Spécifique (cpm)	4300 (1300)	780 (78)	3600 (956)

**B**

Traitement	Témoin tampon	2 M NaCl	0,6 M NaCl	pH4
Fixation Spécifique (cpm)	4200 (1100)	540 (97)	1400 (400)	3500 (1000)

**B**

Traitement	Témoin	Héparinase	Chondroïtinase
Fixation Spécifique (cpm)	3300 (1300)	1000 (567)	3100 (1500)

**Tableau 6** : Sensibilité de la fixation du FGF acide (A) et du FGF basique (B) sur les membranes de cerveau de poulet (E15). Les résultats correspondent à la moyenne de 5 déterminations ; entre parenthèses l'écart type.

l'adulte.

### 3- Sensibilité de la fixation des FGFs à divers traitements.

La sensibilité de la fixation des FGFs acide et basique sur les membranes de cerveau a été étudiée chez l'embryon de 15 jours (E15).

- FGF acide : Les résultats (tableau 6A) montrent que la fixation spécifique du FGF acide est diminuée de 80% et 65% après lavage par une solution contenant respectivement 2 M NaCl, 0,6 M NaCl et est diminuée de 23% après lavage par une solution à pH 4. Le traitement préalable des membranes par l'héparinase diminue de 80% la fixation spécifique du FGF acide, alors que la chondroïtinase ne la diminue que de 15%.

- FGF basique : Les résultats (tableau 6B) indiquent qu'un lavage des membranes après fixation du FGF basique par une solution contenant 2 M NaCl et 0,6 M NaCl diminue respectivement de 87% et 67% la fixation spécifique de ce facteur. Une solution à pH 4 élimine 17% du FGF basique fixé. Un traitement des membranes, préalablement à la fixation du FGF basique, par l'héparinase, diminue de 70% le niveau de fixation. La chondroïtinase ne diminue la fixation que de 6%.

### 4 - Analyse de la fixation par compétition.

- FGF acide : Les courbes de déplacement de la fixation du FGF acide radiomarqué par du FGF acide non radiomarqué au niveau des membranes de cerveau indiquent que le déplacement du FGF marqué par son homologue non marqué est dose-dépendant et permettent de tracer les courbes de Scatchard (Fig. 20). Ces courbes sont biphasiques pour tous les stades embryonnaires étudiés E7 (A) ; E10 (B) ; E15 (C) ; P1 (D) ; adulte (E). Par contre, chez l'adulte, la représentation de Scatchard est linéaire. Les caractéristiques de ces sites de fixation déduites à partir des courbes de Scatchard sont rassemblées dans le tableau 7. Une première catégorie de sites de fixation possédant un Kd de 100 pM

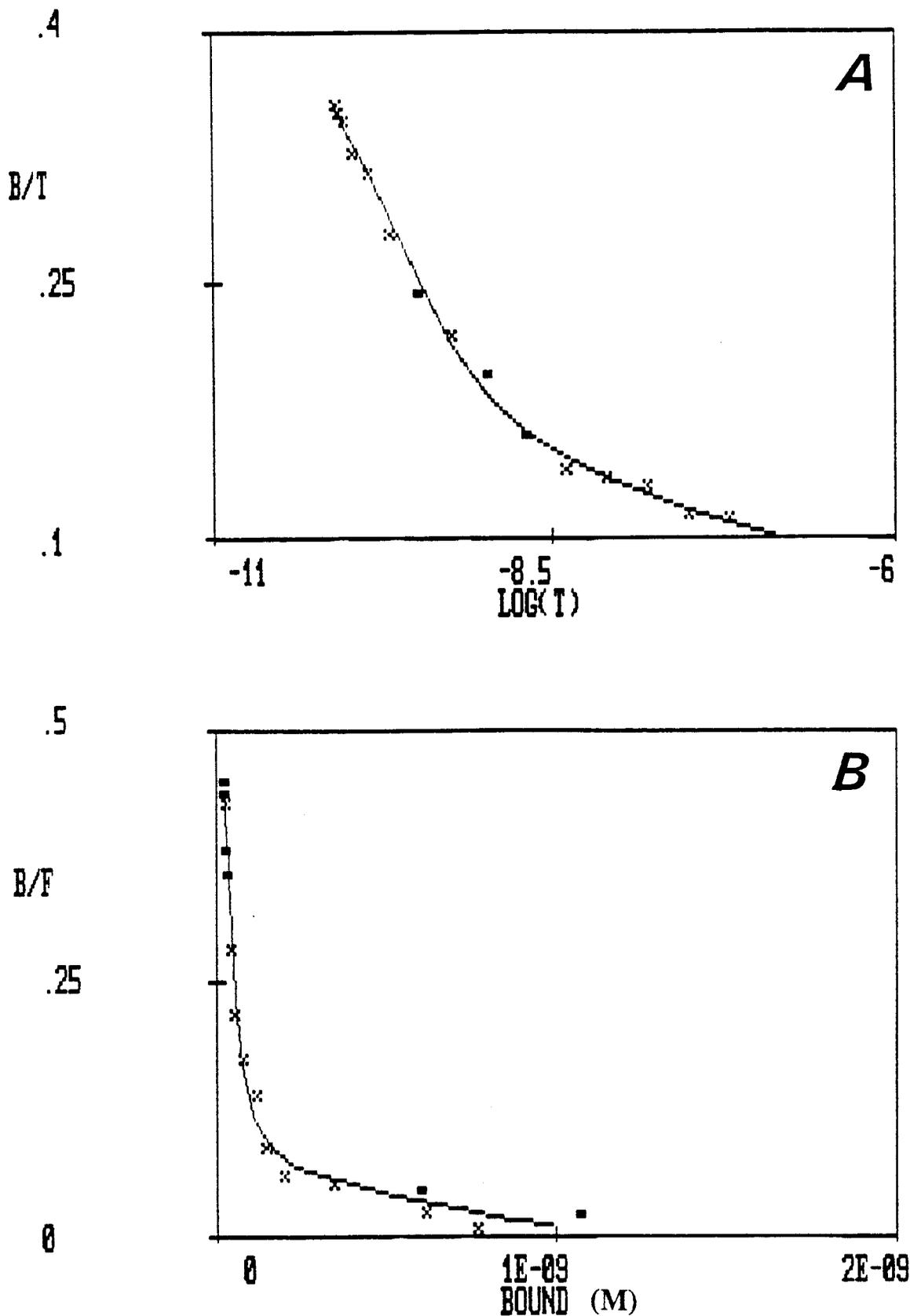


Figure 20 A: (A) Courbe de déplacement de la fixation du FGF acide radiomarqué par du FGF acide non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à E7. (B) Transformée de Scatchard.

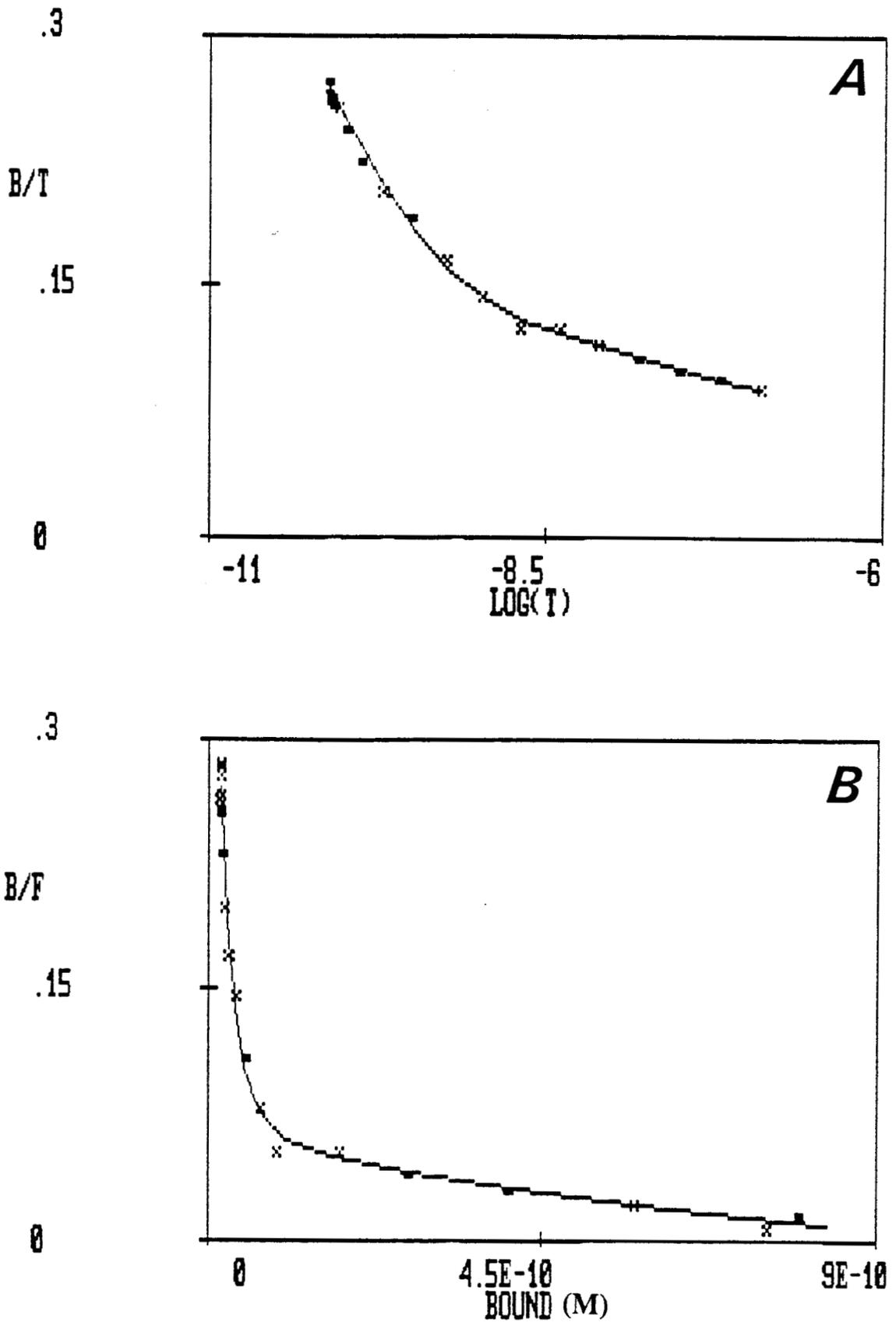


Figure 20 B : (A) Courbe de déplacement de la fixation du FGF acide radiomarqué par du FGF acide non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à E10. (B) Transformée de Scatchard.

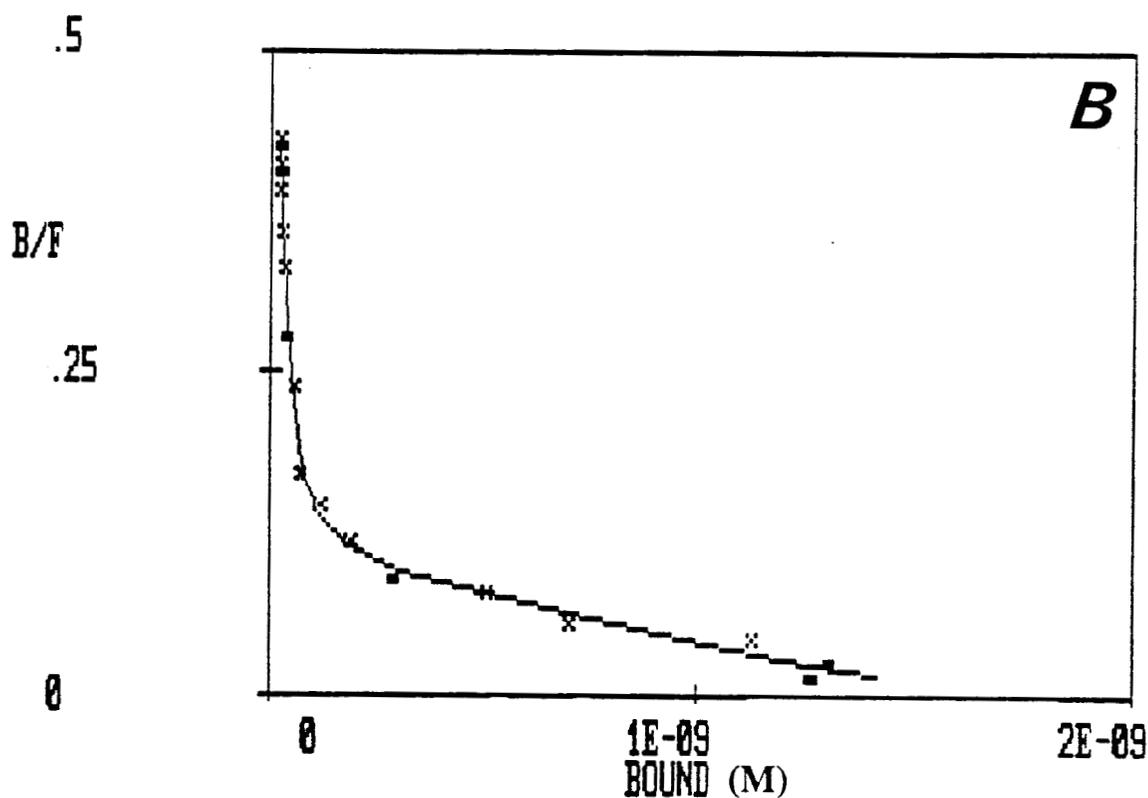
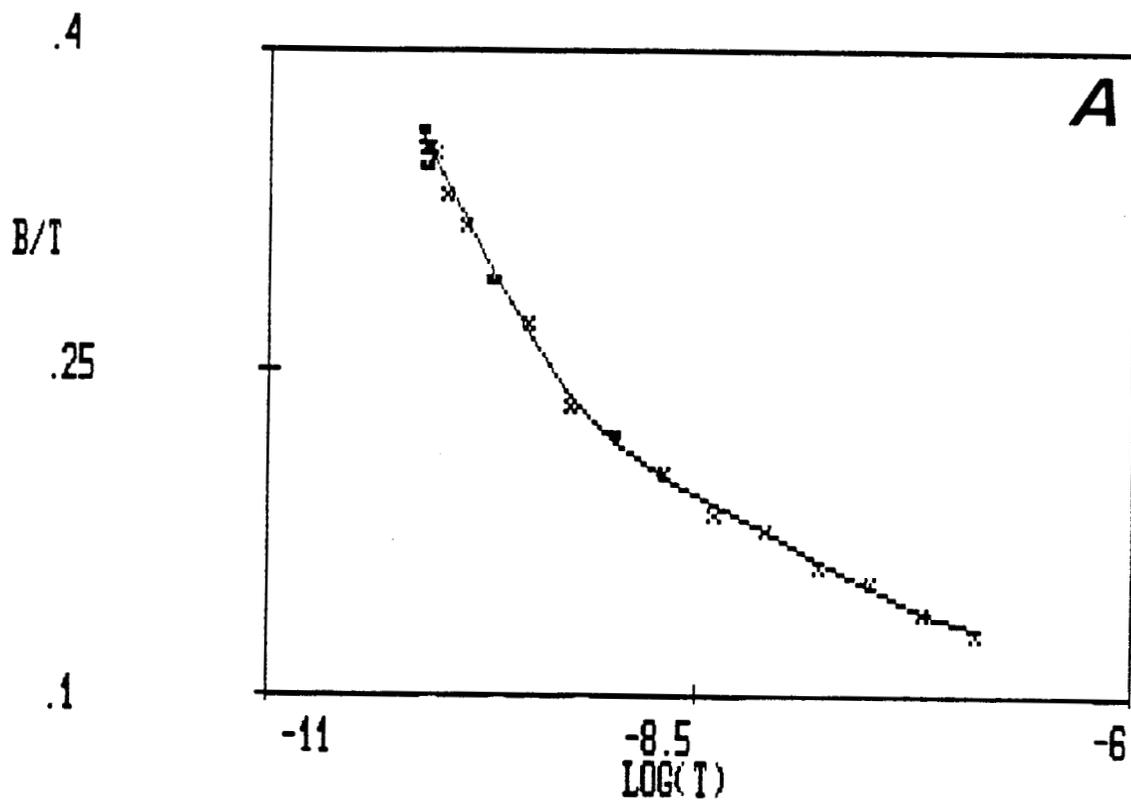


Figure 20 C : (A) Courbe de déplacement de la fixation du FGF acide radiomarqué par du FGF acide non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à E15. (B) Transformée de Scatchard.

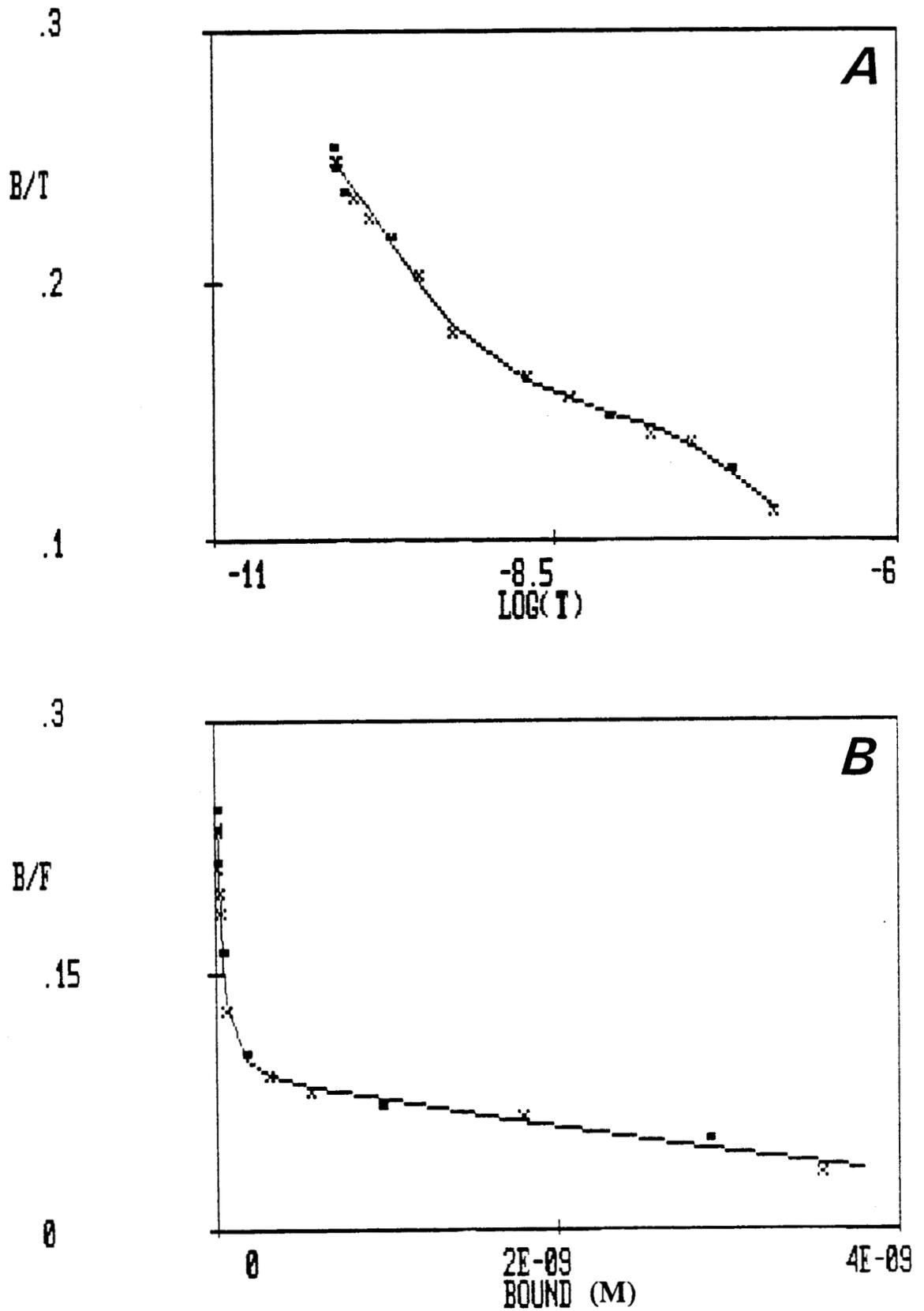


Figure 20 D : (A) Courbe de déplacement de la fixation du FGF acide radiomarqué par du FGF acide non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à P1. (B) Transformée de Scatchard.

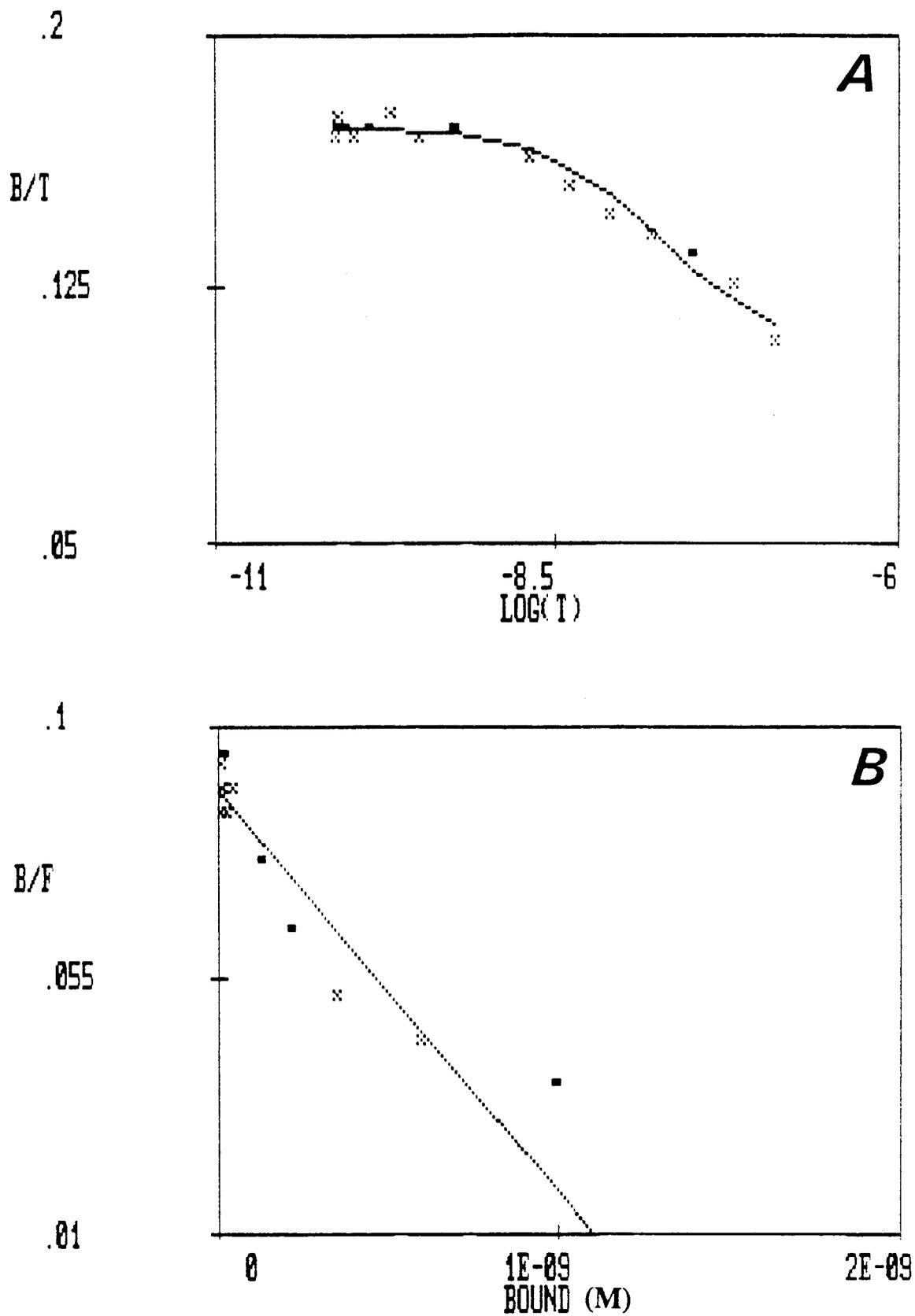


Figure 20 E : (A) Courbe de déplacement de la fixation du FGF acide radiomarqué par du FGF acide non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau de poule adulte. (B) Transformée de Scatchard.

	Sites de fixation à haute affinité Kd = 100pM pmole / mg prot.	Sites de fixation à basse affinité Kd = 20 nM pmole / mg prot.
<b>E7</b>	1 (0.2) *	15 (4)
<b>E 10</b>	0.5 (0.2)	13 (5)
<b>E 15</b>	0.5 (0.2)	25 (4)
<b>P 1</b>	0.4 (0.2)	75 (20) *
<b>Adulte</b>	non détecté	20 (7)

**Tableau 7** : Constantes de dissociation et capacités membranaires des sites de fixation du FGF acide sur les membranes de cerveau de poulet au cours du développement. Ces données sont obtenues par dosage par compétition (fig. 20) et après analyse à l'aide du programme LIGAND. Les résultats correspondent à la moyenne de 7 déterminations ; entre parenthèses l'écart type. \* significatif ( $p < 0,01$ ).

	Traitement	Kd (pM)	Sites de fixation à haute affinité capacité membranaire fmole/mg protein	Kd (nM)	Sites de fixation à basse affinité capacité membranaire pmole/mg protein
EMBRYON	Témoin	100	500	20	18
	0.6 M NaCl	95	405	ND	ND
	pH 4.0	ND	ND	10	9
	Héparinase	ND	ND	ND	ND
ADULTE	Témoin	ND	ND	7	9
	0.6 M NaCl	ND	ND	ND	ND
	pH 4.0	ND	ND	20	15
	Héparinase	ND	ND	ND	ND

**Tableau 8** : Effet de divers traitements sur les différentes catégories de sites de fixation membranaire du FGF acide. Les valeurs correspondent à la moyenne de 4 déterminations. ND : non détecté.

est détectée à tous les stades embryonnaires et au stade post-natal. La capacité membranaire de ces sites à haute affinité est maximum à E7 ( $1 \pm 0.2$  pmole / mg de protéine), diminue de moitié entre E7 et E10 ( $0.5 \pm 0.2$  pmole / mg de protéine), se maintient constante jusqu'à P1 pour ne plus être détectée chez l'adulte. Une seconde catégorie de sites de fixation possédant un  $K_d$  de 20 nM est présente à tous les stades étudiés. La capacité membranaire de ces sites à basse affinité est significativement 3 fois plus importante à P1 qu'aux autres stades étudiés.

Les résultats concernant la sensibilité des sites de fixation du FGF acide à divers traitements sont regroupés dans le tableau 8. Compte tenu du fait qu'une répartition différente des deux catégories de sites apparaît entre les stades embryonnaires et le stade adulte, il nous est apparu nécessaire d'étudier la sensibilité de la fixation du FGF à la fois sur un stade embryonnaire (E15) et sur le stade adulte. En ce qui concerne le cerveau embryonnaire, un prétraitement des membranes par l'héparinase ne permet plus la détection d'aucun site de fixation. Un lavage des membranes, après fixation du  $I^{125}$ -FGFa par une solution contenant 0,6 M NaCl, permet une élimination sélective de la fixation sur les sites à basse affinité. Par contre, un lavage bref par une solution à pH 4 élimine sélectivement la fixation sur les sites à haute affinité. En ce qui concerne le cerveau adulte (tableau 8), un prétraitement des membranes par l'héparinase ou un lavage par une solution contenant 0,6 NaCl élimine complètement la fixation du  $I^{125}$ -aFGF contrairement à un lavage à pH 4 qui est sans effet.

- FGF basique : Les courbes de déplacement de la fixation du FGF basique radiomarqué par son homologue non marqué et les représentations de Scatchard obtenues (Fig. 21), permettent de détecter pour chacun des stades embryonnaires étudiés une seule catégorie de sites de fixation possédant un  $K_d$  de 10 nM (sites à basse affinité). Chez l'adulte, une seconde catégorie de sites de fixation possède un  $K_d$  de 5 pM (sites à haute affinité). La capacité des sites à basse affinité apparaît relativement constante entre E7 et P1 ( $95 \pm 20$  pmole / mg de protéine) mais est

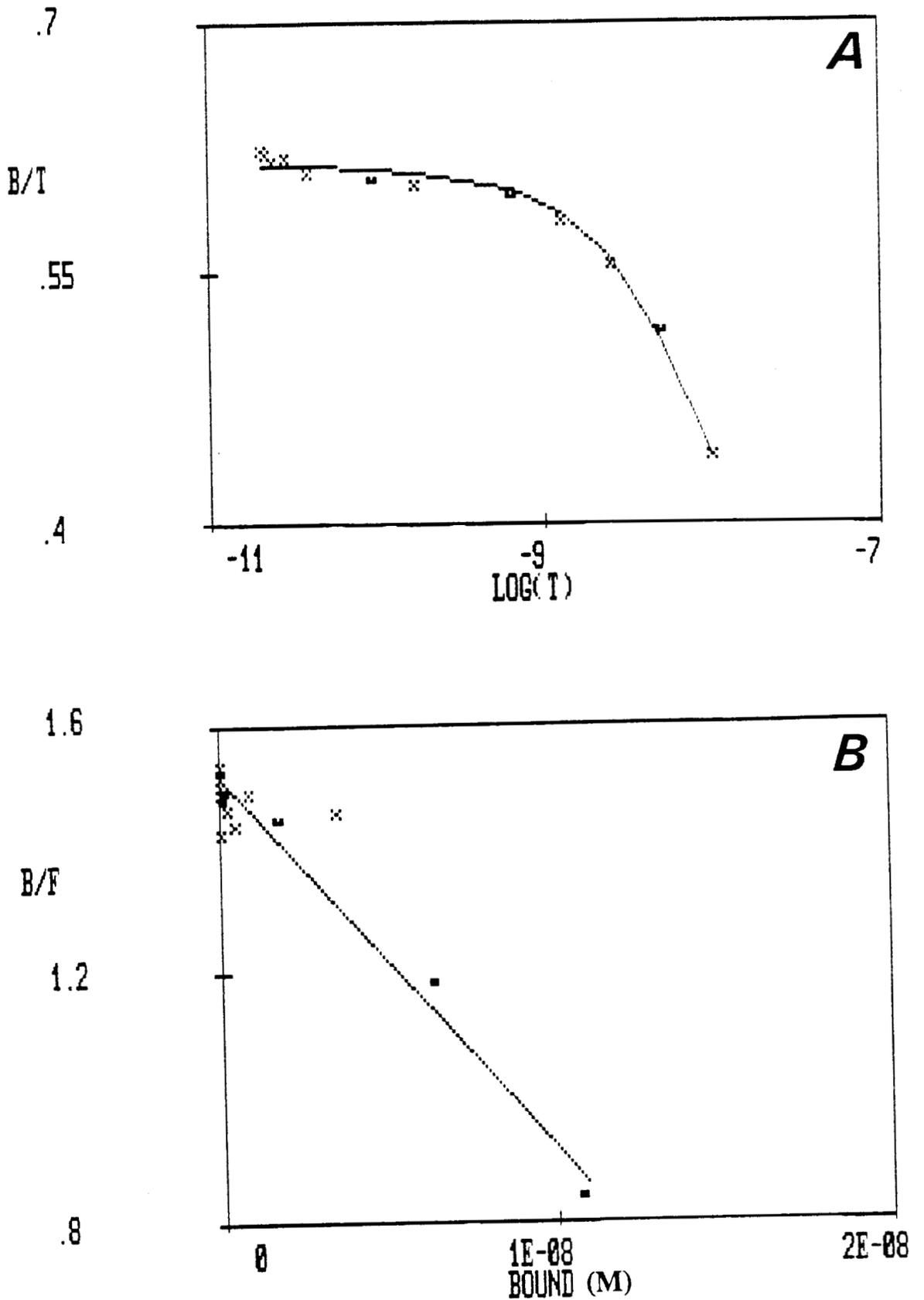


Figure 21 A : (A) Courbe de déplacement de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb par du FGFb non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à E7.  
 (B) Transformée de Scatchard.

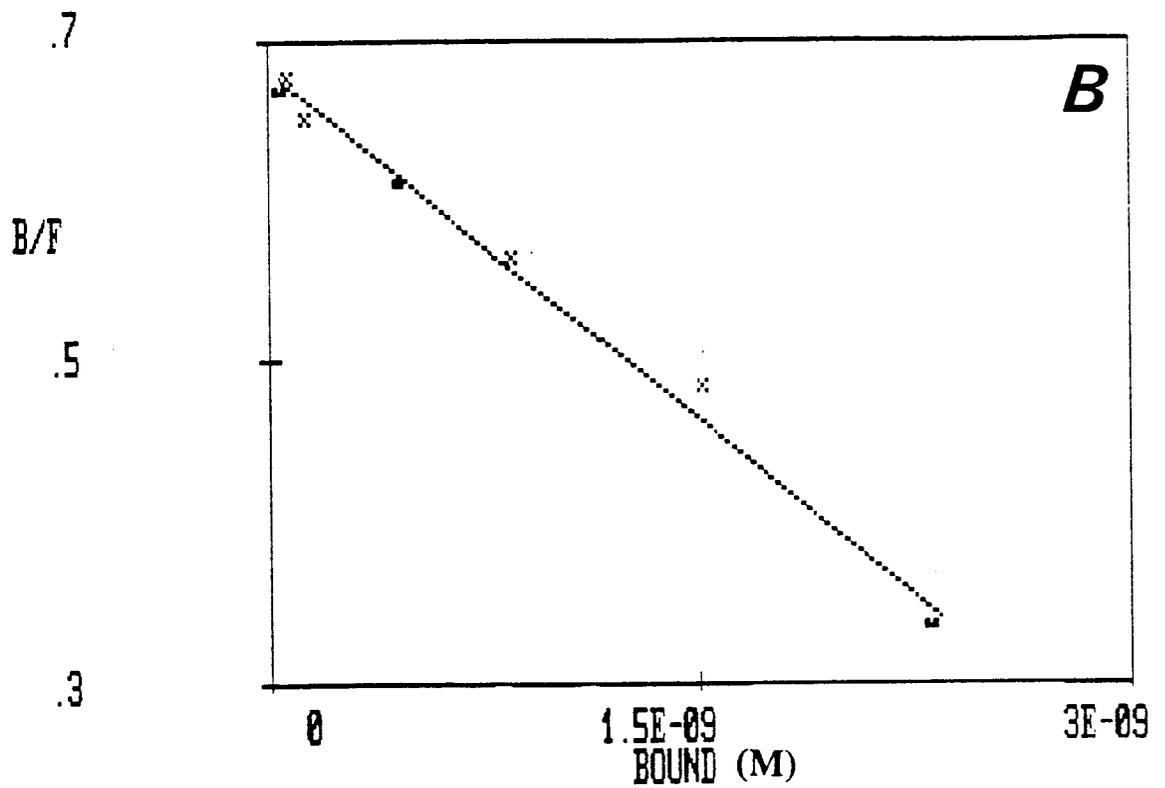
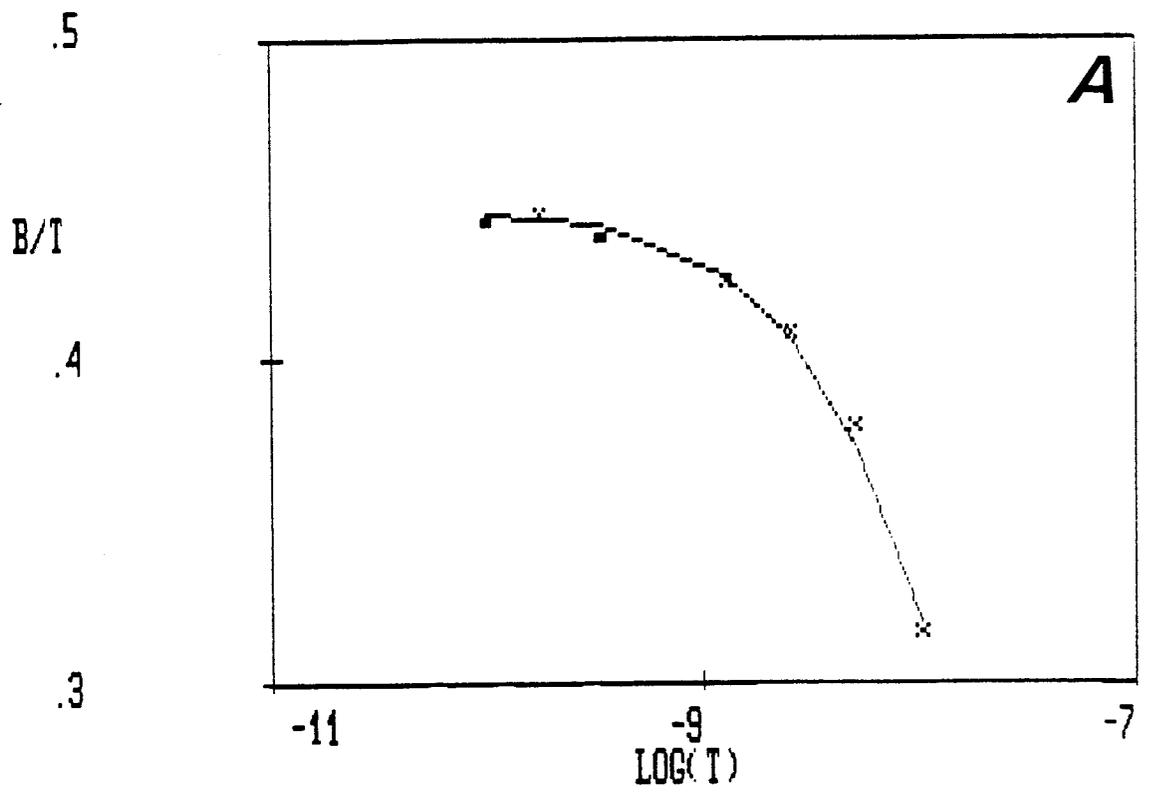


Figure 21 B : (A) Courbe de déplacement de la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGFb par du FGFb non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à E10. (B) Transformée de Scatchard.

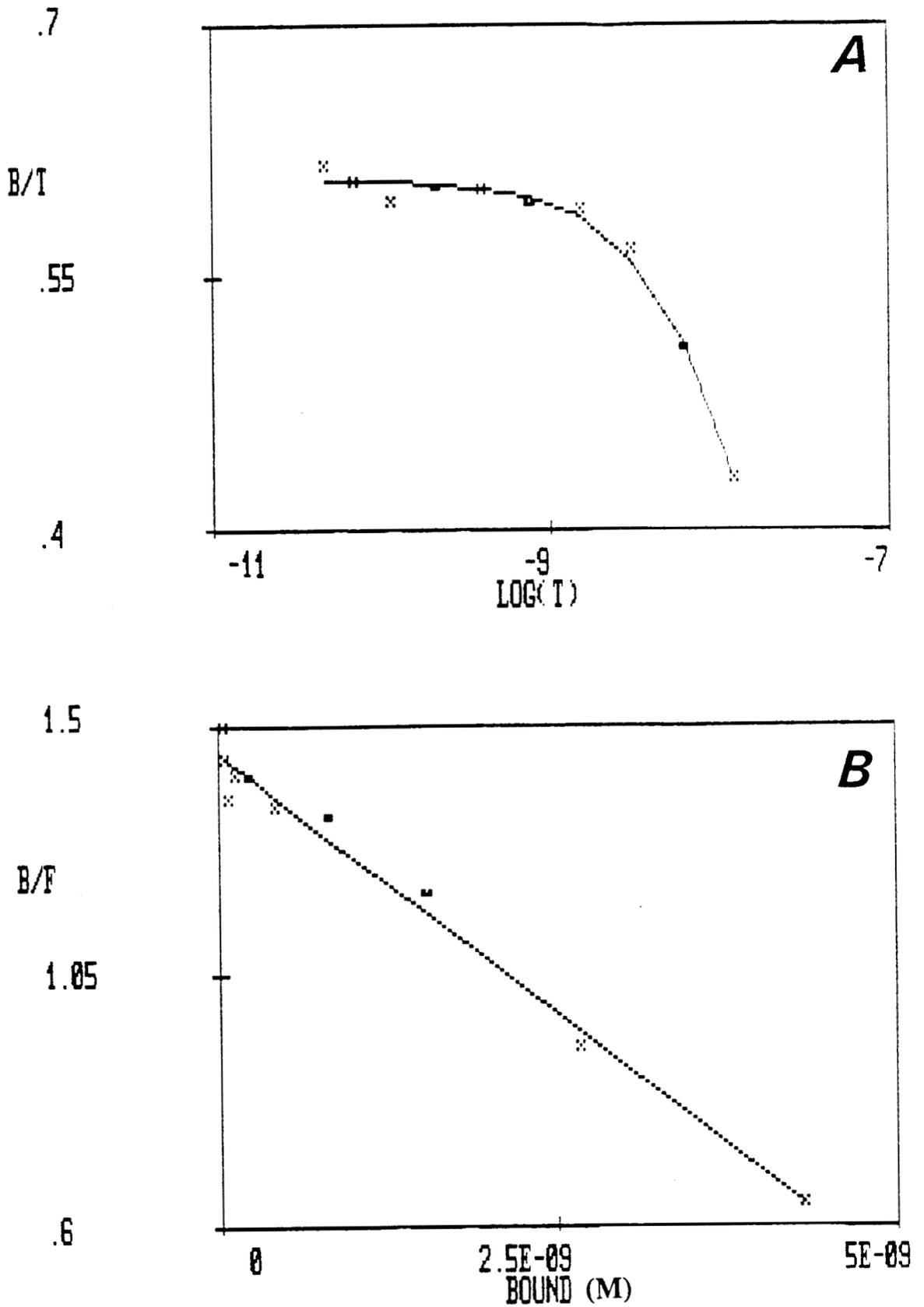


Figure 21 C : (A) Courbe de déplacement de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb par du FGFb non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à E15. (B) Transformée de Scatchard.

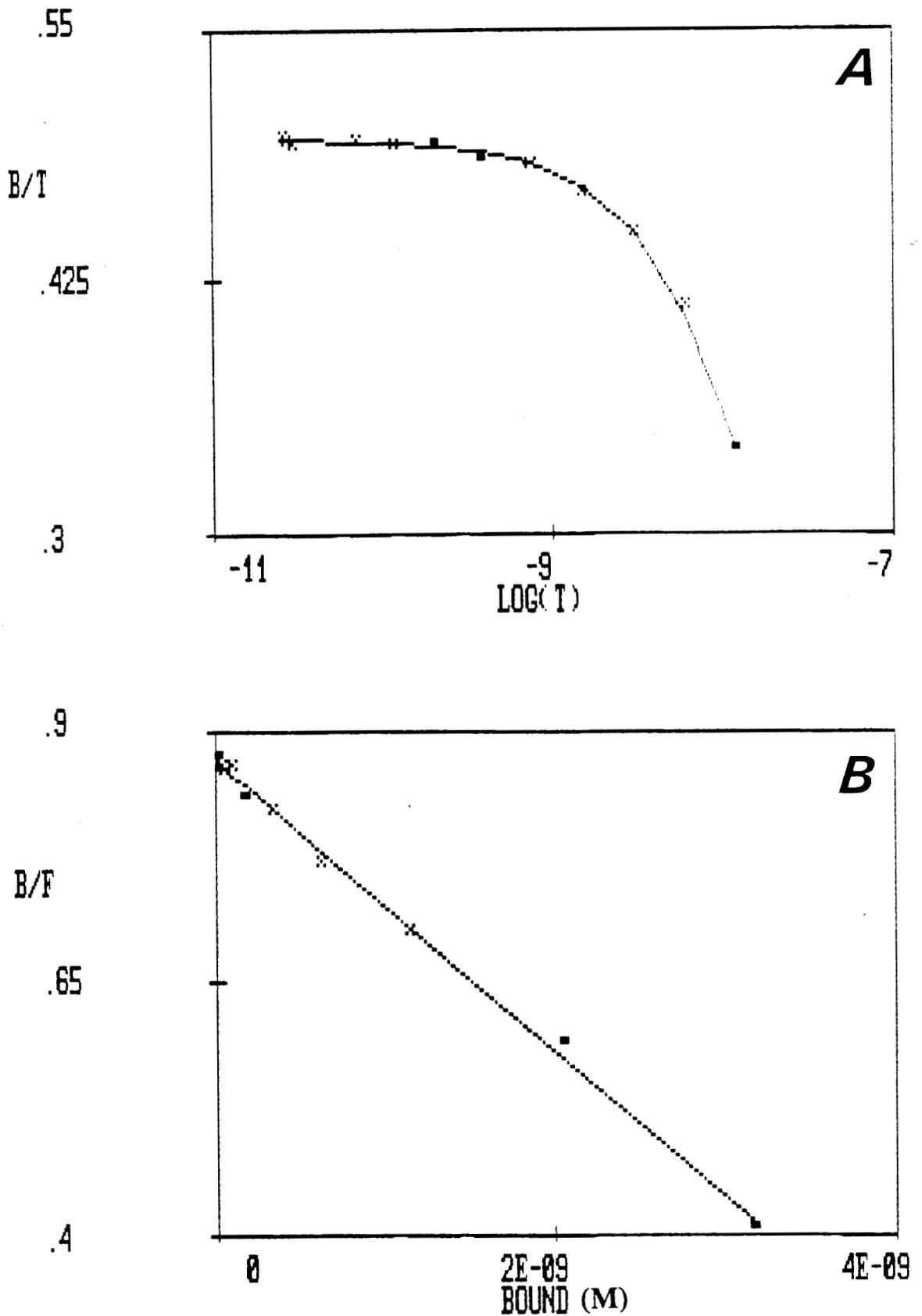


Figure 21 D : (A) Courbe de déplacement de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb par du FGFb non radiomarqué au niveau de membranes de cerveau à P1.  
 (B) Transformée de Scatchard.



	Sites de fixation à haute affinité Kd = 5pM pmole / mg prot.	Sites de fixation à basse affinité Kd = 10 nM pmole / mg prot.
<b>E7</b>	non détecté	60 (12)
<b>E 10</b>	non détecté	98 (31)
<b>E 15</b>	non détecté	108 (15)
<b>P1</b>	non détecté	99 (22)
<b>Adulte</b>	0.1 (0.03)	48 (7)

**Tableau 9** : Constantes de dissociation et capacités membranaires des sites de fixation du FGF basique sur les membranes de cerveau de poulet au cours du développement. Ces données sont obtenues à partir des dosages par compétition (fig. 20) et après analyse à l'aide du programme LIGAND. Les valeurs correspondent à la moyenne de 6 déterminations ; entre parenthèses l'écart type.

	Traitement	Kd (pM)	Sites de fixation à haute affinité capacité membranaire fmole/mg protein	Kd (nM)	Sites de fixation à basse affinité capacité membranaire pmole/mg protein
EMBRYON	Témoin	ND	ND	9	100
	0.6 M NaCl	3	26	8	5
	pH 4.0	ND	ND	5	110
	Héparinase	ND	ND	6	8
ADULTE	Témoin	5	96	3	48
	0.6 M NaCl	5	250	2	7
	pH 4.0	ND	ND	6	55
	Héparinase	ND	ND	2	6

**Tableau 10** : Effet de divers traitements sur les différentes catégories de sites de fixation du FGF basique sur les membranes de cerveau de poulet à E15 et chez l'adulte. Les valeurs correspondent à la moyenne de 4 déterminations. ND : non détecté.

plus faible chez l'adulte ( $48 \pm 15$  pmole / mg de protéine) (tableau 9).

Comme dans le cas du FGF acide, la sensibilité de la fixation du FGF basique à divers traitements a été étudiée sur un stade embryonnaire (E15) et chez l'adulte (tableau 10). Un prétraitement des membranes embryonnaires et adultes par l'héparinase diminue considérablement le nombre de sites à basse affinité. Un lavage après fixation du  $I^{125}$ -FGFb par une solution à pH 4 ne modifie pas la capacité des sites à basse affinité mais élimine complètement la fixation sur les sites à haute affinité. Un lavage en présence de 0,6 M NaCl diminue considérablement la fixation au niveau des sites à basse affinité, mais permet une détection de sites à haute affinité chez l'embryon. Ces sites possèdent un  $K_d$  de 3pM comparable à celui obtenu chez l'adulte.

#### 5 - Analyse de la fixation par saturation.

Les résultats du dosage radiorécepteur par compétition permettent de détecter des sites à haute affinité pour le FGF basique dans le cerveau adulte de façon standard et dans le cerveau embryonnaire, seulement après élimination de la fixation au niveau des sites à basse affinité. Cependant, les valeurs de  $K_d$  obtenues (environ 5 pM) ne correspondent pas à la zone d'étude optimale définie par nos conditions expérimentales ( $K_d$  compris entre 23 pM et 46 nM) et résultent en fait d'une extrapolation réalisée par le programme LIGAND. Afin de nous placer dans les conditions expérimentales optimales avec le FGF basique, nous avons réalisé une analyse de la fixation par saturation. Cette analyse porte sur un stade embryonnaire (E15) et sur le cerveau adulte.

Les courbes de saturation de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb au niveau des membranes de cerveau embryonnaire (Fig.22) et adulte (Fig.23) montrent qu'une saturation complète de la capacité membranaire par le  $I^{125}$ -FGFb n'a pas été obtenue avec les doses de ce facteur radiomarqué que nous avons utilisé (2 pM - 200 pM). Les représentations de Scatchard obtenues, permettent de définir les caractéristiques des sites de fixations du FGFb. Il a pu être détecté une seule

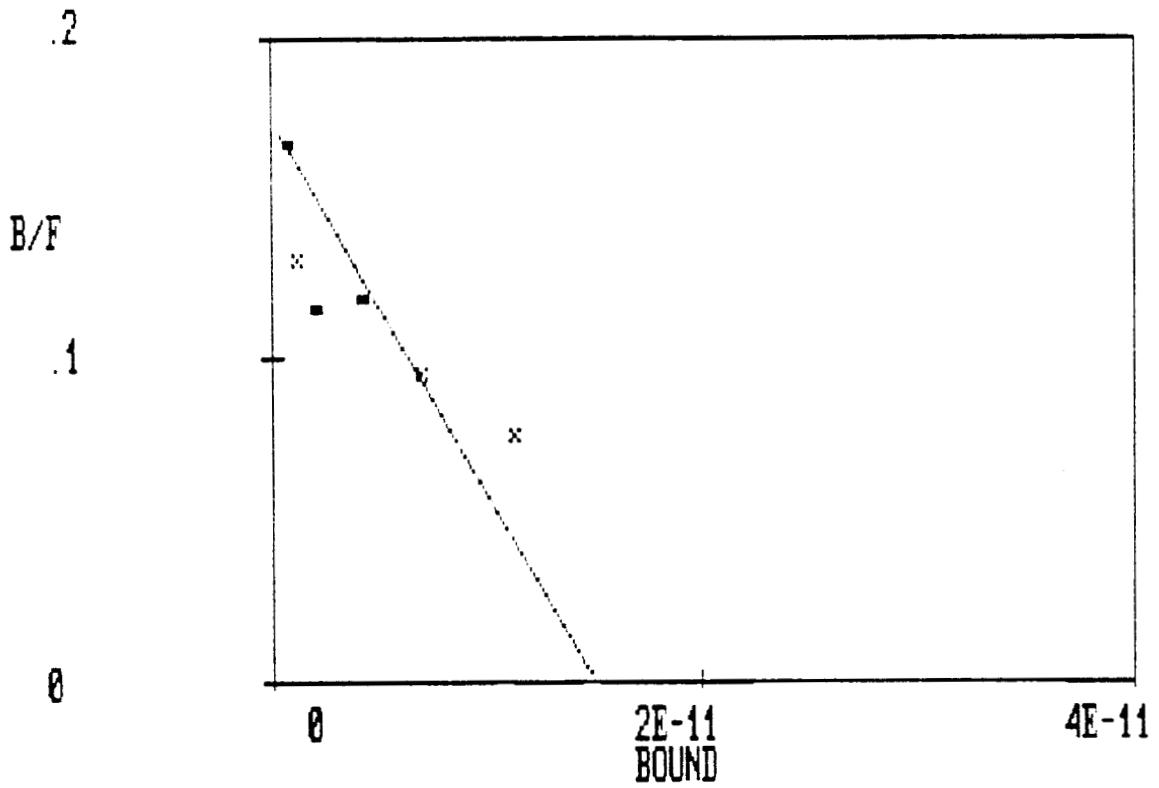
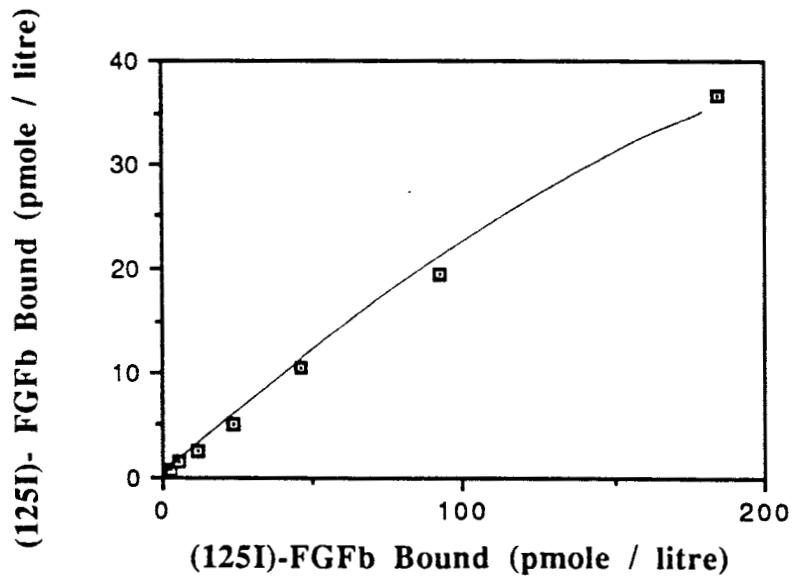


Figure 22 : (A) Courbe de saturation des membranes de cerveau embryonnaire (E15) par des doses croissantes de  $I^{125}$ - FGFb.  
 (B) Transformée de Scatchard.

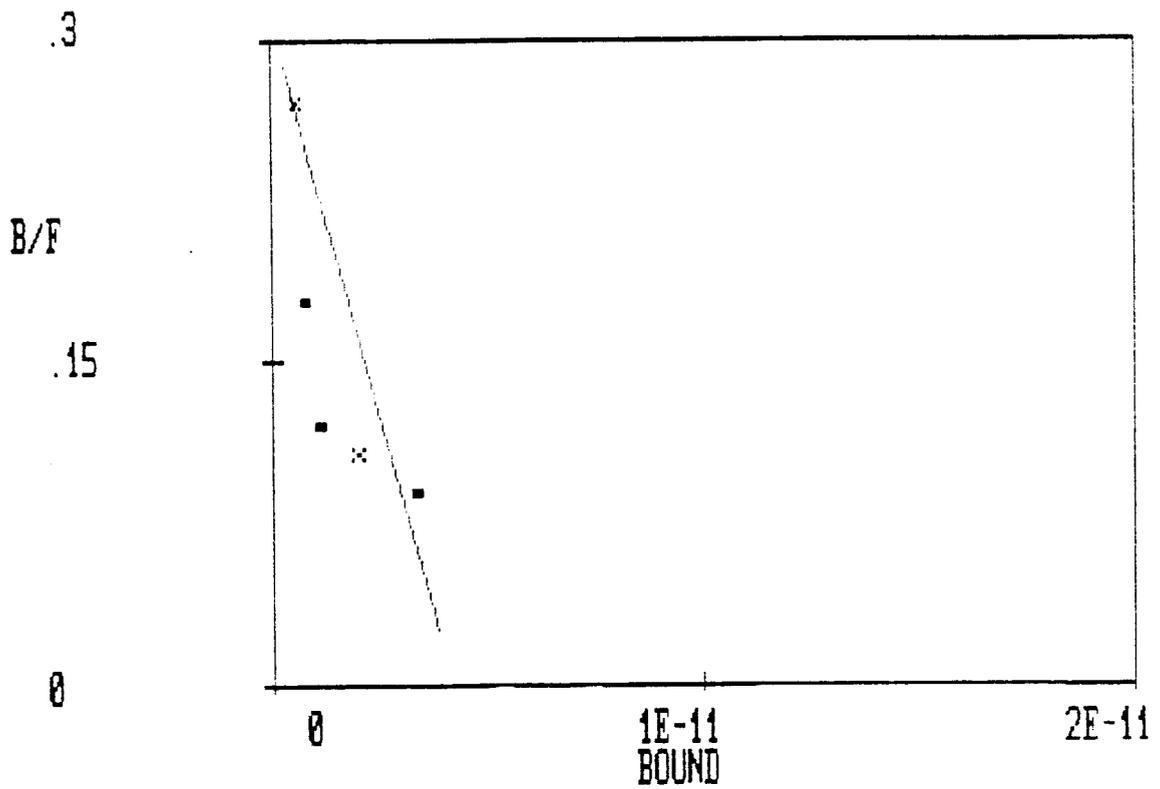
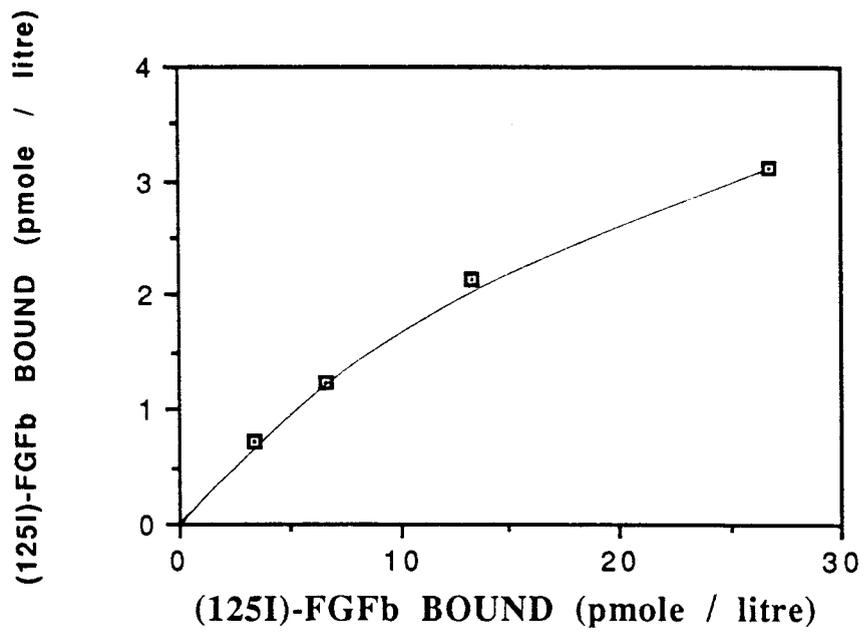


Figure 23 : (A) Courbe de saturation des membranes de cerveau de poule adulte par des doses croissantes de  $I^{125}$ -FGFb.  
 (B) Transformée de Scatchard

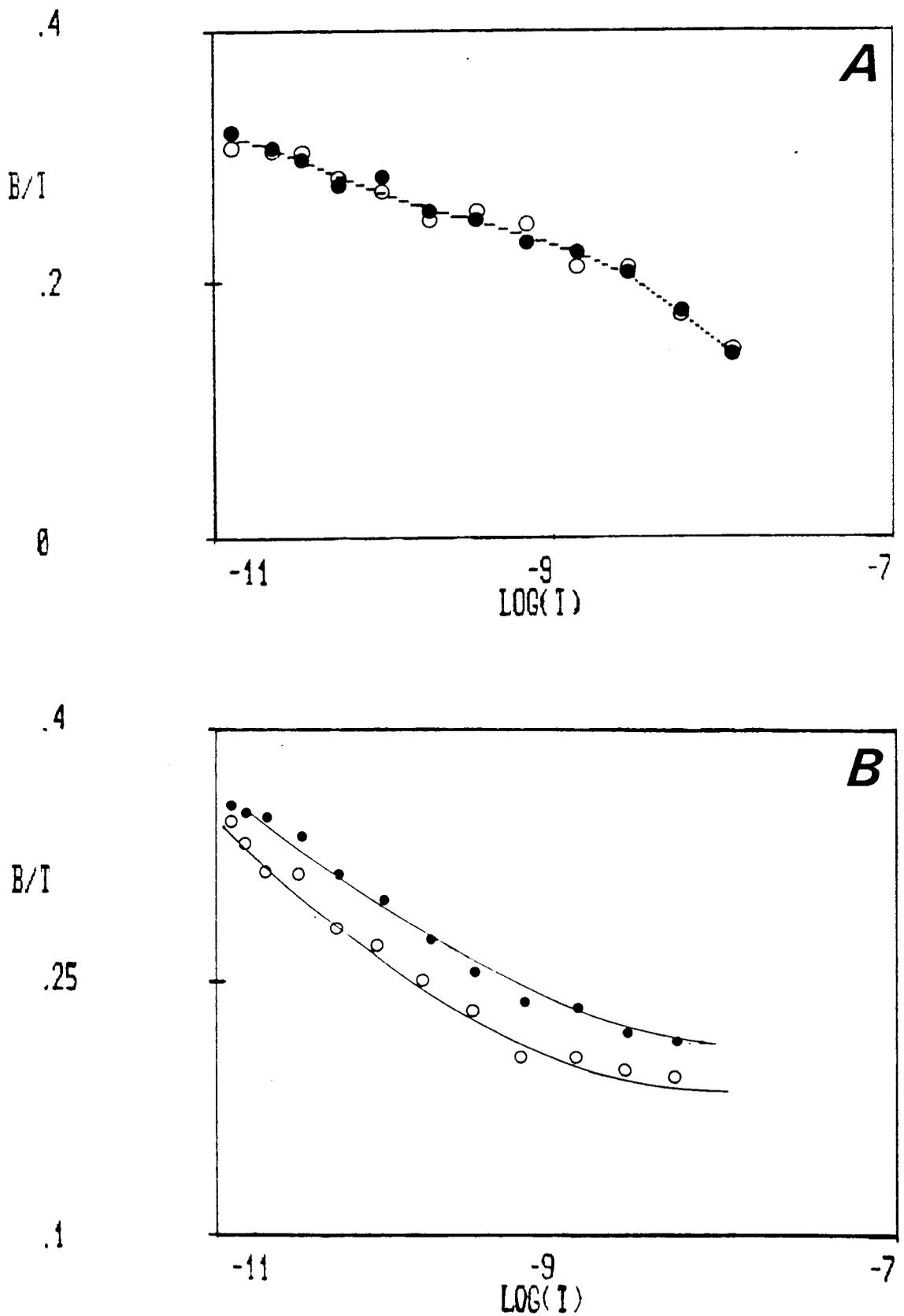
catégorie de sites de fixation possédant 1) un  $K_d$  de  $40 \pm 15$  pM 2) une capacité membranaire de 0,15 pmole / mg de protéine chez l'embryon et de 0,5 pmole / mg de protéine chez l'adulte.

#### 6- Compétitions croisées entre FGF acide et FGF basique.

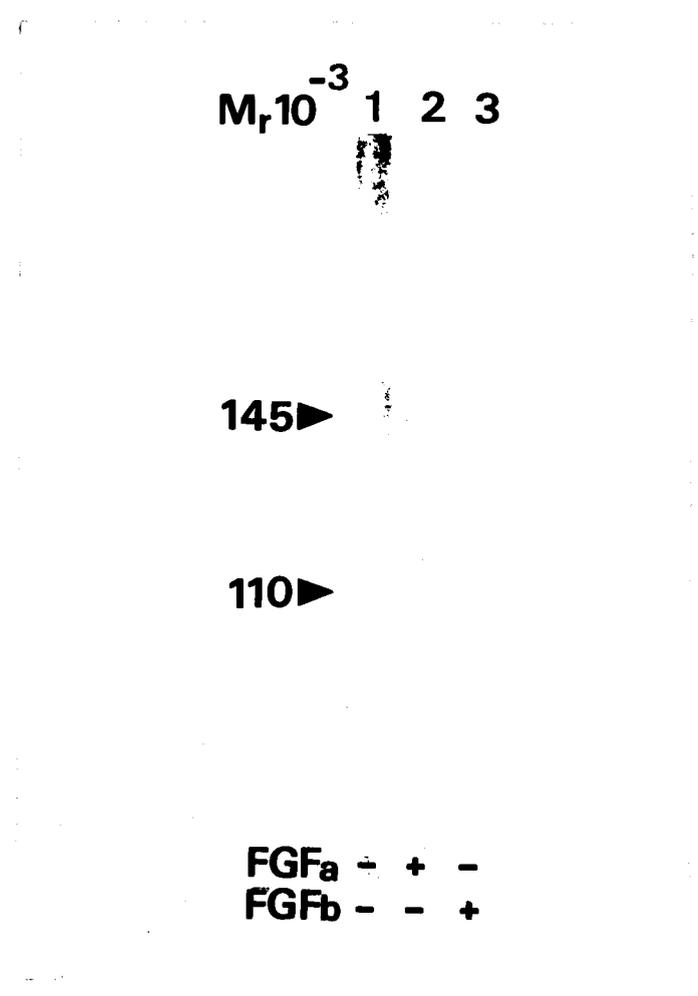
Les courbes de déplacement croisé (fig.24) indiquent que la fixation du  $I^{125}$ -FGFa au niveau des membranes de cerveau embryonnaire (E15) est déplacée de manière équivalente par du FGFa ou b froid (fig.24A). Par contre, le déplacement de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb nécessite une concentration plus importante en FGFa froid qu'en FGFb froid (fig.24B)

#### **B) Expériences de pontage moléculaire.**

- FGF acide : Les résultats des expériences de pontage moléculaire réalisées avec le  $I^{125}$ -FGF acide (Fig.25A) et le  $I^{125}$ -FGF basique (Fig.25B) indiquent la présence pour chacune des formes de FGF de deux formes putatives de récepteurs de poids moléculaire 145 et 110 kDa, ce qui correspond après soustraction du poids moléculaire des FGFs à deux formes de 130 et 95 kDa. La fixation de chacun des FGFs (acide ou basique) au niveau de ces éléments est déplacée de façon équivalente par l'autre forme. L'intensité du marquage obtenu au niveau de ces deux éléments diminue au cours du développement, comme le rapporte l'analyse densitométrique d'un radioautogramme obtenu avec le  $I^{125}$ -FGF acide (Fig.26).



**Figure 24** : Courbes de déplacement :  
 - de la fixation du  $I^{125}$ -FGFa par des doses croissantes de FGFa (●) et de FGFb (○) (A).  
 - de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb par des doses croissantes de FGFa (●) et de FGFb (○)(B).  
 sur les membranes de cerveau embryonnaire (E15).



**Figure 25 A** : Autoradiogramme obtenu après pontage covalent du  $I^{125}$ -FGFa sur les membranes de cerveau (E15) et électrophorèse PAGE-SDS.

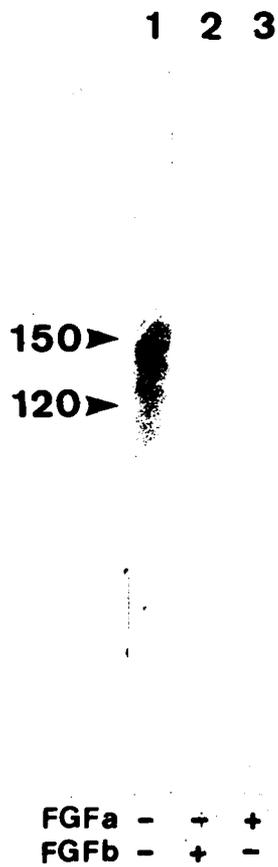


Figure 25 B : Autoradiogramme obtenu après pontage covalent du I<sup>125</sup>-FGFb sur les membranes de cerveau (E15) et électrophorèse PAGE-SDS.

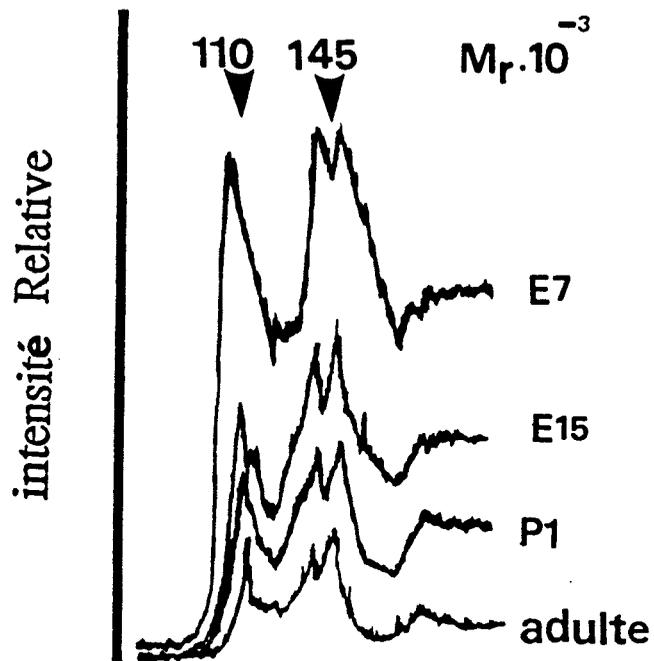


Figure 26 : Analyses densitométriques d'autoradiogrammes obtenus après pontage covalent entre I<sup>125</sup>-FGFa et membranes de cerveaux à différents stades du développement.

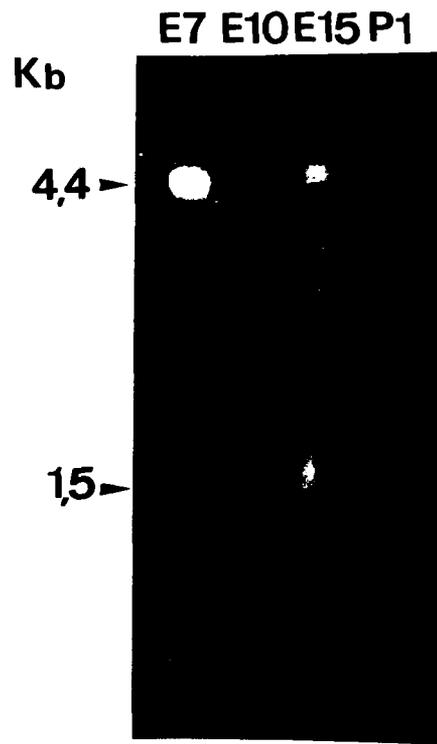


Figure 27 A : Autoradiogramme obtenu après hybridation de la sonde ADNc BEK, marquée au  $P^{32}$ , sur Northern blot réalisé à partir d'ARN m de cerveau à E7, E10, E15 et P1.

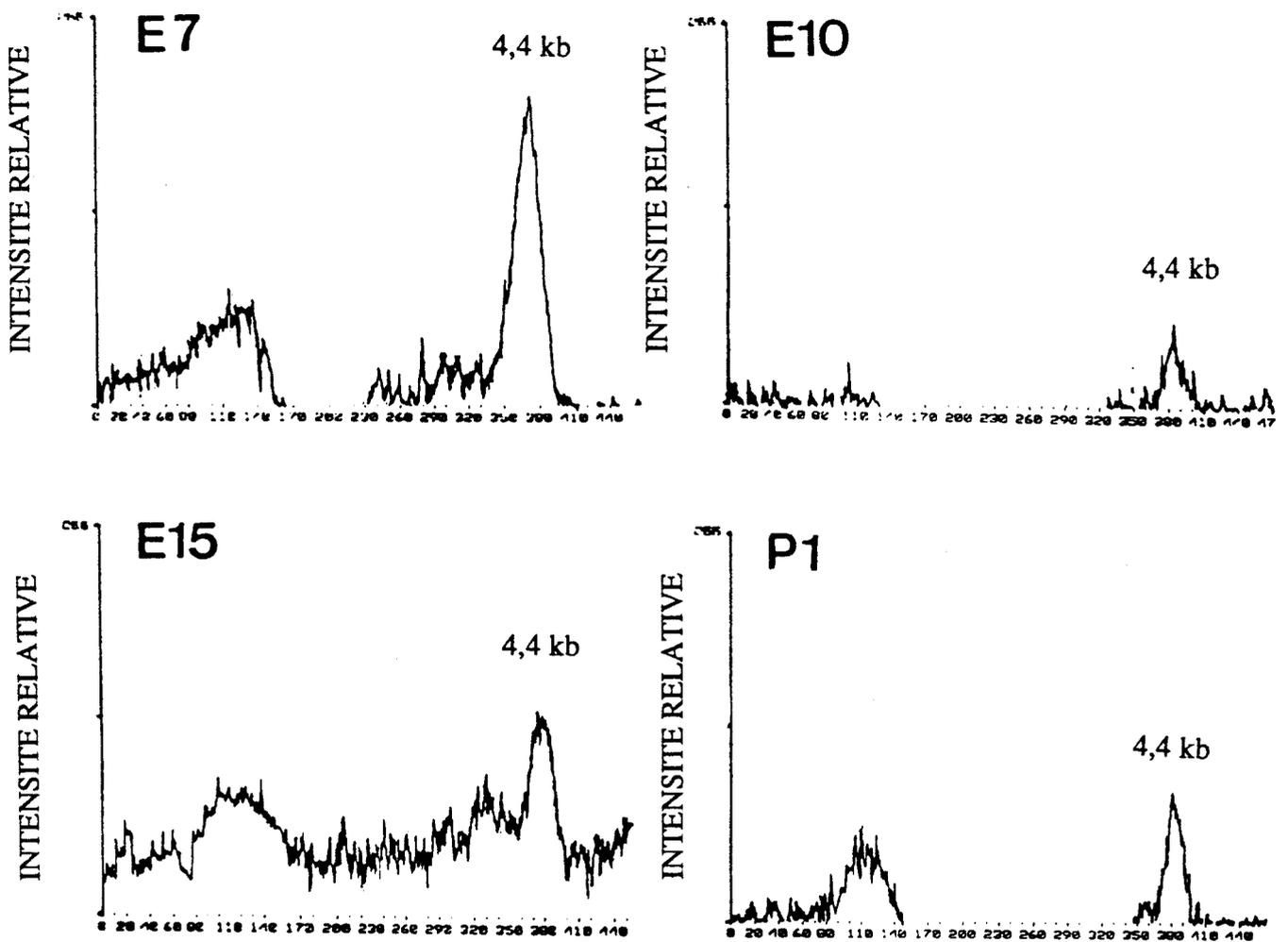


Figure 27 B : Analyse densitométrique de l'autoradiogramme présenté dans la figure 27 A.

### C) Expression d'ARNm correspondant au gène BEK.

L'autoradiogramme obtenu après hybridation de la sonde ADNc BEK radiomarquée sur un Northern blot réalisé à partir d'ARNm de cerveau de différents stades (Fig.27A) indique la présence de deux transcrits de 4,4 et 1,5 Kb qui sont présents à tous les stades étudiés. L'intensité du marquage de ces transcrits est plus forte à E7 qu'aux autres stades du développement. L'analyse densitométrique du radioautogramme (Fig.27B) confirme un niveau d'expression environ 4 fois plus élevé de BEK à E7 par rapport aux autres stades.

## IV - DISCUSSION

Nous avons étudié l'expression de sites récepteurs pour les FGFs acide et basique dans le cerveau au cours du développement. Cette étude a été menée par dosage radiorécepteur et par pontage moléculaire au niveau de préparations membranaires de cerveau ainsi que par mesure de l'expression d'ARN messagers correspondant à un récepteur putatif des FGFs. Nous discuterons successivement chacun de ces points

### Dosage radiorécepteur.

Nous discuterons d'abord de la fixation globale des FGFs sur les préparations membranaires de cerveau, puis des différentes catégories de sites de fixation spécifiques.

Afin d'optimiser nos conditions expérimentales, nous avons étudié l'effet de la concentration membranaire sur la fixation des  $I^{125}$ -FGFa ou b ainsi que la cinétique de cette fixation.

### *Effet de la concentration membranaire*

En ce qui concerne l'effet de la concentration membranaire, des résultats semblables ont été obtenus avec les deux formes (acide et basique) de FGF. La fixation totale des  $I^{125}$ -FGFs augmente en fonction de la concentration membranaire (de 0 à 50  $\mu\text{g}$  d'équivalent protéine). Cette fixation totale est composée d'une fixation spécifique (déplacée par un excès de 1000 fois en FGFs froids) et d'une fixation non spécifique (non déplacée par un excès de FGFs froids). La fixation non spécifique augmente linéairement avec la concentration membranaire, par contre la fixation spécifique est maximum pour 30  $\mu\text{g}$  (équivalent protéine) de membranes, puis décroît si la concentration membranaire augmente. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur diverses préparations membranaires. En effet, sur les membranes de cerveau de boeuf (Courty et al., 1988), de placenta (Hondermarck et al., 1990) et de cellules de cancer du sein (Peyrat et al., en préparation), respectivement 60, 45 et 100  $\mu\text{g}$  de membranes permettent une fixation spécifique maximum, pour une concentration en  $I^{125}$ -FGFb de 23 pM. Sur les membranes d'embryon de poulet, Olwin et Hauschka, (1990) montrent qu' en présence de 200 pM de  $I^{125}$ -FGFa, la fixation spécifique n'apparaît pas avoir atteint un niveau de saturation pour 100  $\mu\text{g}$  de membranes, cependant ces auteurs n'ont pas utilisé de concentration membranaire plus importante. Le fait que la fixation spécifique des  $I^{125}$ -FGFs diminue pour des concentrations membranaires très élevées a déjà été rapporté pour les membranes de placenta (Hondermarck et al., 1990) et de cellules tumorales (Peyrat et al., 1990). Ce phénomène a souvent été relaté dans le cas d'autres préparations membranaires et avec d'autres radioligands ; il est attribué à l'existence d'une concentration membranaire critique au-delà de laquelle les caractéristiques de l'interaction ligand-récepteur sont perturbées.

### *Cinétique de fixation*

L'étude cinétique de la fixation des  $I^{125}$ -FGF a ou b (concentration de 23 pM) sur les membranes (concentration de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) donne des résultats comparables

avec les deux formes de facteur. L'état d'équilibre est atteint après 30 mn. d'incubation et se maintient ensuite jusque 120 mn. (temps d'incubation maximum étudié). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les mêmes conditions de température sur des membranes de segment externe des batonnets de la rétine (Mascarelli et al., 1989), de cerveau de boeuf (Courty et al., 1988), de placenta (Hondermarck et al., 1990) et de cellules tumorales (Peyrat et al., en préparation). La vitesse d'association du FGF est plus grande sur des préparations membranaires que sur des cellules intactes où l'état d'équilibre est atteint entre 1 et 4 heure à 4°C (Walicke et al., 1989 ; Mansson et al., 1989 ; Neufeld et al., 1985 ; Kan et al., 1988 ; Moenner et al., 1986 ; Olwin and Hauschka, 1986).

En ce qui concerne la cinétique de dissociation, nos résultats indiquent que la fixation des  $I^{125}$ -FGFs sur les membranes est réversible, puisqu'elle est déplacée par un excès de FGFs non marqués. Une dissociation complète est atteinte en 15 mn. après l'addition du ligand non marqué. Cette cinétique de dissociation est comparable à celles rapportées sur des préparations membranaires de cerveau de boeuf (30 mn.) (Courty et al., 1988), de placenta (30 mn.) (Hondermarck et al., 1990), de cellules tumorales (15 mn.) (Peyrat et al., en préparation). La vitesse de dissociation du FGF est plus grande sur des préparations membranaires que sur des cultures cellulaires où une dissociation complète à 4°C est constatée entre 50 mn. et 3 h après addition du ligand froid (Moenner et al., 1986 ; Mansson et al., 1989). Il n'y a pas eut d'étude spécifique portant sur les cinétiques d'association et de dissociation des FGFs entre préparations membranaires et cellules intactes. Cependant, sachant que :

1) les vitesses d'association ( $v_a$ ) et de dissociation ( $v_d$ ) d'un ligand (L) sur des récepteurs (R) peuvent être définies par les équations :

$$v_a = k + 1 (L) (R)$$

$$v_d = k - 1 (RL)$$

$$2) \text{ la constante d'association } K_a = \frac{k + 1}{k - 1} ;$$

Une différence de cinétique d'association implique une différence d'affinité entre cellules intacts et membranes pour le ligand FGF. Cette hypothèse est confortée par le fait que des préparations membranaires de BHK 21 ont un  $K_a$  de  $3 \cdot 10^{-3} \text{ pM}^{-1}$  alors que les cellules BHK 21 intactes ont un  $K_a$  de  $4,7 \cdot 10^{-2} \text{ pM}^{-1}$  (Neufeld and Gospodarowicz, 1985). Ainsi, l'extraction des membranes modifie l'affinité des sites de fixation pour les FGFs.

#### *Fixation non spécifique*

Dans le cas du FGF acide, la fixation non spécifique représente 30% (embryon) à 60% (adulte) de la fixation totale. Dans le cas du FGF basique, la fixation non spécifique représente 70% (embryon) à 80% (adulte) de la fixation totale. Un haut niveau de fixation non spécifique a déjà été relaté dans le cas des FGFs (Olwin et Hauschka, 1986 ; Neufeld et Gospodarowicz, 1985 ; Mansson et al., 1989 ; Olwin et Hauschka, 1990a) et est probablement en rapport avec la grande hydrophobie des FGFs qui leur permet de se fixer avec une faible affinité sur les surfaces hydrophobes et en particulier sur les membranes cellulaires. L'hypothèse de la présence de formes de FGFs dégradées, se fixant spécifiquement, dans nos préparations peut être écartée puisque la pureté et l'activité des FGFs avant et après iodination ont été contrôlées.

Le fait que le niveau de fixation non spécifique soit plus important pour le FGF basique que pour le FGF acide a déjà été rapporté pour les membranes d'embryon entier de poulet (Olwin et Hauschka, 1990a). Cette différence pourrait encore s'expliquer par la différence d'hydrophobie entre les deux formes de FGF (élution différente en chromatographie C4), ou/et par l'existence, en quantité importante, de sites de fixation à très basse affinité pour le FGF basique au niveau des surfaces membranaires. Cependant, l'utilisation de mêmes lots de FGFs permet de détecter une fixation non spécifique plus importante au niveau du cerveau adulte qu'au niveau du cerveau embryonnaire. Ces résultats suggèrent que

la fixation non spécifique des FGFs est due à la présence au niveau des membranes cellulaires de structures présentant une très faible affinité pour les FGFs. Cette interprétation est étayée par le fait qu'après fixation des  $I^{125}$ -FGFs, un lavage des membranes par une solution 0,6 M NaCl élimine 75% de la radioactivité fixée.

### *Fixation spécifique*

En ce qui concerne la fixation spécifique des  $I^{125}$ -FGFs au niveau des membranes, elle représente 70% (embryon) et 40% (adulte) de la fixation totale du FGF acide et 30% (embryon) et 18% (adulte) de la fixation totale du FGF basique. De plus, dans le cas du FGF acide comme dans celui du FGF basique, la capacité des membranes à fixer ces facteurs est sensible à un traitement par l'héparinase. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus avec des préparations de membranes de cerveau de boeuf sur lesquelles un traitement par l'héparinase, réalisé dans des conditions expérimentales identiques aux nôtres, prévient la fixation du  $I^{125}$ -FGFb (Dauchel et al., 1989). Dans notre expérimentation, la spécificité de l'action de l'héparinase étant contrôlée par rapport à un témoin chondroïtinase, nos résultats suggèrent qu'une grande partie de la fixation des FGFs au niveau des membranes fait intervenir des structures "heparin-like". Une implication de structures "heparin-like" dans la fixation des FGFs au niveau des cellules BHK a déjà été établie par Moscatelli (1987a). Cet auteur rapporte également que la fixation des FGFs au niveau des structures "heparin-like" peut être éliminée après lavage avec une solution contenant 2M NaCl. Dans notre cas, un lavage des membranes par le NaCl 2M élimine 85% de la fixation des  $I^{125}$ -FGFs. Cependant, les résultats relatés par Moscatelli concernent l'ensemble de la culture cellulaire, comprenant à la fois les cellules BHK, mais aussi les matrices extra-cellulaires produites par celles-ci. Or, on sait que les matrices extra-cellulaires possèdent des structures "heparin-like" capables de fixer les FGFs, et que cette fixation est sensible à un lavage en présence d'une concentration élevée en NaCl (Bashkin et al. 1989).

Notre étude montre donc la présence de structures "heparin-like" aptes à fixer les FGFs spécialement au niveau des membranes cellulaires. Un traitement des membranes préalablement préincubées avec du  $I^{125}$ -FGFb, par une solution à pH 4 élimine environ 20% de la fixation spécifique de ces facteurs de croissance. Moscatelli (1987a) a déjà rapporté qu'une partie de la fixation des FGFs aux cellules BHK est sensible à des variations de pH et attribue cette fixation acido-sensible à des sites récepteurs de haute affinité présents au niveau de la surface des membranes.

Dans le cas du FGF acide comme dans celui du basique, la fixation spécifique est significativement plus élevée à E7 qu'à E10, E15, P1 et diminue encore jusqu'à l'état adulte. Bien qu'il ait été montré *in vitro*, que la fixation spécifique des FGFs sur des lignées de cellules fibroblastiques (NR 6R et NRK - 49 F) diminue avec la densité cellulaire (Rizzino et al., 1988), on ne dispose pas d'information concernant la régulation de ces phénomènes *in vivo*.

Les données discutées jusqu'à présent concernent la fixation globale des FGFs acide et basique. Dans le but de préciser la nature des sites de fixation impliqués, nous avons réalisé des dosages radiorécepteurs sur des préparations de membranes de cerveau.

#### *Résultats concernant le FGFa*

La première méthode utilisée fut celle élaborée par Courty et al. (1988), basée sur un dosage compétitif entre FGFs radiomarqués et FGFs froids. Les représentations de Scatchard obtenues à partir des courbes de compétition apparaissent biphasiques. Nous avons discuté précédemment les raisons qui peuvent conduire à cette forme de courbe (cf paragraphe considérations méthodologiques). La possibilité d'une hétérogénéité dans les préparations de  $I^{125}$ -FGF et FGF froid peut être écartée puisque la qualité de ces préparations est vérifiée. Par ailleurs, les unités de stimulation du  $I^{125}$ -FGFs et FGFs froids sont identiques, ce qui suggère que la capacité de liaison du FGF n'est pas modifiée

après radiomarquage. La possibilité d'un phénomène de coopérativité négative a déjà été étudié pour des cellules en culture dans le cas du FGF acide (Kan et al., 1988). Ces auteurs s'appuyant sur des cinétiques de dissociation réalisées à différentes températures, montrent l'existence de deux catégories indépendantes de sites de fixation. Par ailleurs, une seule des deux catégories de sites d'interaction (les sites à haute affinité) apparaît sensible à un prétraitement des cellules par la cycloheximide.

L'ensemble de ces résultats permet de penser que la nature biphasique des courbes de Scatchard reflète la présence, à la surface des membranes du cerveau embryonnaire, de deux classes de sites de fixation possédant une affinité différente pour le FGF acide. La première classe de sites de fixation ( $K_d = 100$  pM) n'est détectée qu'aux stades E7, E10, E15, P1 mais non chez l'adulte. Cette catégorie de sites à haute affinité pour le FGF acide a déjà été décrite 1) sur des cellules en culture, où les  $K_d$  obtenus sont compris entre 9 et 250 pM (Manson et al., 1989 ; Kan et al., 1988 ; Valles et al., 1990 ; Olwin et Hauschka, 1986 ; Neufeld et Gospodarowicz, 1986), 2) sur des explants d'embryon de Xénope, avec un  $K_d$  de 140 pM (Gillespie et al., 1989), 3) sur des préparations membranaires de cerveau de cobaye adulte, avec un  $K_d$  de 180 pM (Ledoux et al., 1990) et d'embryon de poulet entier où la valeur de  $K_d$  décrite : 100 pM (Olwin et Hauschka, 1990) correspond exactement à celle que nous rapportons.

La quantité de sites à haute affinité pour le FGF acide est de  $1 \pm 0,2$  pmole par mg de protéine membranaire à E7 ; d'environ  $0,5 \pm 0,2$  pmole par mg de protéine membranaire à E10, E15 et P1. Chez l'adulte, les sites à haute affinité n'ont pas été détectés. Olwin et Hauschka (1990) rapportent sur des membranes de cerveau d'embryon de poulet à E17 un nombre de sites à haute affinité voisin de 10 fmoles/mg de protéine, ce qui apparaît 50 fois inférieur aux valeurs que nous rapportons pour la même période de développement. Cette différence résulte probablement des techniques utilisées. En effet, les conditions d'extraction des membranes (tampons, centrifugation) et d'étude de la fixation (tampons, température, isolement des membranes) sont différentes. De plus, Olwin et

Hauschka (1990a), ne traitent pas leurs préparations membranaires par le  $MgCl_2$  comme nous l'avons fait ; or, la fixation spécifique du FGF au niveau de membranes de cerveau est deux fois plus importante si celles-ci ont été, au préalable, mises en présence d'une solution contenant 3 M  $MgCl_2$  (Courty et al., 1988). Ce résultat a récemment été confirmé sur des membranes préparées à partir de tumeurs mammaires (Hondermarck et al., 1990e). La diminution du nombre de sites à haute affinité pour le FGF acide que nous décrivons entre E7 et E10 puis entre P1 et le stade adulte est en accord avec les données obtenues pour l'embryon de poulet entier, par Olwin et Hauschka (1990a). Ces auteurs ont constaté une diminution brutale du nombre de sites entre E6, E7, E9 et E13. Chez l'adulte, nous n'avons pas détecté la présence de sites à haute affinité pour le FGF acide. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Olwin et Hauschka (1989) qui ne détectent pas de sites à haute affinité pour le FGF acide dans le cerveau de boeuf adulte. Cependant, Ledoux et al. (1990), utilisant des conditions expérimentales identiques aux nôtres, ont détecté de tels sites dans le cerveau de cobaye. La capacité membranaire rapportée par ces auteurs (200 fmoles/mg de protéine) est plus faible que celle que nous obtenons chez l'embryon (400 à 1000 fmoles/mg de protéine). Ainsi, l'absence de détection de sites à haute affinité dans le cerveau adulte de boeuf (Olwin et Hauschka, 1989) que nous confirmons chez le poulet doit probablement s'expliquer par le fait que le nombre de ces sites est situé à la limite du seuil de détection.

La seconde classe de sites de fixation pour le FGF acide possède un  $K_d$  de 20 nM et est présente à tous les stades de développement ; la capacité membranaire de ces sites est d'environ 20 pmole/ng de protéine à E7, E10, E15 et chez l'adulte mais apparaît 3 fois plus importante à P1. La présence d'une catégorie de sites à basse affinité pour le FGF acide a déjà été décrite sur des cellules en culture (Kan et al., 1989), sur des préparations membranaires de cerveau (Ledoux et al., 1990) et de blastème (Boilly et al., 1990 ; Hondermarck et Boilly, 1990), les valeurs de  $K_d$  obtenues, respectivement 2, 40 et 10 nM ainsi que la valeur des capacités membranaires qui sont de 5 à 20 fois supérieures à celle des sites à haute affinité

sont en accord avec les données que nous rapportons. Quoique la signification physiologique de ces sites à basse affinité pour le FGF acide ne soit pas connue, Kan et al. (1988) montrent que 1) sur les cellules d'hépatome (Hep G2), de faibles doses de FGF acide stimulent la prolifération cellulaire, alors que de fortes doses de ce facteur de croissance inhibent la prolifération. 2) des cellules dérivées d'hépatomes, qui ne répondent au FGF acide que par une stimulation de la croissance ne possèdent que des sites à haute affinité. Ces résultats suggèrent que les sites à haute affinité pour le FGF acide seraient impliqués dans une stimulation de la croissance cellulaire alors que les sites à basse affinité pourraient être impliqués dans une régulation négative de la croissance.

La fixation du FGF acide au niveau de ces deux catégories de sites de fixation sur les membranes de cerveau apparaît sensible à divers traitements. Ainsi, après fixation du  $I^{125}$ -FGFa, nous avons montré qu'un lavage des membranes par une solution contenant 0,6 M NaCl élimine ce facteur de croissance sélectivement de ces sites à haute affinité. Ces résultats confirment les données obtenues à partir de cellules BHK en culture par Moscatelli et al. (1987). Cependant, ces auteurs rapportent qu'un prétraitement des cellules par l'héparinase (2,5 U/ml, 2 h, température ambiante) entraîne une élimination sélective des sites à basse affinité. Or, après traitement de nos préparations membranaires par l'héparinase (10 U/ml, 1 h, température ambiante), nous observons une disparition à la fois des sites à haute et basse affinité. Ces résultats confirment la nature "heparin-like" des sites de fixation à basse affinité, mais suggèrent que des composés "heparin-like" interviendraient également dans la fixation du FGF acide au niveau des sites à haute affinité. Quoique Feige et al. (1988) ont montré que le récepteur aux FGFs est glycosylé, on ne sait rien de la présence de structures "héparin-like".

#### *Résultats concernant le FGFb*

En ce qui concerne le FGF basique, les représentations de Scatchard apparaissent linéaires pour les stades E7, E10, E15 et P1 et biphasiques chez l'adulte. Ainsi, une seule catégorie de sites de fixation est détectée aux stades E7, E10, E15 et P1 alors que deux catégories sont détectées chez l'adulte.

La première catégorie de sites de fixation, détectée au niveau de chacun des stades étudiés possède un Kd de 10nM et une capacité membranaire comprise entre 48 et 108 pmoles/mg de protéines. Cette catégorie de sites de fixation à basse affinité pour le FGF basique a déjà été rapportée sur 1) des cellules en culture avec un Kd voisin de 3nM (Moscatelli, 1987a ; Vallès et al., 1990) et 2) sur des préparations membranaires de cerveau (Courty et al., 1988 ; Ledoux et al., 1989), de gliomes (Morisson et al., 1990), d'intestin, de rein, de foie, de poumon, de rate et d'estomac (Ledoux et al., 1989) et enfin de placenta (Hondermarck et al., 1990). Les valeurs de Kd obtenues, comprises entre 3 et 60 nM, ainsi que les capacités membranaires comprises entre 28 et 230 pmoles/mg de protéines membranaires, sont en accord avec les valeurs que nous rapportons. Cette catégorie de sites à basse affinité est éliminée par un prétraitement des membranes par l'héparinase ; de plus, un lavage des membranes par une solution contenant 0,6 M NaCl élimine la fixation du FGF de ces sites. Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus au niveau des cellules BHK en culture (Moscatelli, 1987) et indiquent que ces sites de fixation à basse affinité pour le FGF basique correspondent à des structures "heparin-like"

La deuxième catégorie de sites de fixation (haute affinité), qui n'a été détectée que chez l'adulte, possède un Kd de 5 pM et une capacité membranaire de 100 fmole/mg de protéine. Une catégorie de sites à haute affinité pour le FGF basique a déjà été décrite 1) sur des cellules en culture, avec des Kd compris entre 20 et 270 pM (Neufeld et Gospodarowicz, 1985, 1986 ; Moscatelli et al., 1987a ; Moenner et al., 1986 ; Walicke et al., 1989 ; Sharma et Daihya, 1988 ; Ferning et al., 1990), 2) sur des préparations de membranes de cerveau de boeuf (Courty et al., 1988) et de cobaye (Ledoux et al., 1989), de rétine (Moscatelli et al., 1989), de gliomes (Morisson et al., 1989), de cellules de cancer du sein (Peyrat et al., en préparation ; Hondermarck et al., 1990), de placenta (Hondermarck et al., 1990) avec des Kd compris entre 10 et 500 pM. Sur des membranes d'embryon de poulet entier, le Kd apparaît est de 30 pM. La valeur du Kd que nous obtenons apparaît donc inférieure à ce qui a déjà été rapporté par ailleurs. De plus, la concentration en I<sup>125</sup>-FGFb et en FGFb non marqué que nous utilisons étant

comprise entre 26 et 260 pM, l'obtention d'un Kd non compris entre ces valeurs résulte nécessairement d'une extrapolation réalisée par le programme LIGAND. Ainsi, la valeur de Kd que nous obtenons (5 pM) est située hors de la zone optimale d'étude définie par notre expérimentation. Cependant, la déduction d'un Kd situé hors de la zone optimale d'étude a déjà été rapportée dans le cas du cerveau de cobaye (Ledoux et al., 1989) où le Kd déterminé est de 15 pM avec une concentration en FGF basique comprise entre 23 et 230 pM. La détection d'un site de fixation à haute affinité dans le cerveau de poulet adulte suggère que ces sites pourraient être présent à tous les stades du développement. Cependant ils seraient indétectables en raison de la quantité importante de sites de fixation à basse affinité. Cette hypothèse est étayée par la détection chez l'embryon de sites à haute affinité après traitement par le NaCl 0,6 M.

Ces conclusions nous ont amenés à réaliser un dosage des sites de fixation du FGF basique par saturation, technique qui permet de travailler avec des concentrations plus proches du Kd. Les courbes de saturation obtenues nous indiquent que la gamme de concentration en I<sup>125</sup>-FGFb que nous avons utilisé (de 2 à 200 pM) ne permet pas d'aboutir à la saturation des sites de fixation contenus dans 30 µg /ml (équivalent protéine) de membrane. Le fait qu'une saturation de la fixation n'ait pas été atteinte a déjà été relaté (Ferning et al. 1990) et s'explique par la présence des sites à basse affinité dont le Kd est de 10 nM et qui ne sont donc pas saturés pour les concentrations de I<sup>125</sup>-FGFb utilisées. Cependant, l'obtention d'une saturation complète n'est pas nécessaire à la détermination des caractéristiques des sites de fixation puisque nous utilisons la transformée de Scatchard. Les résultats indiquent l'existence, sur les membranes de cerveau embryonnaire et adulte, d'une catégorie de sites de fixation pour le FGF basique possédant un Kd de 40 pM. Cette valeur est située dans la gamme de concentration que nous avons utilisée et est conforme à ce qui a déjà été rapporté sur d'autres modèles (Neufeld et Gospodarowicz, 1985, 1986 ; Moscatelli, 1987 ; Moenner et al., 1986 ; Walicke et al., 1989 ; Sharma and Daihya, 1988 ; Ferning et al., 1988 ; Moscatelli et al., 1987a ; Morrison et al., 1989), ainsi que sur des membranes

d'embryon de poulet entier sur lesquelles le Kd est de 30 pM (Olwin et Hauschka, 1990).

Les expériences de compétition croisée entre FGF acide et FGF basique nous ont permis de constater que la fixation du I<sup>125</sup>-FGFa et du I<sup>125</sup>-FGFb au niveau des membranes du cerveaux est déplacée par le FGF acide et le FGF basique froid. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés en culture cellulaire (Olwin et Hauschka, 1986 ; Neufeld et Gospodarowicz, 1986) ou sur des préparations membranaires de cerveau de cobaye adulte (Ledoux et al., 1990) et montrent que les FGFs acide et basique interagissent très vraisemblablement au niveau de sites de fixation, à haute et basse affinité, communs.

### Pontage moléculaire

Les expériences de pontage covalent réalisées entre I<sup>125</sup>-FGFs et protéines membranaires de cerveau ont abouti dans le cas du I<sup>125</sup>-FGFa comme dans celui du I<sup>125</sup>-FGFb à la détection de deux éléments de fixation de poids moléculaire 130 et 95 kDa. L'agent de pontage utilisé, le dissuccinimidyl subérate, permet de réaliser par l'intermédiaire de groupements carboxyliques une liaison peptidique entre le récepteur et les I<sup>125</sup>-FGFs, ce qui indique la nature protéique des deux éléments de fixation mis en évidence. Enfin, le fait que : 1) la fixation au niveau de ces éléments soit déplacée par un excès de 100 fois (2,3 nM) en FGF froid suggère qu'il s'agit de sites à haute affinité. 2) l'intensité des deux éléments de 130 et 110 kDa diminue au cours du développement, et particulièrement entre E7 et E10, puis entre P1 et le stade adulte de façon comparable à celle du nombre de sites de fixation à haute affinité détectés par dosage radiorécepteur, ce qui permet de penser que les polypeptides que nous avons mis en évidence par pontage moléculaire correspondent à des formes de récepteur de haute affinité pour les FGFs.

Quoique des éléments de poids moléculaire très variés (de 65 à 200 kDa) aient été détectés par pontage moléculaire, sur divers modèles (cf paragraphe généralités), la première valeur que nous obtenons (environ 130 kDa), a déjà été

décrite dans le cerveau adulte (Ledoux et al., 1989 ; Méréau et al., 1989 ; Imamura et al., 1988) ainsi que dans l'embryon de poulet entier (Lee et al., 1989); la second valeur (environ 95 kDa) correspond à ce qui a été obtenu sur des neurones d'hippocampe, en culture (85 kDa) (Walicke et al., 1989).

Les expériences de compétition croisée entre FGF acide et FGF basique montrent que ces facteurs entrent en compétition au niveau des mêmes sites de fixation de 130 et 95 kDa. Ce résultat 1) est en accord avec ceux obtenus sur des cellules en culture (Neufeld et Gospodarowicz, 1986 ; Olwin et Hauschka, 1986 ; Olwin et Hauschka, 1989 ; Mascarelli et al., 1989) et sur des préparations de membranes de cerveau de cobaye adulte (Ledoux et al., 1990), d'embryon de Xénope (Gillespie et al., 1989) et d'embryon entier de poulet (Olwin et Hauschka, 1990a-b), 2) est un argument supplémentaire en faveur de l'existence de sites de fixation communs pour les FGFs acides et basique.

#### Expression d'ARNm correspondant au gène BEK :

La sonde ADNc BEK que nous avons utilisée comprend la partie 5' codante ainsi que le premier domaine immunoglobuline du gène BEK humain (Dionne et al., 1990). Sachant que :

1) l'ADNc BEK présente une grande homologie avec l'ADNc codant pour le récepteur du FGF de l'embryon de poulet (Lee et al., 1989 ; Dionne et al., 1990),  
 2) l'expression du gène BEK après transfection dans les cellules NIH 3T3 donne lieu à la synthèse d'une glycoprotéine membranaire de 135 kDa, capable de fixer avec une forte affinité la forme acide ainsi que la forme basique du FGF et que ce poids moléculaire correspond au poids moléculaire du récepteur putatif des deux formes de FGF, que nous avons identifié par pontage moléculaire ;  
 l'utilisation de la sonde BEK comme marqueur de l'expression génique du récepteur des FGFs dans le cerveau de poulet, nous apparaissait cohérente.

De fait, nous avons constaté l'expression de deux transcrits : une forme majeur à 4,4 Kb et une forme mineure à 1,4 Kb, pour chacun des stades de développement étudiés. L'expression de transcrits BEK de 4,4 Kb a déjà été

observée sur des cellules en culture (Dionne et al., 1990) ainsi que dans le foie, les poumons, les reins et le cerveau de souris adulte (Kornbluth, 1988). L'expression d'un transcript de 1,5 Kb n'avait jusqu'à présent pas été décrite mais a récemment été observée dans le cerveau de souris à partir de P11 (Thomas, 1990).

La quantité du transcript majeur de 4,5 Kb diminue de façon importante entre E7 et E10 puis se maintient constante jusqu'à P1. Dans le cas du cerveau de souris, Thomas et al. (1990) ne rapportent aucune variation de la quantité du transcript BEK ; cependant, ces auteurs n'ont commencé leur étude qu'à E14. La quantité du transcript mineur de 1,5 Kb apparaît plus importante à E15 qu'aux autres stades étudiés. Dans le cas du cerveau de souris, ce transcript est détecté à partir de P11 et sa quantité augmente ensuite jusqu'à P30 (Thomas, 1990).

L'évolution de la quantité du transcript majeur de 4,4 Kb apparaît similaire à l'évolution de la quantité de sites à haute affinité pour les FGFs, (détectés par dosage radiorécepteur et par pontage moléculaire). Ce résultat nous incite à penser que la diminution de la quantité de récepteurs membranaires pour les FGFs acide et basique correspond à une diminution de l'expression des ARNm codant pour ces récepteurs.

En conclusion, il apparaît que les FGFs acide et basique interagissent sur les membranes de cerveau de poulet au niveau de sites de fixation communs. Les sites de fixation à haute affinité et faible capacité semble correspondre à des récepteurs de poids moléculaire apparent de 130 et 95 kDa environ. Le nombre de ces récepteurs diminue de façon importante entre E7 et E10, puis entre P1 et l'état adulte ; par ailleurs, l'expression génique de ces récepteurs paraît diminuer entre E7 et E10. Les sites de fixation à basse affinité et forte capacité, pourraient correspondre à des structures "heparin-like" ; les expériences rapportés dans le chapitre suivant visent à mieux caractériser biochimiquement et à mieux connaître le rôle de ces sites de fixation des FGFs.

## CHAPITRE III

### CARACTERISATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES SULFATES POSSEDANT UNE AFFINITE POUR LES FGFs.

#### I - INTRODUCTION

Les résultats du chapitre précédant nous ont montré que les FGFs acide et basique interagissent au niveau des membranes cellulaires du cerveau par l'intermédiaire de sites de fixation communs. Les sites de fixation à haute affinité correspondent à des récepteurs putatifs qui ont été caractérisés par pontage moléculaire. Les sites de fixation à basse affinité, qui apparaissent sensibles à l'héparinase, ont déjà été décrits par ailleurs au niveau des surfaces cellulaires et des matrices extracellulaires (Moscatelli, 1987a ; Bashkin et al., 1989). Quoique la structure précise de ces sites à basse affinité ne soit pas connue, on sait qu'ils contiennent des glycosaminoglycannes de type héparine qui sont responsables de la fixation des FGFs (Moscatelli, 1987 ; Bashkin et al., 1989 ; Vigny et al., 1988 ; Kieffer et al., 1990). Le rôle biologique de ces sites à basse affinité reste inconnu, cependant il a été montré qu'ils étaient capables de stocker les FGFs et de les libérer sous une forme biologiquement active (Vlodavsky et al., 1987, Friesel et al., 1988 ; Bashkin et al., 1989). Ces résultats laissent supposer un contrôle par les sites à basse affinité, de la biodisponibilité des FGFs, contrôle au cours duquel la matrice extra-cellulaire jouerait un rôle essentiel.

Dans le but d'aborder la signification biologique des sites de fixation à basse affinité pour les FGFs, nous avons isolé les glycosaminoglycannes sulfatés du cerveau embryonnaire et évalué leurs capacités à fixer les FGFs ; enfin, nous les avons localisés *in situ* par radioautographie.

## II - MATERIELS ET METHODES

### 1 - Présentation des glycosaminoglycannes.

Les glycosaminoglycannes (GAGs) autrefois appelés mucopolysaccharides sont de longues chaînes polysaccharidiques non branchées, composées d'unités disaccharidiques répétitives. Sur la base de la composition glucidique, de la structure et du niveau de sulfatation de leurs unités disaccharidiques, les GAGs ont été classés en quatre groupes principaux (Tableau 11) : 1) l'acide hyaluronique ; 2) les chondroïtines et des dermatanes sulfates ; 3) les héparanes sulfates et l'héparine ; 4) les kératanes sulfates.

Alors que l'acide hyaluronique n'est pas sulfaté, l'ensemble des autres GAGs possèdent des groupements sulfates en quantité plus ou moins importante. Les GAGs sont synthétisés à partir de monosaccharides conjugués à un nucléotide (UDP-monosaccharide) sous l'action de glycosyltransférases et sont sulfatés essentiellement dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi à partir de 3' phosphoadénosine-5'-phosphate. Leur dégradation ainsi que leur désulfatation apparaissent avoir lieu essentiellement dans les lysosomes (Revue dans Ruoslahti, 1988). Les GAGs, sauf l'acide hyaluronique, sont trouvés dans les tissus associés avec des protéines par l'intermédiaire d'un trisaccharide de liaison (Protéine - sérine - xylose - galactose - galactose - GAG) pour former des protéoglycannes.

### 2- Extraction des GAGs

30 cerveaux d'embryons de poulets (E15) ont été disséqués stérilement et homogénéisés dans 15 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,4 contenant 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $\text{Na}^{35}\text{SO}_4$  (Amersham, 116 mCi / mmole). L'homogénat est placé à 37°C pendant 12 h. A l'issue de cette période d'incubation, l'homogénat est soniqué 4

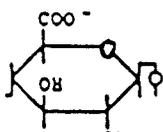
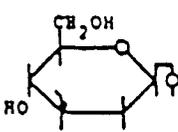
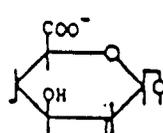
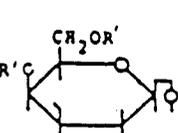
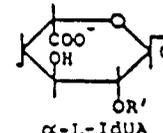
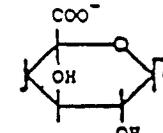
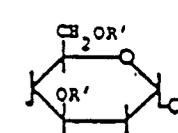
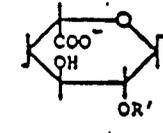
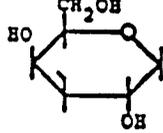
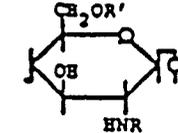
Polysaccharide	Monosaccharide units <sup>a</sup>		Substituents
	A	B	
Hyaluronate	 $\beta$ -D-GlcUA	 $\beta$ -D-GlcN	$R = -\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$
Chondroitin sulfates Dermatan sulfate	 $\beta$ -D-GlcUA	 $\beta$ -D-GalN	$R = -\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$
	 $\alpha$ -L-IdUA	$R' = -\text{H} \text{ or } -\text{SO}_3^-$	
Heparan sulfate and Heparin	 $\beta$ -D-GlcUA	 $\alpha$ -D-GlcN	$R = -\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ or $-\text{SO}_3^-$
	 $\alpha$ -L-IdUA	$R' = -\text{H} \text{ or } -\text{SO}_3^-$	
Keratan sulfate	 $\beta$ -D-Gal	 $\beta$ -D-GlcN	$R = -\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ $R' = -\text{H} \text{ or } -\text{SO}_3^-$

Tableau 11 : Caractéristiques des principaux groupes de glycosaminoglycannes.

fois 30 secondes à 50 W et délipidé par deux extractions dans le mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) à 0°C (Suzuki, 1965) ; la fraction méthanolique est séchée sous air comprimé à température ambiante. Le matériel résiduel, rincé par l'acétone et séché en présence de  $P_2O_5$  pendant une nuit à 37°C, est ensuite repris dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 8,5 ;  $CaCl_2$  4mM contenant 1mg/ml de pronase (Calbiochem-Behring Corp.). La digestion est réalisée à 56°C pendant 3 jours, en rajoutant 1 mg/ml de pronase toutes les 24 h.. L'arrêt de la digestion est effectué en portant le mélange réactionnel à 100 °C pendant 1mn. Le matériel insoluble est ensuite précipité par centrifugation et le surnageant, contenant les GAGs, est déprotéinisé par l'acide trichloroacétique 5% (v/v) pendant 24 h. à 4°C.

Les GAGs non radiomarqués sont préparés suivant le même protocole, sauf en ce qui concerne l'incubation en présence de  $^{35}SO_4^{2-}$  qui n'est pas réalisée.

### 3- Fractionnement des GAGs.

La préparation de GAGs est chromatographiée sur colonne d'échange d'anions DEAE-Sépharose équilibrée par le tampon d'équilibration : Tris-Hcl 0,01 M ; 0,1 M NaCl ; pH 7,5. Après lavage par 2 volumes de colonne de tampon d'équilibration, l'élution est réalisée suivant un gradient 0,1-1 M NaCl dans le même tampon. Le débit de la colonne est de 0,5ml/mn. et des fractions de 1 ml sont collectées ; leur radioactivité est mesurée à partir d'un aliquote de 100 µl dans un compteur β, après addition de liquide scintillant (Ready-safe).

### 4- Identification des GAGs.

Les GAGs ont été identifiés sur la base de leurs sensibilités à l'héparinase et la chondroïtinase ABC, selon les conditions décrites par Linker et al. (1960) et Yamagata et al. (1968). Brièvement, les fractions d'élution de chromatographie DEAE sont incubées en présence de 10 U/ml d'héparinase (EC4.2.2.7.,

*Flavobacterium heparinium*, Sigma) ou de chondroïtinase ABC (EC4.2.2.4., *Proteus vulgaris*, Sigma) pendant 2 h. à 37°C, les réactions sont bloquées par chauffage pendant 1 mn. à 100 °C.



#### 5- Déplacement de la fixation du FGFb par les GAGs.

Pour ces expérimentations, les GAGs radiomarqués, séparés sur chromatographie DEAE-Sepharose et soumis ou non à des digestions enzymatiques (paragraphe 4-) ont été utilisés. 25 µl de chaque fraction d'élution DEAE-Séparose sont ajoutés dans des tubes de polystyrène avec 23 pM de I<sup>125</sup>-FGFb et 30 µg (équivalent protéine) de membranes de cerveau de poulet (E15) dans un volume final de 500 µl de tampon Hepes 20mM pH 7,5 ; CaCl<sub>2</sub> 1mM ; Mg Cl<sub>2</sub> 1mM, PMSF 0,1 mM ; pepstatine 1 µg/ml ; leupeptine 1 µg/ml, aprotinine 5 Unités Kallikrein/ml. Après incubation sous agitation 1 h. à 4°C, les tubes sont centrifugés, le surnageant est éliminé et la radioactivité du culot contenant les membranes est mesurée au compteur gamma (LKB Wallac). Les fractions capables de modifier la fixation du I<sup>125</sup>-FGFb sur les membranes sont ensuite rassemblées et utilisées à la réalisation d'un effet dose. Pour ce faire, une dilution par entrainement de chaque fraction est effectuée préalablement à l'adjonction du I<sup>125</sup>-FGF et des membranes de cerveau. L'expérimentation est ensuite menée suivant les conditions décrites précédemment. L'utilisation du programme "heterologous displacement" (LIGAND, Munson and Rhodbard, 1970) permet de définir l'affinité des composés de la fraction héparane-sulfate pour le I<sup>125</sup>-FGFb.

#### 6 - Electrophorèse et électrotransfert des GAGs.

Les fractions d'élution de DEAE contenant les GAGs, non radiomarqués, capables de fixer le FGF basique sont soumis à une électrophorèse en milieu

dénaturant SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide (5-15%) suivant les conditions définies par Laemmli (1970). La migration s'effectue sous ampérage constant (20 mA) jusqu'à disparition complète du front de migration visualisé par le bleu de bromophénol. Après migration électrophorétique, le gel de polyacrylamide est équilibré pendant 30 mn. dans du tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 190 mM, SDS 0,01% (wt/v), méthanol 15% (v/v). Une membrane immobilon P (Millipore) est découpée à la taille du gel. Cette membrane est activée en présence de méthanol (Merck) puis rincée plusieurs fois à l'eau déminéralisée (milli Q, Millipore) et incubée dans du tampon de transfert pendant 10 mn.. Le gel est accolé contre la membrane et l'ensemble est placé dans la cuve de transfert (Biorad). L'électrotransfert est alors réalisé à voltage constant (45 V) pendant 5 h. Les GAGs possédant une affinité pour le FGF basique sont localisés comme suit. La membrane de transfert est incubée dans du tampon de binding contenant 50 nM de  $I^{125}$ -FGFb (AS : 100 000 cpm/ng) pendant 2 h à 4°C puis lavée 3 fois dans du tampon de binding, séchée à température ambiante et radioautographiée (film X Omat R Kodak). La spécificité est vérifiée 1) en présence d'un excès de 100 fois en FGFb froid 2) après traitement par l'héparinase comme rapporté dans le paragraphe 4.

#### 7 - Modulation de l'activité biologique des FGFs.

L'effet des GAGs (digérés ou non par l'héparinase et la chondroïtinase ABC comme rapporté dans le paragraphe 4) sur l'activité mitogène des FGFs est apprécié par adjonction de 50  $\mu$ l des fractions d'élution DEAE au milieu de culture des fibroblastes CCL39, en présence ou en l'absence de FGFs et suivant la méthodologie décrite dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

## 8 - Localisation *in situ* des sites de fixation des FGFs.

La localisation des sites de fixation des FGFs a été réalisée par incubation du  $I^{125}$ -FGFb sur des coupes de cerveau et autoradiographiée suivant une méthode proche de celle définie par Jeanny et al. (1987).

*Préparation des coupes à congélation de cerveau.* Les cerveaux d'embryons (E15) sont disséqués et fixés dans une solution de tampon phosphate 150 mM ; 0,15 M NaCl (PBS) contenant 0,1% de paraformaldéhyde pendant 2 h. à 4°C. A l'issue de cette période, les cerveaux sont rincés dans le PBS (sans paraformaldéhyde), imprégnés dans une solution de sucrose 5% puis inclus dans le cryogel (Reichert-Jung) et congelés dans l'azote liquide. Les coupes sont réalisées à l'aide d'un cryotome (Reichert-Jung), collectées sur des lames gélatinées et stockées à - 70°C en présence de  $P_2O_5$  jusqu'à utilisation.

*Incubation des coupes de cerveau en présence de  $I^{125}$ -FGFb et autoradiographie.* Les lames, sur lesquelles sont placées les coupes, sont trempées dans le PBS pendant 15 mn (élimination du cryogel), puis dans une solution de PBS contenant 3 M  $MgCl_2$  pendant 5 mn. à température ambiante. Après 3 lavages dans le PBS, 50  $\mu$ l de PBS contenant 10 nM de  $I^{125}$ -FGFb sont déposés sur chaque coupe pour une incubation d'une heure à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 6 fois dans le PBS puis séchées à 37°C pendant une nuit. L'autoradiographie est réalisée par trempage dans la photo-émulsion K2 Ilford (1:1) (v/v) dans de l'eau déminéralisée (milli Q, Millipore). Les coupes sont placées pendant 2 à 3 semaines à 4°C puis développées (Kodak D19B) et fixées (hyposulfite de sodium à 30%). Le montage s'effectue dans le XAM (BDH). L'analyse des radioautogrammes est réalisée grâce à l'analyseur d'images Samba 2005.

Pour les expériences de compétition, 100 nM de FGFb non radiomarqué sont ajoutés à la solution de  $I^{125}$ -FGFb.

Pour les traitements enzymatiques, les coupes sont recouvertes par 50  $\mu$ l de PBS contenant 10 U/ml d'héparinase (EC4.2.2.7., *Flavobacterium heparinum*,

Sigma) ou 10U/ml de chondroïtinase ABC (EC4.2.2.4., *Proteus vulgaris*, Sigma) pendant 1 h. à 37°C. Après rinçage 3 fois dans le PBS, les lames sont traitées comme précédemment décrit.

Pour les lavages en présence de concentrations élevées en NaCl, les coupes incubées avec le I<sup>125</sup>-FGFb sont rincées brièvement par une solution contenant 2M NaCl puis traitées comme précédemment décrit.

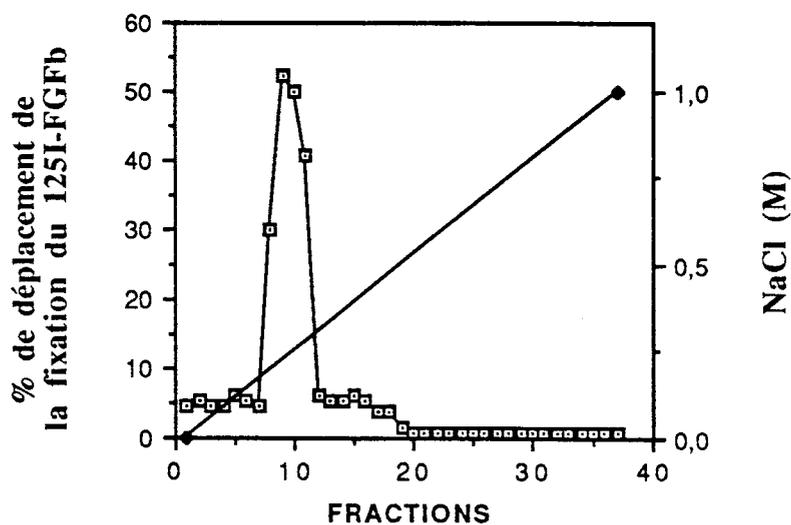
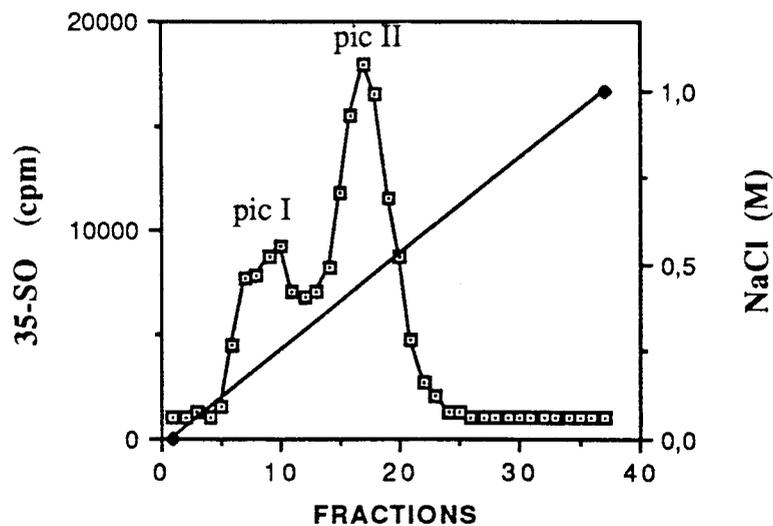
### III - RESULTATS

#### I - Extraction et séparation des GAGs.

Après incorporation de <sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> *in vitro*, délipidation, digestion pronasique, la solution de <sup>35</sup>S-GAGs déprotéinisée est fractionnée par chromatographie sur DEAE. Les GAGs se répartissent en fonction de leurs molarités d'élution (Fig.28A), les héparanes sulfates (picI) entre 0,15 et 0,3 M NaCl et les chondroïtines sulfates (picII) entre 0,35 et 0,65 M NaCl (Rippelino et Margolis, 1989). Les héparanes sulfates et les chondroïtines sulfates représentent respectivement 40% et 60% de la radioactivité associée aux GAGs sulfatés.

#### 2 - Déplacement du I<sup>125</sup>-FGFb de ses sites de fixation membranaires par les GAGs.

Chacune des fractions d'élution de la chromatographie DEAE est testée vis-à-vis de sa capacité à modifier la fixation du I<sup>125</sup>-FGFb sur les membranes de cerveau. Les résultats (Fig.28B) font apparaître que seul le contenu des fractions 0,2-0,3 M NaCl déplace la fixation membranaire du I<sup>125</sup>-FGFb. Cette action est abolie après digestion par l'héparinase et non affectée par un traitement par la chondroïtinase (Fig.29), la capacité de déplacement peut donc être attribuée à des composés de type héparanes sulfates. Un effet dose est réalisé à partir des fractions éluées entre 0,2 et 0,3 M NaCl rassemblées (pic I). Le témoin est réalisé avec les



**Figure 28** : (A) Profil d'éluion des  $^{35}\text{S}$ -GAGs en chromatographie DEAE, par un gradient 0,1-1 M NaCl.

(B) Déplacement de la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGFb sur les membranes de cerveau embryonnaire (E15) par chacune des fractions d'éluion de la colonne DEAE (fig. 28A).

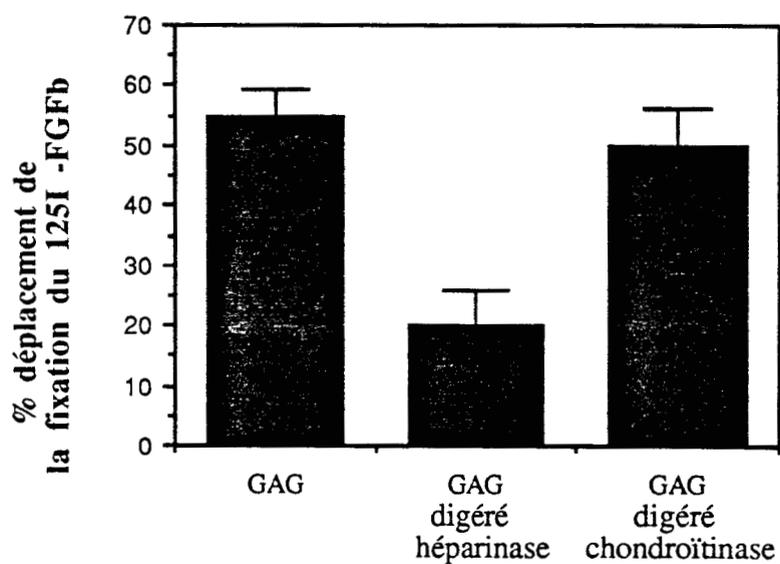


Figure 29 : Effet d'un traitement par l'héparinase et la chondroïtinase ABC du contenu des fractions d'élution DEAE correspondant au pic 1 (Fig.28) sur le déplacement de la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGFb sur les membranes de cerveau (E15).

fractions rassemblées du pic II. Les courbes de compétition obtenues (Fig. 30A) montrent que le contenu du pic I déplace de façon dose dépendante la fixation du  $I^{125}$ -FGFb alors que le contenu du pic II est sans effet. L'utilisation du programme "heterologous displacement" permet d'obtenir une courbe de Scatchard (Fig.30B) permettant de définir un Kd de 5 nM pour l'interaction héparane-sulfate/FGFb.

### 3 - Caractérisation électrophorétique des héparane sulfates possédant une affinité pour le FGFb.

La fraction héparane sulfate (pic 1) (Fig. 28) est soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide puis transférée sur membrane immobilon. Cette membrane est incubée en présence de  $I^{125}$ -FGFb et radioautographiée. L'autoradiogramme obtenu est montré dans la figure 31 et indique la présence de deux éléments fixant le  $I^{125}$ -FGFb, de poids moléculaire 15-20 kDa et 60-75 kDa (piste 1). La fixation du  $I^{125}$ -FGFb est abolie en présence d'un excès de 1000 fois en FGFb froid (piste 2). Un traitement par l'héparinase empêche la fixation du  $I^{125}$ -FGFb au niveau de ces deux éléments (piste 3).

### 4- Modulation de l'activité biologique des FGFs.

Comme rapporté dans la figure 32, les fractions d'élution de DEAE correspondant au pic I (Fig.28) inhibent l'incorporation de thymidine tritiée induite par le FGFb dans les fibroblastes CCL39. Cet effet est aboli après un traitement par l'héparinase.

### 5- Localisation *in situ* des sites de fixation du $I^{125}$ -FGFb.

Des coupes de cerveaux (E15) ont été incubées en présence de  $I^{125}$ -FGFb, autoradiographiées et analysées à l'aide de l'analyseur d'images Samba 2005. La figure 33A est une photo de l'écran de l'analyseur d'images, montrant une coupe

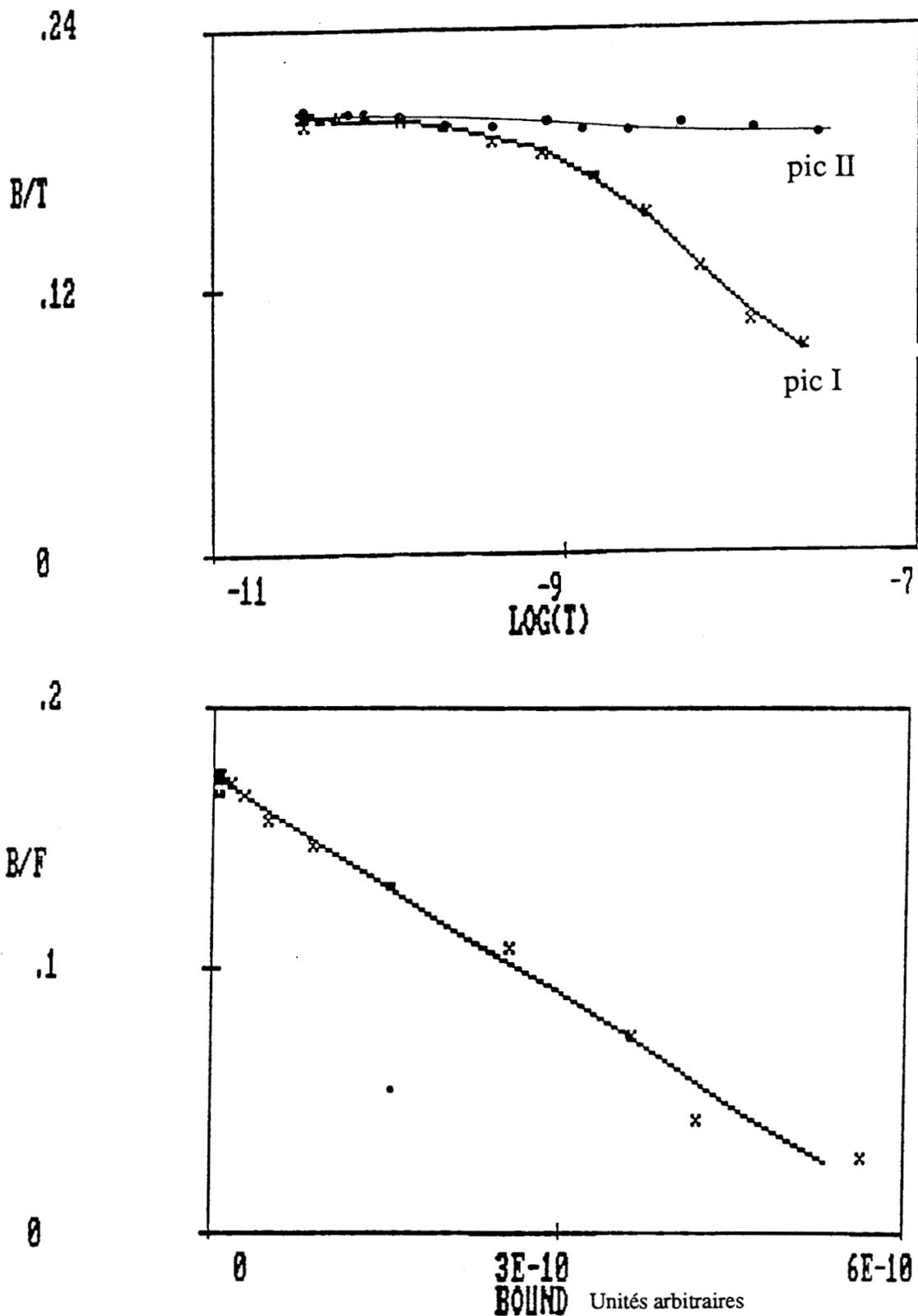


Figure 30 : (A) Effet de doses croissantes (0 à 50  $\mu$ l) des fractions d'élution de chromatographie DEAE (pic I et pic II) (Fig.28) sur la fixation du  $^{125}$ I-FGFb sur les membranes de cerveau (E15).  
 (B) Représentations de Scatchard déduite de la courbe effet-dose du déplacement de la fixation du  $^{125}$ I-FGFb par le contenu du pic I (Fig.30A).

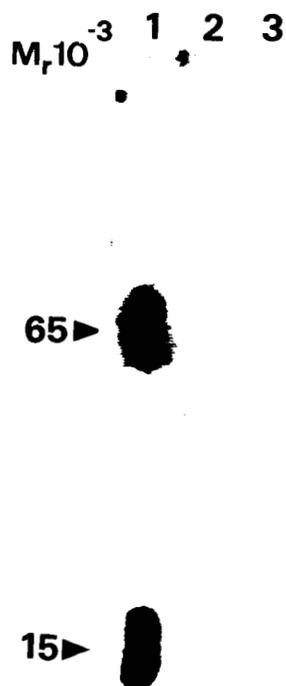
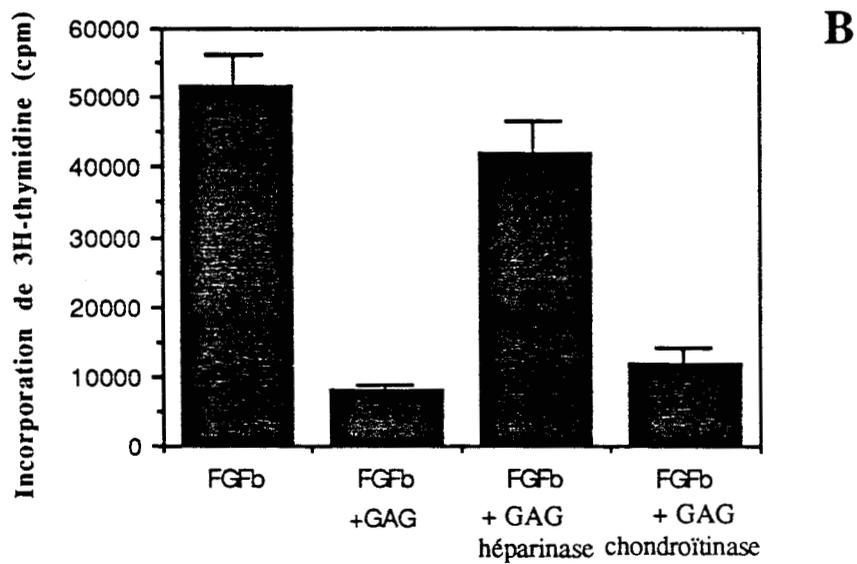
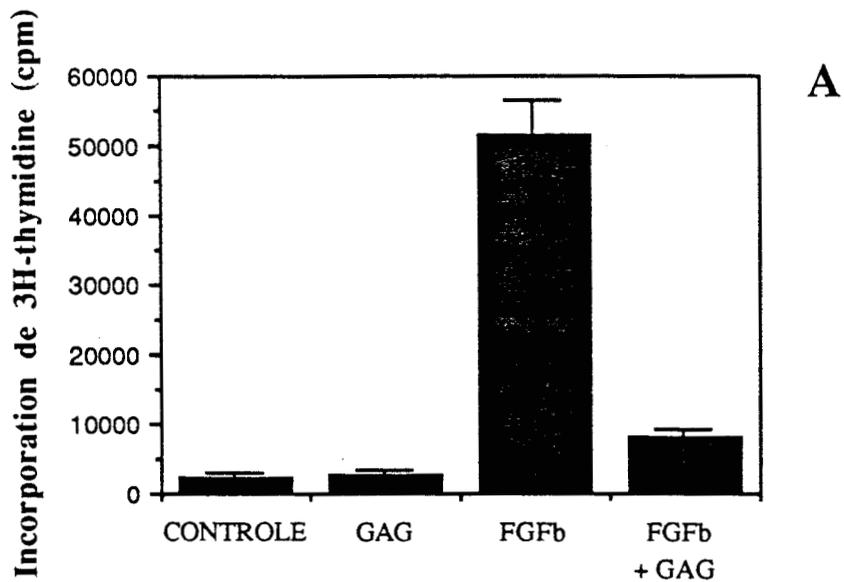
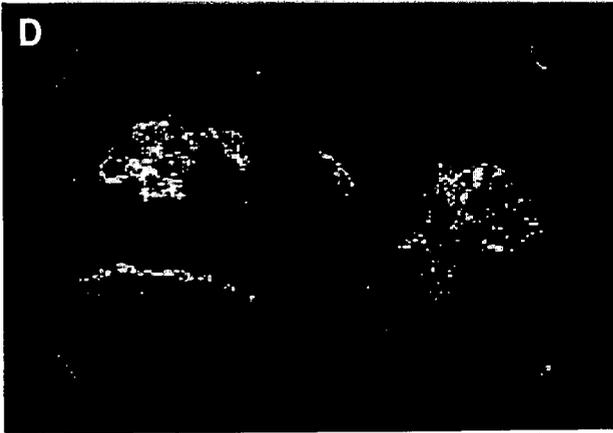


Figure 31 : Autoradiogramme obtenu après électrophorèse, transfert et incubation en présence de  $^{125}\text{I}$ -FGFb, du contenu des fractions d'élution DEAE correspondant au pic I (Fig.28), en absence (piste 1) et en présence (piste2) d'un excès de 1000 fois en FGFb non radiomarké. Lorsque les mêmes fractions sont traitées par l'héparinase, la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGFb n'est plus observée.



**Figure 32 :** (A) Effet des fractions d'éluion DEAE correspondant au picI (Fig.28) sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes CCL39, en absence ou en présence de FGFb. (B) Effet des fractions d'éluion DEAE correspondant au picI (Fig.28) après traitement par l'héparinase ou la chondroïtinase ABC, comme rapporté dans "matériels et méthodes".

**Figure 33** : Localisation "*in situ*" des sites de fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGFb. Des coupes à congélation de cerveau embryonnaire (E15) sont incubées en présence de  $^{125}\text{I}$ -FGFb, autoradiographiées et analysées à l'aide de l'analyseur d'images Samba 2005 comme rapporté dans "matériels et méthodes". (A) Coupe sagittale de cerveau observée sous éclairage normal. Le marquage autoradiographique est observé en fond noir. Le  $^{125}\text{I}$ -FGFb se fixe sur l'ensemble du tissu nerveux (B) ; cette fixation est déplacée par un excès de 1000 fois en FGFb froid (C) ; un prétraitement des coupes par l'héparinase empêche la fixation du  $^{125}\text{I}$ -FGFb (D). La fixation du  $^{125}\text{I}$ - FGFb est particulièrement intense au niveau des éléments vasculaires présents dans les méninges (E,F) et à l'intérieur du tissu nerveux (G). Au niveau du cervelet, une fixation importante du  $^{125}\text{I}$ -FGFb est observée au niveau des méninges et de la zone corticale (H).  
(Grossissement : 3 x pour A, B, C, D ; 80 x pour E, F ; 160 x pour G ; 32 x pour H)



sagittale de cerveau. Le  $I^{125}$ -FGFb se fixe sur l'ensemble du tube nerveux (Fig. 33B). Cette fixation est abolie en présence d'un excès de 1000 fois en FGFb non radiomarqué (Fig.33C). Un prétraitement des coupes par l'héparinase empêche la fixation du  $I^{125}$ -FGFb (Fig.33D). La fixation du  $I^{125}$ -FGFb est particulièrement intense au niveau des éléments vasculaires présents dans les méninges (Fig.33E,F) et à l'intérieur du tissu nerveux (Fig.33G). Au niveau du cervelet, la fixation du  $I^{125}$ -FGFb est importante sur les méninges et sur la zone corticale (Fig.33H).

#### IV - DISCUSSION

Les GAGs du cerveau d'embryon de poulet à 15 jours de développement ont été, après incorporation de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , séparés par chromatographie suivant deux pics qui, sur la base de leur molarités d'élution, ont été attribuées à des composés de type héparane sulfate (HS) et chondroïtine sulfate (CS). La présence de CS et d'HS a déjà été décrite dans le cerveau adulte (revue dans Margolis and Margolis, 1989) ainsi que dans le cerveau de rat (Margolis et al. 1975 ; Werts et al., 1985 a,b ; Jenkins and Bachelard, 1988 ; Rippelino and Margolis, 1989) et de souris (Burkat and Wiesmann, 1987 ; Kiang et al., 1981) au cours du développement post-natal, mais jamais à notre connaissance dans le cerveau embryonnaire. La présence de dermatane sulfate a déjà été décrite en faible quantité dans le cerveau (Burkat et Wiesmann, 1987 ; Kiang et al., 1981). Cependant, le dermatane sulfate et CS sont structurellement apparentés (un acide L-iduronique remplace l'acide D-glucuronique du chondroïtine 4 sulfate) et leur détection pourrait provenir d'une digestion incomplète par la chondroïtinase AC (Jenkins et Bachelard, 1988). La proportion de radioactivité associée aux  $^{35}\text{S}$ -GAG que nous avons détectés : CS 60% / HS 40% correspond globalement à ce qui a été décrit dans le cerveau de rat à P1 (Margolis et al., 1975) et dans le cerveau de souris jusqu'à P10 (Burkat et Wiesmann, 1987). Au cours des semaines ultérieures du développement, la biosynthèse et la dégradation (Burkat et Wiesmann, 1987) ainsi que la quantité (Jenkins et Bachelard, 1988) de ces GAGs sulfatés diminue. Cependant, leur

proportion relative reste comparable (Margolis et al., 1975 ; Burkat et Wiesmann, 1987).

L'étude de la capacité des GAGs, isolés à partir du cerveau embryonnaire, à modifier l'interaction du FGF basique au niveau des membranes montre que cette capacité est sensible à un traitement des GAGs par l'héparinase et peut donc être attribuée à des composés de type HS. Un traitement par la chondroïtinase ABC ne modifiant pas les capacités de fixation du FGF, les CS ne doivent donc pas être impliqués dans la fixation de ce facteur de croissance. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus, avec des préparations commerciales de GAGs, au niveau de cellules intactes (Moscatelli et al., 1987a) et d'ECM de cellules endothéliales (Bashkin et al., 1989 ; Presta et al., 1989), qui montrent un déplacement de la fixation du FGFb par l'héparine et les HS et non par les CS. La molarité d'éluion sur colonne DEAE des HS est comprise entre 0,1 et 0,3 M NaCl, or, seules les fractions 0,2-0,3 M NaCl inhibent la fixation du FGFb. Ce qui signifie que les HS à faible charge anionique (faible affinité pour la DEAE) n'inhibent pas la fixation du FGFb. La charge anionique des HS dépendant essentiellement de la quantité de groupements sulfatés ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), nos résultats suggèrent que l'affinité des HS pour le FGFb est fonction de leur degré de sulfatation ; ceci confirme les données établies avec l'héparine (Barzu et al., 1989 ; Sudhalter et al., 1989). Connaissant les constantes d'affinité des sites de fixation membranaires du FGFb (Chapitre II), nous avons, à partir de courbes effet-dose, défini une constante de dissociation  $K_d$  de 5 nM pour l'interaction HS/FGFb. Cette valeur correspond à celle obtenue pour les sites de fixation à basse affinité du FGFb que nous avons détecté au niveau des membranes du cerveau, ce qui suggère que les HS que nous avons purifiés correspondent aux sites de fixation à basse affinité du FGFb. Au niveau des membranes cellulaires et des MEC, les GAGs sont présents sans forme de protéoglycannes. Vigny et al. (1988) purifient à partir d'une tumeur ("Holm Schwarm Sarcoma" (EHS)) un protéoglycanne possédant une affinité pour le FGFb et montrent indirectement (digestion enzymatique) que cette affinité est due à des chaînes d'HS. La constante de dissociation obtenue entre ce protéohéparane

sulfate et le FGFb (kd=30nM) apparaît voisine de celle que nous rapportons.

Après électrophorèse des HS en gel de polyacrylamide et transfert, nous avons identifié, par utilisation de  $I^{125}$ -FGFb et autoradiographie, des éléments de PM compris entre 15 et 20 kDa et entre 60 et 75 kDa capables de fixer les FGFs. Ces éléments correspondent à des HS, puisqu'ils sont détruits par l'héparinase. Les HS de poids moléculaire proche de 15 kDa ont été décrits dans le cerveau de rat adulte (Ripellino et Margolis, 1989 ; Kingler et al., 1985) où ils sont trouvés sous forme de protéoglycannes de poids moléculaire proche de 220 kDa. Concernant les éléments de 60-75 kDa, leur poids moléculaire est supérieur à ce qui est généralement rapporté dans les tissus (Gallagher et al., 1986), mais correspond à ce qui a été décrit dans le cas de la tumeur EHS par Hassel et al. (1980) et Ledbetter et al. (1985). Ces auteurs ont mis en évidence un protéohéparane sulfate constitué d'un core protéique de 350-400 kDa et comprenant de 4 à 6 chaînes d'HS de poids moléculaire compris entre 60 et 70 kDa. De plus, Vigny et al. (1988) montrent que ce protéoglycanne fixe le FGFb par l'intermédiaire de ces chaînes d'HS dont le poids moléculaire correspond à l'une des valeurs que nous rapportons dans le cerveau embryonnaire.

Nous avons montré que les HS isolés à partir du cerveau embryonnaire sont capables d'inhiber l'effet mitogène du FGF basique sur les cellules CCL39. Une inhibition de l'activité biologique du FGF basique a déjà été rapportée pour l'héparine (Gospodarowicz et al., 1986 ; Lobb et al., 1986). Ces résultats pourraient être une conséquence de l'inhibition de la fixation membranaire du FGFb que nous avons montré avec les HS du cerveau. Ainsi, les HS entreraient en compétition avec les sites de fixation membranaires dans la capture du FGFb circulant. Ce modèle de régulation de l'activité biologique du FGFb par les HS laisse supposer un rôle important des matrices extracellulaires dans le contrôle de la croissance du cerveau. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les HS membranaires qui constituent les sites de fixation à basse affinité du FGFb, pourraient entrer en compétition avec les récepteurs à haute affinité dans la capture du FGFb, entraînant ainsi une inhibition de l'activité biologique de ce facteur de croissance. Ainsi, il existerait deux niveaux de régulation de l'activité

du FGF par les HS, un niveau matriciel et un niveau membranaire contrôlant la biodisponibilité de ce facteur de croissance pour ces récepteurs cellulaires.

Les expériences de radioautographie après incubation de coupes de cerveau en présence de  $I^{125}$ -FGFb nous montrent que ce facteur de croissance se fixe spécifiquement sur l'ensemble du tissu nerveux mais de façon particulièrement importante au niveau des vaisseaux et capillaires sanguins. Le fait que cette fixation soit 1) héparinase sensible 2) éliminée après lavage par une solution contenant 0,6 M NaCl montre qu'elle correspond à des composés de types héparanes sulfates. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas du blastème de régénération de membre d'amphibien (Boilly et al.,1990 ; Hondermarck and Boilly,1990) où la fixation du FGF acide a pu être attribuée à des structures "heparin-like", dont on sait d'ailleurs qu'elles sont présentes dans le blastème (Oudkhir,1989). Dans le placenta de souris, nous avons montré une fixation héparinase sensible du  $I^{125}$ -FGFb au niveau des capillaires et vaisseaux sanguins présents dans le labyrinthe, mais pas au niveau de ceux présents dans le spongiotrophoblaste (Hondermarck et al., en préparation). Cette distribution de la fixation du  $I^{125}$ -FGFb correspond exactement à la distribution des HS qui sont présents dans le labyrinthe mais pas dans le spongiotrophoblaste (Laurie,1985). La fixation du FGFb a également été décrite sur des coupes d'oeil de souris au cours du développement (Jeanny et al.,1987 ; Fayein et al.,1989). Comme dans notre cas, cette fixation apparaît héparinase sensible. Le Kd de l'interaction de ces structures "heparin-like" avec le FGFb (obtenu par saturation des coupes par du  $I^{125}$ -FGFb) est de 2,5 nM et correspond à la valeur que nous rapportons pour les HS du cerveau. Une fixation au niveau des éléments vasculaires n'a pas été décrite, cependant, contrairement au blastème de régénération, au placenta et au cerveau, l'oeil est une structure très peu vascularisée.

La fixation importante que nous observons au niveau des vaisseaux et capillaires est cohérente avec : 1) le fait que le FGFb, injecté dans la circulation sanguine est rapidement fixé par les éléments vasculaires (Hondermarck et al., 1990a) 2) la présence en quantité importante d'HS au niveau des éléments

vasculaires du cerveau (Schmidley et Blue, 1988 ; Lin, 1990) 3) le fait que les MEC de cellules endothéliales en culture fixent les FGFs par l'intermédiaire de structure héparinase sensible (Bashkin et al., 1989 ; Presta et al., 1989). Cette capacité de fixation du FGFb par les éléments vasculaires du cerveau laisse supposer une possibilité de stockage de ce facteur de croissance. Une production de FGFb par les cellules endothéliales et un stockage au niveau des MEC ont déjà été rapportés (Friesel et al., 1987 ; Vlodaysky, 1987), par ailleurs, ce FGFb sequestré peut être libéré sous une forme biologiquement active (Presta et al., 1989 ; Flaumenhaft et al., 1989). Dans le cerveau embryonnaire, une immunoréactivité anti-FGF a été détectée au niveau des capillaires sanguins (Thomas et al., 1990) et nos résultats laissent supposer qu'un stockage et une libération du FGF analogue à celle décrite *in vitro* pourrait exister au cours du développement du cerveau. Cependant, ce phénomène ne concerne probablement pas que les éléments vasculaires. En effet, nous observons une fixation spécifique du FGFb au niveau de l'ensemble du tissu nerveux, ce qui est en accord avec le fait que les neurones et les cellules gliales produisent des GAGs de type HS (revue dans Margolis et Margolis, 1989). Par ailleurs, il a été montré que le FGFb est actif sur la croissance des neurites lorsqu'il est ajouté à un milieu de culture contenant des neurones (Morrison et al., 1986 ; Walicke et al., 1988 ; Unsicker et al., 1987 ; Schubert et al., 1987) mais aussi lorsqu'il est fixé sur des structures de type HS présentes sur le support de culture des neurones (Walicke, 1986). Ces résultats suggèrent que les HS, fixant le FGFb, que nous avons isolés à partir du cerveau embryonnaire, pourraient être impliqués, en association avec le FGFb, dans les processus de croissance neuronale.

\*           \*

\*

## DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail, nous nous proposons d'aborder la signification biologique des FGFs au cours du développement du cerveau, en étudiant l'expression de sites de fixation spécifiques de ces facteurs de croissance.

Les résultats présentés dans le premier chapitre montrent que :

1) les synthèses d'ADN, dans le cerveau, diminuent au cours du développement. Une diminution particulièrement importante a été notée entre E7 et E10. Ces résultats sont retrouvés au niveau de chacune des vésicules de l'encéphale.

2) les quantités de neurotransmetteurs aminergiques dans le cerveau, augmentent au cours du développement. La quantité de noradrénaline s'accroît de façon importante entre E10 et E15, celle de dopamine entre E15 et P1 et celle d'adrénaline entre P1 et l'état adulte. Globalement, la quantité de catécholamines dans le cerveau triple entre E10 et E15. La quantité de sérotonine augmente 5 fois entre P1 et l'état adulte

3) l'activité mitogène présente dans un extrait brut de cerveau est constante à E7 et E10, triple entre E10 et E15 et se maintient ensuite relativement constante. La moitié de l'activité mitogène présente dans les extraits de cerveaux, à chacun des stades de développement, est retenue sur héparine-Sepharose et est éluée en présence de 1,3 M et 2 M NaCl, ce qui correspond, chez le poulet, aux molarités d'éluion respectives du FGF acide et du FGF basique (Risau, 1988). L'activité mitogène de chacune de ces fractions, tout comme le niveau d'immunoréactivité anti-FGFs présent dans le cerveau, double entre E10 et E15.

La diminution importante de synthèse d'ADN que nous observons dans le cerveau entre E7 et E10 est concomittante à l'arrêt de la multiplication des

neuroblastes dans le télencéphale (Tsai et al., 1981a) et est suivie entre E10 et E15 de l'augmentation du taux de neurotransmetteurs catécholaminergiques et du taux de FGFs. Ces résultats, qui montrent un arrêt de la prolifération des neuroblastes suivi d'une différenciation neuronale et d'une augmentation de la quantité de FGFs, suggèrent que ces facteurs de croissance pourraient être produits par les neurones. Cette hypothèse a déjà été formulée à partir d'observations immunocytochimiques au niveau du cerveau de rat (Pettmann et al., 1986) et de boeuf (Huang et al., 1987), après la naissance.

Les résultats présentés dans le second chapitre montrent :

1) la présence sur les membranes de cerveau, de sites de fixation spécifiques des FGFs acide et basique. Deux catégories de sites de fixation ont été identifiées. Les sites de fixation à haute affinité possèdent une constante de dissociation (Kd) de 100 pM pour le FGF acide et de 50 pM pour le FGF basique et semblent correspondre à des protéines membranaires de poids moléculaire 130 et 95 kDa. Les sites de fixation à basse affinité possèdent un Kd de 20 nM pour le FGF acide et de 10 nM pour le FGF basique et apparaissent héparinase sensibles. Les expériences de compétition croisée suggèrent que les FGF acide et basique interagissent au niveau des mêmes sites de fixation membranaires à haute et basse affinité. Le nombre de sites à haute affinité diminue deux fois entre E7 et E10, se maintient constant jusque P1 et diminue encore chez l'adulte. Le nombre de sites à basse affinité est trois fois plus élevé à P1 qu'aux autres stades étudiés.

2) l'expression, dans le cerveau, d'ARNm correspondant au gène Bek qui code pour un récepteur putatif des FGFs (Dionne et al., 1990). L'expression de ces ARNm diminue 5 fois entre E7 et E10, puis se maintient constante entre E10 et P1. La diminution de l'expression du gène Bek entre E7 et E10 est concomitante à la diminution du nombre de sites de fixation à haute affinité pour les FGFs. Ce résultat suggère que la diminution du nombre de sites récepteurs entre E7 et E10 correspond à la diminution de l'expression de(s) gène(s) codant pour ces récepteurs.

Cette diminution du nombre de sites de fixation à haute affinité et de

l'expression de Bek intervient, entre E7 et E10, au moment où la synthèse d'ADN dans le cerveau diminue considérablement, ce qui suggère que la perte de récepteurs aux FGFs s'accompagne d'une diminution de la prolifération cellulaire. Cette hypothèse est en accord a) avec le fait que dans le cerveau adulte, la prolifération cellulaire, tout comme le taux de récepteurs à haute affinité, sont à leur niveau le plus bas ; b) avec l'observation de la perte de récepteurs à haute affinité pour les FGFs au cours de la différenciation d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires (Olwin and Hauschka, 1988).

L'aptitude des sites de fixation à basse affinité des FGFs à perturber la détection des sites à haute affinité suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la régulation de l'interaction des FGFs avec leurs récepteurs à haute affinité.

Les résultats présentés dans le troisième chapitre montrent que les glycosaminoglycannes, de type héparane sulfate (de poids moléculaire 15 et 65 kDa) du cerveau embryonnaire :

- 1) fixent le FGFb ; la constante de dissociation observée du complexe héparane sulfate -FGFb est de 5 nM,
- 2) déplacent la fixation du FGFb au niveau des membranes du cerveau embryonnaire,
- 3) inhibent l'activité mitogène du FGFb,
- 4) sont détectés, au niveau de l'ensemble du tissu nerveux, mais de façon plus importante au niveau des éléments vasculaires.

Ces résultats suggèrent que les héparanes sulfates du cerveau qui fixent les FGFs pourraient être impliqués dans le stockage de ces facteurs de croissance, mais aussi dans la modulation de son activité biologique. Ainsi, les matrices extra-cellulaires, par l'intermédiaire de leurs héparanes sulfates, pourraient comme cela a déjà été montré *in vitro* (Vlodawsky et al., 1987 ; Friesel et al., 1988 ; Bashkin et al., 1989), piéger le FGF libre et contrôler son relargage au cours du développement du cerveau. De plus, nos résultats suggèrent que les héparanes sulfates présents au niveau des surfaces membranaires et qui correspondent aux sites de fixation à basse affinité des FGFs pourraient, par

compétition avec les récepteurs à haute affinité, moduler l'activité biologique des FGFs.

Il existerait ainsi deux niveaux de régulation de l'activité des FGFs par les héparanes sulfates : un niveau matriciel et un niveau membranaire.

D'autre part, les héparanes sulfates pourraient, en association avec les FGFs, être impliqués dans l'adhésion cellulaire et la croissance des neurites, comme le laissent supposer les résultats obtenus *in vitro* par différents auteurs (Schubert et al., 1987 ; Walicke, 1988).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que les FGFs interviennent au cours du développement du cerveau, par l'intermédiaire de leurs sites de fixation à haute et basse affinité et que la modulation de l'expression de ces sites de fixation régule l'activité des FGFs au cours du développement. L'action des FGFs, en accord avec les effets pléiotropiques de ces facteurs de croissance *in vitro*, pourrait concerner à la fois la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaires, mais aussi la croissance de neurites et l'angiogénèse.

Cependant, les données que nous avons obtenues concernent le cerveau dans son ensemble. Or, nous avons vu, notamment au travers des mesures de synthèse d'ADN, que les différentes parties du cerveau n'évoluent pas de façon homogène au cours du développement. Par ailleurs, le cerveau est constitué de nombreux types cellulaires susceptibles d'être la cible des FGFs. Il serait donc souhaitable :

- 1) d'affiner notre étude au niveau de chacune des vésicules de l'encéphale,
- 2) d'étudier les sites de fixation spécifiques des FGFs au niveau des différents types cellulaires du cerveau.

Cette étude pourra être menée :

a - *in situ*, par immunocytochimie à l'aide d'anticorps anti-récepteurs et d'anti-héparanes sulfates ainsi que par hybridation *in situ* à l'aide de la sonde moléculaire Bek dont nous avons montré l'expression dans le cerveau de poulet,

b - sur des cultures primaires de cellules provenant de cerveaux embryonnaires (neurones, cellules gliales et endothéliales), par utilisation des dosages radiorécepteurs et des sondes immunologiques et moléculaires

précédemment citées,

3) d'adopter une démarche expérimentale analogue à celle suivie dans le cas du NGF et basée sur l'injection dans le cerveau de FGFs ou d'anti-FGFs, d'anti-récepteurs aux FGFs, d'héparane sulfate ou d'anti-héparane sulfate.

Ces perspectives, outre leur intérêt sur le plan fondamental, ouvrent la voie à de possibles applications thérapeutiques dans le domaine des atteintes neuro-dégénératives.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrield KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986a) Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233:545-548
- Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Fiddes JC (1986c) Human basic fibroblast growth factor : nucleotide sequence, genomic organization, and expression in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:657-668
- Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986b) Human basic fibroblast growth factor : nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J* 5:2523-2528
- Aebischer P, Salessiotis AN, Winn SR (1989) Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. *J Neurosci Res* 23:282-289
- Aizenman Y and De Vellis J (1987) Brain neurons develop in a serum and glial free environment : Effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroïde hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res* 406 : 32-42
- Albert P, Courty J, Barritault D, Boilly B (1987) Stimulation in cell culture of mesenchymal cells of newt limb blastemas by EDGF I or II (basic or acidic FGF). *Cell Diff* 21:63-68
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335:353-354
- Anderson KJ, Dam D, Lee S, Cotman CW (1988) Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons *in vivo*. *Nature* 332:360-361
- Angeletti PU, Bradshaw RA (1971) Nerve growth factor from mouse submaxillary gland : aminoacid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 68 : 2417-2420
- Antonadies HN, Scher CD, Stiles CD (1979) Purification of human platelet - derived growth factor -. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1809-1813
- Aono H, Ide H (1988) A gradient of responsiveness to the growth promoting activity of ZPA (zone of polarizing activity) in the chick limb bud. *Dev Biol* 128:136-141
- Armelin HA (1973) Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2702-2706
- Assoian RK, Koomoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB (1983) Transforming growth factor  $\beta$  in human platelets. *J Biol Chem* 258:7155-7160
- Atterbury RR (1923). Development of the metanephric anlage of chick in allantoic grafts. *Am. J. Anat.* 31 : 409-436.
- Auerbach RL, Kubai L and Sidky Y (1976). Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. *Cancer. Res.* 36 : 3435-3440.

- Avola R, Condorelli DF, Surrentino L, Turpeenoja A, Costa A, Giuffrida Stella (1988) Effect of epidermal growth factor, and insulin on DNA, RNA, and cytoskeletal protein labelling in primary rat astroglial cell cultures. *J Neurosci Res* 19 : 230-238
- Baird A, Böhlen P (1989) Fibroblast growth factors. In growth factors and their receptors I. Edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag 369-418
- Baird A, Esch F, Böhlen P, Ling N, 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, Esch F, Gospodarowicz D, 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, Ling N (1987) Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells *in vitro* : implication for a role heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem Biophys Res Commun* 142:428-435
- Baird A, Mormede P, Ying SY, Wehrenberg WB, Ueno N, Ling N, Guillemin R (1985e) 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, Guillemin R (1988) Receptor and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2324-2328
- Baldin V, Roman AM, Bosc Bierre I, Amalric F, Bouché G (1990) Translocation of bFGF to the nucleus G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *Embo J* 9:1511-1517
- Barbin G, Manthorpe M and Varon S (1984) Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. *J Neurochem* 43 : 1468-1478
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1 : 549-553
- Barotte C, Esclander F, Ebel A, Labourdette G, Sensenbrenner M, 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
- Barritault D, Arruti C, Courtois Y (1981) Is there a ubiquitous growth factor in the eye ? Proliferation induced in different cell types by eye-derived growth factor. *Differentiation* 18:29-42
- Barritault D, Bizbiz L, Moulin V, Gil Diez De Medina S, Leandry J, Loisance D, Jozefonwicz J, Courty J, Caruelle JP (1990) Substituted dextrans and heparin binding growth factors in deep skin wound healing. European conference on tissue and post-traumatic regeneration, Geneva

- Barr PJ, Cousens LS, Lee-Ng CT, Medina-Selby A, Masiarz FR, Hallewell RA, Chamberlain S, Bradley J, Ledd D, Steimer KS, Poulter L, Burlingame AL, Esch F, Baird A (1988) Expression and processing of biologically active fibroblast growth factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263:16471-16478
- Barzu T, Lormeau JC, Petitou M, Michelson S, Choay J (1989) Heparin-derived oligosaccharides affinity for acidic fibroblast growth factor and effect on its growth promoting activity for human endothelial cells. *J Cell Physiol* 140:538-548
- Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I (1989) Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extra cellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochem* 28:1737-1743
- Bellvé AP, Feige LA (1984) Cell proliferation in the mammalian testis : biology of the seminiferous growth factor (SGF). *Recent Prog Horm Res* 40:531-567
- Bensaïd M, Malecuze F, Bayard F, Tauber JP (1989) Opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor - $\beta$  on the proliferation of cultured bovine retinal capillary endothelial (BREC) cells. *Exp Eye Res* 48:790-791
- Bhat N (1983) Insulin dependent neurite outgrowth in cultured embryonic mouse brain cells. *Dev Brain Res* 11 : 315-318
- Bikfalvi A, Dupuy E, Inyanga L, Fayein N, Leseche G, Courtois Y, Tobelem G (1989) Binding, internalization and degradation of basic fibroblast growth factor in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 181:75-84
- Blam SB, Mitchell R, Fischer F, Rubin JS, Silvan M, Silver S, Fiddes JC, Abraham JA, Aaronson SA (1988) Addition of growth hormone secretion signal to basic fibroblast growth factor results in cell transformation and secretion of aberrant forms of the protein. *Oncogene* 3:129-136
- Blanckaert V, Bécuwe P, Hondermarck H, Boilly-Marer Y (1990) Evidence of heparin binding growth factors in the proliferative zone of marine annelids. European conference on tissue and post-traumatic regeneration. Geneva.
- Blanquet PR, Paillard S, Courtois Y (1988) Influence of fibroblast growth factor on phosphorylation and activity of a 34kD lipocortin-like protein in bovine epithelial lens. *FEBS Lett* 229:183-187
- Blanquet PR, Patte C, Fayein N, Courtois Y (1989) Identification and isolation from bovine epithelial lens cells of two basic fibroblast growth factor receptors that possess bFGF enhanced phosphorylation activities. *Biochem Biophys Res Commun* 160:1124-1131
- Böhlen P, Baird A, Esch F, 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, Gospodarowicz D (1984) Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5364-5368

- Boilly B, Cavanaugh K, Thomas D, Hondermarck H, Bradshaw RA (1990) Acidic fibroblast growth factor is present in regenerating limb of Axolotl. Congrès S.B.C.F. Paris.
- Boilly B, Cavanaugh K, Thomas D, Hondermarck H, Bradshaw RA. Acidic fibroblast growth factor is present in regenerating limb of Axolotl and binds specifically to blastema tissues. Accepted in *Developmental Biology*.
- Bouché G, Gas N, Prats H, Balsin V, Tauber JP, Teissié J, Amalric F (1987) bFGF enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0-G1 transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6770-6774
- Brown JP, Twardzik DR, Marquardt H, Todaro GJ (1985) Vaccinia virus encodes a polypeptides homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature* 313:491-492
- Brunk CF, Jones KC, James W (1979). Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Biochem.* 92 : 497-500.
- Buntrock P, Buntrock M, Marx I, Kranz D, Jentzsch KD, Heder G (1984) Stimulation of wound healing, using brain extract with fibroblast growth factor activity. III. Electron microscopy, autoradiography, and ultrastructural autoradiography of granulation tissue. *Exp Pathol* 26:247-254
- Burgess AN (1989) Granulocyte - Macrophage colony-stimulating factor, in *Growth factor and their receptors I*, edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 723-745
- Burgess AW, Wilson EMA, Metcalf D (1977) Purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung- conditioned medium- *J Biol Chem* 252 : 1978-2003
- Burkat T, Wiesmann T (1987) Sulfated glycosaminoglycans (GAG) in the developing mouse brain. *Dev Biol* 120:447-456
- Caday CG, Klagsbrun M, Fanning PJ, Armineh Mirzabegian and Finklestein SP (1990) Fibroblast growth factor (FGF) levels in the developing rat brain. *Dev Brain Res* 52 : 241-246
- Canalis E, Lorenzo J, Burgess WH, Maciag T (1987) Effects of endothelial cell growth factor on bone remodelling *in vitro*. *J Clin Invest* 79:52-58
- Casscells W, Speir E, Allen P, Epstein S (1988) Heparin treatment of ischemia reduces infarct-5 and mortality of subsequent coronary ligation. *Clin Res* 36:266A
- Cavanaugh JB (1970) The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J Anat* 106:471-487
- Chambard JC, Paris S, L'Allemain G, Pouyssegur J (1987) Two growth factors signalling pathways in fibroblasts distinguished by pertussis toxin. *Nature* 326:800-803
- Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang MLS, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massague J (1987) The transforming growth factor  $\beta$  system, a complex pattern of cross reactive ligands and receptors. *Cell* 48:409-415

- Chodak GW, Shing Y, Borge M, Judge SM, 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
- Chua CC, Barritault D, Geiman DE, Ladda RL (1987) Induction and suppression of type I collagenase in cultured human cells. *Coll Relat Res* 7:277-284
- Clarke PGH and Cowan (1976) The development of the isthmo-optic tract in the chick, with special reference to the occurrence and correction of developmental errors in the localisation and connections of isthmo-optic neurons. *J Comp Neurol* 167 : 143-164
- Clegg CH, Linkhart TA, Olwin BB, Hauschka SD (1987) Growth factor control of skeletal muscle differentiation : commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 105:949-956
- Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J. Biol. Chem.* 237: 1555-1562
- Conn G, Hatcher VB (1984) The isolation and purification of two anionic endothelial cell growth factors from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 124:262-268
- Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R (1989) Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration *in vivo*. *Plast Reconstr Surg* 83:1013-1019
- Coughlin SR, Barr PJ, Cousens LS, Fretto LJ, Williams LT (1988) Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity *in vivo*. *J Biol Chem* 263:988-993
- Courtin F, Gavaret JM, Toru-Delbauffe D, Pierre M (1990) Introduction of 5-derodinase 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, 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 MC, Méreau A, Badet J, 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
- Coussens L, Van Beveren C, Smith D, Chen E , Mitchell RL, Isacke CM, Verma IM, Ulrich A (1986) Structural alteration of viral homologue of receptor protooncogene fms at carboxyl terminus. *Nature* 320:277-280
- Cowan WM and Clarke PGH (1976) The development of the isthmo-optic nucleus. *Brain Behav Evol* 13 : 345-375

- Cowan WM and Wenger E (1968a) The development of the nucleus of origin of centrifugal fibers to the retina in the chick. *J Comp Neurol* 133 : 207-239
- Crawford RJ, Hudson P, Shine J, Niall HD, Eddy RL, and Shows TB (1984) Two human relaxin genes are on chromosome 9. *EMBO J* 3 : 2341-2345
- Cuevas P, Baird A, Guillemin R (1988c) Angiogenic response to fibroblast growth factor in the rat brain *in vivo*. In : Gagliardi R, Benvenuti L (eds) *Controversies in ELAB for cerebral ischemia*. Monduzzi, Florence, pp 731-737
- Cuevas P, Burgos J, Baird A (1988a) Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 156:611-618
- Cuny R, Jeanny JC, Courtois Y (1986) Lens regeneration from cultured newt irises stimulated by retina-derived growth factors. *Differentiation* 32-221-229
- D'Amore P, Klagsbrun M (1984) Endothelial cell mitogens derived from retina and hypothalamus : biochemical and biological similarities. *J Cell Biol* 99:1545-1549
- Damon DH, D'Amore PA, Wagner A (1990) Nerve growth factor and fibroblast growth factor regulate neurite outgrowth and gene expression in PC12 cells via both protein kinase C - and cAMP- independent mechanisms. *J Cell Biol* 110:1333-1339
- Danielsen N, Pettmann B, Vahlsing HL, Manthorpe M, Varon S (1988) Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res* 20:320-330
- Dauchel MC, Courty J, Mereau A and Barritault D (1989) Modulation of mitogenic activity and cellular binding of basic Fibroblast growth factor by basic proteins. *J Cell Biochem* 39:411-420
- Davidson JM, Klagsbrun M, Hill KE, Buckley A, Sullivan R, Brewer PS, Woodward S (1985) Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J Cell Biol* 100:1219-1227
- Davies AM, Thoenen H, and Bard YA (1986) The response of chick sensory neurons to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 6:1897-1904
- Delli Bovi P, Curatola AM, Kern FG, Greco A, Ittman M, 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* 50:729-737
- Delorme P (1971) Etude ultrastructurale du développement des capillaires, de leur environnement et des modifications de leur perméabilité à la peroxydase du Raifort dans le télencéphale du poulet au cours de l'embryogenèse et de la croissance postnatale. Thèse Université de Nancy I.
- DiCicco-Bloom E and Black I (1988) Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4066-4070
- Dickson C, Peters G (1987) Potential oncogene product related to growth factors. *Nature* 326:833

- Dijke P and Iwata KK (1989) Growth factors for wound healing. *Bio/Technology* 7:793-798
- DiMario J, Buffinger N, Yamada S, Strohman RC (1989) fibroblast growth factor in extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Sciences* 244:688-690
- Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, 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
- Disorbo D, Shi EG, and Mc Keehan WL (1988) Purification from human hepatoma cells of a 130 kDa membrane glycoprotein with properties of the heparin-binding growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 1007-1014
- Dreyer D, Lagrande A, Grothe C, Unsicker K (1989) Basic fibroblast growth factor prevents ontogenic neuron death *in vivo*. *Neurosc Letters* 99:35-38
- Eccleston PA, Silverberg DH (1985) Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes *in vitro*. *Dev Brain Res* 21:315-318
- Eppley BL, Doucet M, Connolly DT, Feder J (1988) Enhancement of angiogenesis of bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* 46:391-398
- Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Böhlen P, 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
- Hevor TK, Bernet F and Delorme P (1988) Catecholamine and indoleamine levels in chick cultured neurons and embryonic brain. *Neurochem Res* 13:823-827
- Fausser B, Baird A, Hsueh A (1988) Fibroblast growth factor inhibits luteinizing hormone-stimulated androgen production by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 123:2935-2941
- Fayein NA, Courtois Y, Jeanny JC (1990) Ontogeny of basic fibroblast growth factor binding sites in mouse ocular tissues. *Exp Cell Res* 188:75-88
- Feige JJ, Baird A (1988a) Phosphorylation of basic FGF:A new substrate for protein kinase C (Abstract). *Endocrinology* 122:1237A
- Feige JJ, Baird A (1988b) Glycosylation of the basic fibroblast growth factor receptor. The contribution of carbohydrate to receptor function. *J Biol Chem* 263:14023-14029
- Feige JJ, Baird A (1989b) Basic fibroblast growth factor is a substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3174-3178
- Feige JJ, Bradley JD, Fryburg K, Farris J, Cousens LC, Barr PJ, Baird A (1989a) Differential effects of heparin, fibronectin, and laminin on the phosphorylation of basic fibroblast growth factor by protein kinase C and the catalytic subunit of protein kinase A. *J Cell Biol* 109:3105-3114

- Ferning DG, Smith JA, Rudlano PS (1990) Appearance of basic fibroblast growth factor receptors upon differentiation of rat mammary epithelial to myo epithelial-like cells in culture. *J Cell Physiol* 142:108-116
- Flamm SL, Wellstein A, Lupu R, Kern F, Lippman ME and Gelmann EP (1989). Expression of fibroblast growth factor peptides in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Proceeding of the American association for Cancer research* 30 : 71.
- Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O, Rifkin DB (1989) Role of the extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor : matrix as a source of growth factor for longterm stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J Cell Physiol* 140:75-81
- Folkman J (1972). Antiangiogenesis : new concept for therapy. *Ann Surg.* 175 : 409-416.
- Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski MG, Ingber D, Vlodavsky I (1988) A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor-is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 130:393-400
- Fourtanier AY, Courty J, Müller E, Courtois Y, Prunieras M, Barritault D (1986) Eye- derived growth factor isolated from bovine retina and used for epidermal wound healing *in vivo*. *J Invest Dermatol* 87:76-80
- Friesel R, and Maciag T (1988) Internalization and degradation of heparin binding growth factor by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 151: 957-964
- Friesel R, Burgess WH, Maciag T (1989) Heparin binding growth factor 1 stimulate tyrosine phosphorylation in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 9:1857-1865
- Friesel R, Burgess WH, Mehlman T, Maciag T (1986) The characterization of the receptor for the endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. *J Biol Chem* 261:7581-7584
- Friesel R, Komoriya A and Maciag T (1987) Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma interferon. *J. Cell. Biol.* 689 104:689-696
- Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB (1983) Purification and partial characterisation of a type  $\beta$  transforming growth factor from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:33676-3680
- Gajdusek CM, Cardon S (1989) Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol* 139:570-579
- Gallagher JT, Lyon M, Steward WP (1986) Structure and function of heparan sulfate proteoglycans. *Biochem J* 236:313-325
- Gambarini AG, Armelin HA (1982) Purification and partial characterization of an acidic fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 257:9692-9697
- Gautschi-Sova P, Frater-Schroeder M, Jiang ZP, 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, Böhlen P (1986) Amino acid sequence of human acidic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 140:874-880
- Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M (1987) Brain basic fibroblast growth factor stimulate the proliferation of rat neuronal precursor cells *in vitro*. *FEBS Lett* 217:1-5
- Gillespie LL, Paterno GGD, Slack JMW (1989) Analysis of competence : receptors for fibroblast growth factor in early *Xenopus* embryo. *Development* 106:203-208
- Gimenez-Gallego G, Conn G, Hatcher VB, Thomas KA (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 VB, Thomas KA (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, Thomas KA (1985) Brains-derived acidic fibroblast growth factor : complete amino acid sequence and homologies. *Science* 230:1385-1388
- Globus RK, Patterson-Buckendahl P, Gospodarowicz D (1988) Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factors. *Endocrinology* 123:98-105
- Goldwasser E, Beru N, and Smith D (1989) Erythropoietin the primary regulator of red cells formation. in *Peptide growth factors and their receptors I*, edited by Sporn MB and Roberts AB 747-770
- Gonzalez AM, Buscaglia M, Ony M, Baird A (1990) Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus : localization in the basement membranes of divers tissues. *J Cell Biol* 110:753-765
- Gordon PB, Choi HU, Lonn G, Ahmeda, Ehrmann B, Rosenberg L, Hatcher VB (1989) Extracellular matrix heparan sulfate protéoglycans modulate the mitogenic capacity of acidic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 140:584-592
- Gospodarowicz D (1974) Localization of a fibroblast growth factor and its effects alone and with hydrocortisone on 3T3 cells growth. *Nature* 249:123-127
- 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 GM, Esch F, Böhlen P (1986b) Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland : physicochemical and biological characterization. *Endocrinology* 118:82-90
- Gospodarowicz D, Bialecki H, Thakral TK, (1979) The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 28:501-514

- Gospodarowicz D, Cheng J (1986) Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 128:475-484
- Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, 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 GM, Baird A, Esch F, Böhlen P (1985) Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 117:2383-2391
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factors. *Endocrinol Rev* 8(2):95-114
- Gospodarowicz D, Greenburg G (1979) The effects of epidermal and fibroblast growth factors on the repair of corneal endothelial wounds in bovine corneas maintained in organ culture. *Exp Eye Res* 28:147-157
- Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Lui GM, Böhlen P (1985b) Isolation of (bovine) pituitary fibroblast growth factor purified by fast protein liquid chromatography (FPLC): partial chemical and biological characterization. *J Cell Physiol* 122:323-332
- Gospodarowicz D, Mescher AL (1981) Fibroblast growth factor and vertebrate regeneration. In: Riccardi VM, Mulvihill JJ (eds) *Advances in neurology: neurofibromatosis*. Raven, New York, pp 149-171
- Gospodarowicz D, Vlodavsky I, Savion N, Tauber JP (1980) Control of the proliferation and differentiation of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor. In: Bloom F (ed) *Peptides: integrators of cell and tissue function*. Raven, New York, pp 1-37
- Gray A, Dull TJ, Ulrich A (1983) Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128 000 - molecular weight protein precursor. *Nature* 303:722-725
- Gregory H (1975) Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257:325-327
- Halaban R, Ghosh S, Baird A (1987) bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 23:47-52
- Halaban R, Kwon B, Ghosh S, Delli Bovi P, Baird A (1988) bFGF as an autocrine growth factor in human melanomas. *Mol Cell Biol* 8:2933-2941
- Halperin JA, Lobb RR (1987) Effect of heparin-binding growth factors on monovalent cation transport in Balb/C 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 144:115-122
- Hamburger V (1975) Cell death in the development of lateral motor column of the chick embryo. *J Comp Neurol* 160 : 535-546
- Hanaway J (1967) Formation and differentiation of the external granular layer of the chick cerebellum. *J Comp Neurol* 131 : 1-14
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family conserved feature and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-51

- Harper JW, Cobb RR (1988) Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor : effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry* 27 : 671-678.
- Harper JW, Strydom DJ, Lobb RR (1986) Human class I heparin-binding growth factor : structure and homology to bovine acidic brain fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 138:611-617
- Hassel JR, Ley Shon WC, Ledbetter SR, Tyree B, Suzuki S, Kato M, Kimata K, Kleinman HK (1985) Isolation of two forms of basement membrane proteoglycans. *J Biol Chem* 260:8098-8105
- Hatakeyama M, Taniguchi T (1989) Interleukin II. In growth factors and their receptors I. Edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 523-540
- Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman S, Klagsbrun M (1986) Growth factors in bone matrix Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261:12665-12674
- Hayek A, Culler FL, Beattie GM, Lopez AD, Cuevas P, Baird A (1987) An *in vivo* model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 147:876-880
- Herman IM, D'Amore P (1984) Capillary endothelial cell migration : loss of stress fibres in response to retina-derived growth factor. *J Muscle Res Cell Motil* 5:697-709
- Hirano T, Kishimoto T (1989) Interleukin 6, In growth factors and their receptors I. Edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 633-665
- Hoffer MM and Barde YA (1988) Brain derived neurotrophic factor prevents neuronal death *in vivo*. *Nature* 331 : 261-262
- Hoffman RS (1940) The growth-activating effect of extracts of adult and embryonic tissues of the rat on fibroblast colonies in culture. *Growth* 4:361-376
- Hondermarck H, Boilly B (1990) Characterization of fibroblast growth factor binding in regenerating limb blastemas of axolotl. European conference on tissue and post-traumatic regeneration. Geneva.
- Hondermarck H, Boilly B. Autoradiographic localization of basic fibroblast growth factor binding sites in mouse placenta. In preparation.
- Hondermarck H, Courty J, Boilly B, Thomas D (1990a) Distribution of intravenously administered acidic and basic fibroblast growth factors in the mouse. *Experientia* 46:973-974
- Hondermarck H, Courty J, Boilly B, Thomas D (1990c) Pharmacokinetics of intravenously administered acidic and basic fibroblast growth factor in the mouse. Congrès S.B.C.F. Paris.
- Hondermarck H, Courty J, Dauchel MC, Barritault D, Boilly B. Developmental regulation of acidic fibroblast growth factor receptors in chick brain. Submitted to developmental brain research

- Hondermarck H, Courty J, Ledoux D, Blanckaert V, Barritault D, Boilly B (1990b) Evidence of high and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factors in mouse placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 169:272-281
- Hondermarck H, Courty J, Ledoux D, Blanckaert V, Barritault D, Boilly B (1990d). Is placenta growth regulated by high and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor ? Congrès Société de Biologie Cellulaire de France (S.B.C.F.) Paris.
- Hondermarck H, Peyrat JP, Bonnetterre J, Louchez MM, Adenis A, Boilly B, Lefebvre J, Demaille A (1990e) Récepteurs du FGF (fibroblast growth factor) dans les cancer du sein humains. XIIe journées de la Société Française de sénologie et de pathologie mammaire. Paris.
- Honjo T, Takatsu K (1989) Interleukin V, in growth factors and their receptors I, edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 609-632
- Huang SS, Huang JS (1986) Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 261:9568-9571
- Huang SS, Tsai CC, Adams SP, Huang JS (1987) Neuron localization and neuroblastoma cell expression of brain-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 144:81-87
- Huettner (1968). Comparative embryology of the vertebrate. The Mac Millan Company. New York.
- Ihle JN (1989) Interleukin 3. In growth factors and their receptors I. Edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 541-575
- Imamura T, Yoshihito T and mitsui Y (1988) Purification of bFGF receptors from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 155 : 583-590
- Jacobson M (1978) Developmental neurobiology. Plenum Press. NewYork and London
- James R, Bradshaw RA (1984) Polypeptide growth factors. *Annu Rev Biochem* 53:259-292
- Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Maciag T, Drohan WN (1986) Human endothelial cell growth factor : cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 233:541-545
- Jeanny JC, Fayein N, Moenner M, Chevallier B, Barritault D, Courtois Y (1987) Specific fixation of bovine brain and retinal acidic and basic fibroblast growth factors to mouse embryonic eye basement membranes. *Exp Cell Res* 171:63-75
- Jenkins HG, Bachelard HS (1988) Developmental and age related changes in rat brain glycosaminoglycans. *J Neurochem* 51 : 1634-1640
- Jentsch KD, Wellnitz G, Heder G, Petzold E, Buntrock P, Oehme P (1980) A bovine brain fraction with fibroblast growth factor activity inducing articular cartilage regeneration *in vivo* . *Acta Biol Med Ger* 39:967-971
- Johnson JE, Barde A, Schwab M and Thoenen H (1986) Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglia cells. *J Neurosci* 6 : 3031-3038

- Kalcheim C, Neufeld G (1990) Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early chick embryo. *Development* 109:203-215
- Kan M, Disorbo D, Hou J, Hashi Hyroyoshi, Mansson PE, Mc Keehan W (1988) High and low affinity binding of heparin-binding growth factor to a 130 kDa receptor correlates with stimulation and inhibition of growth of a differentiated human hepatoma cell. *J Biol Chem* 263:11306-11313
- Kan M, Huang J, Mansson PE, Yasumitsu H, Carr B, Mc Keehan WL (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, Strohman RC (1985) Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8044-8047
- Kato Y, Gospodarowicz D (1985) Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in presence of fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 100:477-485
- Kiang WL, Crockett CP, Margolis RK, Margolis RU (1987) Glycosaminoglycans and glycoproteins associated with microsomal subfractions of brain. *Biochemistry* 17:3841-3848
- Kiefer MC, Stephans JC, Crawford K, Okino K, Barr PJ Ligand affinity cloning and structure of a heparan sulfate proteoglycan receptor for fibroblast growth factor. *Science*, in press
- Kimelman D, Abraham JA, Haaparanta T, Palisi TM, Kirschner MW (1988) The presence of fibroblast growth factor in the frog egg : its role as a natural mesoderm inducer. *Science* 242:1053-1056
- Kimelman D, Kirschner M (1987) Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* 51:869-877
- Kingler M, Margolis RU, Margolis R (1985) Isolation and characterization of the heparan sulfate proteoglycans of brain. *J Biol Chem* 260:4082-4090
- Klagsbrun M, Beckoff MC (1980) Purification of cartilage-derived growth factor. *J Biol Chem* 255:10859-10866
- Klagsbrun M, Sasse J, Sullivan R, Smith JA (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
- Kolkman J, Klagsbrun (1987) Angiogenic factors. *Science* 235:442-447
- Kornbluth S, Pautson KE, Hanafusa (1988) Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. *Mol Cell Biol* 8:5541-5544
- Korr H (1980) Proliferation of different cell types in the brain, advances in anatomy embryology and cell biology, vol 61, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Kyriakis JM, Hausman RE and Peterson (1987) Insulin stimulates choline acetyl transferase activity in cultured embryonic chicken retina neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*

- Lassalle B (1983) Synthèse d'ADN dans les blastèmes de régénération de Pleurodèles *Waltlii* (Amphibien Urodèle) en culture *in vitro*. Conditions de culture. *Biol Cell* 47:187-192
- Lathrop B, Olson E, Glaser L (1985b) Control by fibroblast growth factor of differentiation in the BC3H1 muscle cell line. *J Cell Biol* 100:1540-1547
- Lathrop B, Thomas K, Glaser L (1985a) Control of myogenic differentiation by fibroblast growth factor is mediated by position in the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 101:2194-2198
- Ledoux D, Méreau A, Dauchet MC, Barritault D, Courty J (1989) Distribution of basic fibroblast growth factor binding sites in various tissues membrane preparations from adult guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 159:290-296
- Ledoux D, Méreau A, Barritault D and Courty J (1990) High and low affinity binding sites for acidic fibroblast growth factor (aFGF) in various tissues membrane preparations from adult guinea pig. Evidence for common binding sites with basic FGF. Congrès SFBC, Paris
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT (1989) Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245 : 57-60
- Lenoir D and Honegger P (1983) Insulin-like growth factor I (IGFI) stimulates DNA synthesis in fetal rat brain cell cultures. *Dev Brain Res* 7 : 205-213
- Levi-Montalcini R, Aloe L, Johnson EMJr (1973) : Interaction between the nerve growth factor (NGF), guanethidine and 6-hydroxydopamine in sympathetic neurons. In : *Frontiers in catecholamine research (III International catecholamine Symposium, Université de Strasbourg, 1973)* Udsin E and Sydner SH, eds New York : Pergamon Press 267-276
- Levi-Montalcini R and Booker B (1960a) Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 42 : 373-384
- Levi-Montalcini R and Booker B (1960b) Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to the nerve-growth promoting factor *Proc Natl Acad Sci USA* 42 : 384-391
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1963) Essential role of the nerve growth factor in the survival and the maintenance of dissociated sensory and sympathetic nerve cells *in vitro*. *Dev Biol* 7 : 655-659
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1968) Nerve growth factor. *Physiol Rev* 48 : 534-569
- Libermann TA, Friesel R, Jaye M, Lyall RM, Westermarck B, Drohan W, Schmidt A, Maciag T, Schlessinger J (1987) An angiogenic growth factor is expressed in human glioma cells. *EMBO J* 6:1627-1632
- Linder V, Majack RA, Reidy MA (1990) Basic fibroblast growth factor stimulate endothelial regeneration and proliferation in directed arteries. *The American Society for Clinical investigation* 85:2004-2008
- Linker A and Sampson P (1960). The enzymatic degradation of heparin sulfates *Biochem. Biophys. Acta.* 43 : 366-368.

- Lin WL (1990) Immunogold localization of basal laminar heparan sulfate proteoglycan in rat brain and retinal capillaries. *Brain Res Bull* 24:533-536
- Lipton SA, Wagner JA, Madison RD, D'Amore PA (1988) Acidic fibroblast growth factor enhances regeneration of processes by postnatal retinal ganglion cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2388-2392
- Liu L, Nicoll CS (1988) Evidence for a role of basic fibroblast growth factor in rat embryonic growth and differentiation. *Endocrinology* 123:2027-2031
- Lobb RR, Alderman ER, Fett JW (1985) Induction of angiogenesis by bovine brain-derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry* 24:4969-4973
- Lobb RR, Fett JW (1984) Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry* 23:6295-6299
- Lobb RR, Sasse J, Sullivan R, Shing Y, D'Amore P, Jacobs J, Klagsbrun M (1986) Purification and characterization of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J Biol Chem* 261:1924-1928
- Maciag T, Hoover GA, Weinstein R (1982) High and low molecular weight forms of endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 257:5333-5336
- Magnaldo I, L'Allemain G, Chambard JC, Moenner M, Barritault D, 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
- Makris A, Ryan KJ, Yasumizu T, Hill CL, Zetter BR. (1984). The porcine ovary as a source of angiogenic activity. *Endocrinology* 115 : 1672-1677.
- Makris A, Ryan KJ, Yasumizu T, Hill CL, Zetter BR (1984) The nonluteal porcine ovary as a source angiogenic activity. *Endocrinology* 115:1672-1677
- Mansson PE, Adams P, Kan M, and Wallace L Mc Keehan (1989) Heparin-binding growth factor gene expression and receptors characteristics in normal rat prostate and two transplanted rat prostate tumors. *Cancer Res* 49:2485-2494
- Mansukhani A, Moscatelli D, Talarico D, Levytska V, 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
- Manthorpe M, Skaper DS, Williams LR and Varon S (1986) Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor. *Brain Res* 367:282-286
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronhein SR, Grabstein K, Colon PJ, Hopp TJ, Gosman D (1985) Cloning sequences and expression of two distinct human interleukin I complementary DNA's. *Nature* 315:641-647
- Margolis RU, Margolis RK (1989) Nervous tissue proteoglycans. *Dev Neurosci* 11:276-288
- Margolis RU, Margolis RK, Chang LB, Preti C (1975) Glycosaminoglycans of brain during development. *14:85-88*

- Marics I, Adelaide J, Raybaud F, Mattei MG, Coulier F, Planche J, De Lapeyriere O, Birnbaum D (1989) Characterization of the HST-related FGF6 gene, a new member of the fibroblast growth factor gene family. *Oncogene* 4:335-340
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ (1984) Rat transforming growth factor type I : Structure and relation to epidermal growth factor. *Sciences* 223:1079-1082
- Martelli I and Gautron J (1988) Differential expression of acetylcholine esterase molecular forms in neural retina and retinal pigmented epithelium during chick development. *Brain Res* 460:205-213.
- Mascarelli F, Raulais D, Counis MF, 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
- Mascarelli F, Raulais D, Courtois Y (1989) Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J* 8:2265-2273
- Mason AJ, Hay Flick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY, Guillemin R, Niall H, Seeburg PH (1985) Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor  $\beta$ . *Nature* 318:659-663
- Matsuo Y, Nishi N, Matsui S, Sansberg A, Isaacs JT, Wada F (1987) Heparin binding affinity of rat prostatic growth factor in normal and cancerous prostates : partial purification and characterization of rat prostatic growth factor in Dunning tumor. *Cancer Res* 47:188-192
- Mc Keehan WL, Crabb JW (1987) Isolation and characterization of different molecular and chromatographic forms of heparin-binding growth factor 1 from bovine brain. *Anal Biochem* 164:563-569
- Méreau A, Pieri I, Gamby C, Courty J, and Barritault D (1989) Purification of basic fibroblast growth factor receptors from bovine brain. *Biochimie* 71:865-871
- Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, Shows TB (1986) The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 138:644-651
- Mescher AL, Loh JJ (1980) Newt forelimb regeneration of blastemas *in vitro*. Cellular response to explantation and effects of various growth-promoting substances. *J Exp Zool* 216:235-245
- Miguatti P, Tsubai R, Robbins E, Rifkin DB (1989) *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane : requires for basic fibroblast growth factor induced proteinases. *J Cell Biol* 108:671-682
- Mill JF, Chao MV and Ishii DN (1985) Insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7126-7130
- Mioh H, Cheng JK (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, Shohat H, 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, 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, Barritault D (1986) Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor, on bovine epithelial lens cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5024-5028
- Moenner M, Gannoun-Zaki L, Badet J, Barritault D (1989) Internalization and limited processing of basic fibroblast growth factor on chinese hamster lung fibroblast. *Growth factors* 1:115-123
- Moenner M, Magnaldo I, L'Allemain G, Barritault D, Pouyssegur J (1987) Early and late mitogenic events induced by FGF on bovine epithelial lens cells are not triggered by hydrolysis of phosphoinositides. *Biochem Biophys Res Commun* 146:32-40
- Montesano R, Vasalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7297-7301
- Mormède P, Baird A (1988) Estrogens, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, and phorbol esters modulate the prolactin response of GH3 cells to basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 122:2265-2271
- Morrison RS, De Vellis J (1981) Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7205-7209
- Morrison RS, De Vellis J, Lee YL, Bradshaw R, Eng LF (1985) Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes. *J Neurosci Res* 14:167-176
- Morrison RS, Keating RF, Moskal JR (1988) Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor exert differential trophic effects on CNS neurons. *J Neurosci Res* 21:71-79
- Morrison RS, Kornblum HI, Leslie FM, Bradshaw RA (1987) Trophic stimulation of cultured neurons from neonatal rat brain by epidermal growth factor. *Science* 238:72-75
- Morrison RS, Sharma A, De Vellis J, Bradshaw RA (1986) Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7537-7541
- Morrison RS, Gross JL, Herdin WF, Reilly TM, Lasale PA, Alterman RL, Moskal JR, Kornblum PL, Dexter DL (1990) Basic fibroblast growth factor - like activity and receptors are expressed in human glioma cell lines. *Canc Res* 50:2524-2529

- Moscatelli D (1987a) 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, Rifkin DB (1987b) 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, Rifkin DB (1986) Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 129:273-276
- Moscat J, Moreno F, Herrero C, Lopez C, Garcia-Barreno P (1988) Endothelial cell growth factor and ionophore A23187 stimulation of production of inositol phosphates in porcine aorta endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:659-663
- Mueller SN, Thomas KA, Di Salvo J, Levine EM (1989) Stabilization by heparin of acidic fibroblast growth factor mitogenicity for human endothelial cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 140:439-448
- Müller G, Courty J, Clerc B and Barritault D (1985) Utilisation du facteur de croissance dérivé de l'oeil dans le traitement des ulcères de cornée. *J Fr Ophtalmol* 8:187-192
- Munaim S, Klagsbrun M, Toole BP (1988) Developmental changes in fibroblast growth factor in the chicken embryo limb bud. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8091-8093
- Munson PJ and Rodbard D (1980). Ligand a versatile computerized approach for characterization of Ligand binding systems *Anal. Biochem.* 107 : 220-239.
- Nagata S (1989) Granulocyte colony - stimulating factor - in growth factor and their receptors I, Sporn MB, Roberts AB, Springer-Verlag 699-722
- Nanberg E, Morris C, Higgins T, Vara F, Rozengurt E (1990) Fibroblast growth factor stimulates protein kinase C in quiescent 3T3 cells without  $Ca^{2+}$  mobilization or inositide phosphate accumulation. *J Cell Physiol* 143:232-242
- Neufeld G, Gospodarowicz D (1985) The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptors of baby hamster kidney cells. *J Biol Chem* 260:13860-13868
- Neufeld G, Gospodarowicz D (1986) Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J Biol Chem* 261:5637-5637
- Nilson J, Thyberg J, Heldin CH, Wasteson A, Westermark B (1983) Surface binding and internalization of platelet derived growth factor in human fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5592-5596

- Nister M, Hammacher A, Mellstrom K, Siegbahn A, Ronnstrand L, Westermark B, Heldin CH (1988) A glioma - derived PDGF A chain homodimer has different functional activities than a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell* 52:791-799
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD and Ridle P (1988) Platelet derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocytes/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333:560-562
- O'Keefe EJ, Chiu NL, Payne RE (1988) Stimulation of growth of keratinocytes by bFGF. *J Invest Dermatol* 90:767-769
- Olwin BB and Hauschka SD (1990b). Isolation of a receptor for acidic fibroblast growth factor from embryonic chick. *J. Biol Chem* in press.
- Olwin BB and Hauschka SD (1989). Cell type and tissue distribution of the fibroblast growth factor receptor *J. Cell. Biochem.* 39 : 443-454.
- Olwin BB, Hauschka SD (1986) Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. *Biochemistry* 25:3487-3492
- Olwin BB, Hauschka SD (1988) Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture. *J Cell Biol* 107:761-769
- Olwin BB, Hauschka SD (1990a) Fibroblast growth factor receptor levels decrease during chick embryogenesis *J. Cell. Biol.* 110:503-509
- Otto D, Festscher M, Unsicker K (1989) Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel Foam resare medial septal neurons after fimbria fornix transection. *J Neurosci Res* 22:83-91
- Otto D, Unsicker K, 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
- Oudkhir M (1989) Contribution à l'étude des interactions entre le système nerveux et la régénération des membres de vertébrés : Mode d'action. Thèse d'Université, Université des Sciences, Marrakech
- Panet R, Amir I, Atln H (1986) Fibroblast growth factor induces a transient net K<sup>+</sup> influx carried by the bumetanide-sensitive transporter in quiescent BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 859:117-121
- Pasquale EB, Maher PA, Siuger SJ (1988) Comparative study of the tyrosine phosphorylation of proteins in swiss 3T3 fibroblasts stimulated by a variety of mitogenic agents. *J Cell Physiol* 137:146-156
- Pasquale EB, Singer SJ (1989) Identification of a developmentally regulated protein kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5449-5453
- Paterno GD, Gillespie LL (1989) Fibroblast growth factor and transforming growth factor  $\beta$  in early embryonic development. *Progress in growth factor research* 1:79-88

- Patten BM (1952) Early embryology of the chick. 4<sup>th</sup> ed., Blakiston, New York
- Pelech S, Olwin BB, Krebs EG (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
- Petroutsos G, Courty J, Guimaraes R, Pouliquen Y, Barritault D, Plouet J, 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, Weibel M, Sensenbrenner M, Labourdette G (1985) Purification of two astroglial growth factors from bovine brain. *FEBS Lett* 189:102-108
- Peyrat JP, Hondermarck H, Louchez MM, Boilly B. Demonstration of basic fibroblast growth factor receptors in human breast cancer cells. In preparation.
- Plank SR, Finch JS, Magun BE (1984) Intracellular processing of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 259:3053-3057
- Presta M, Maier JAM, Ragnotti G (1989) The mitogenic signaling pathway but not the plasminogen activator-inducing pathway of basic fibroblast growth factor is mediated through protein kinase C in fetal bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biol* 109:1877-1884
- Presta M, Maier JAM, Rusnali M, Ragnotti G (1989) Basic fibroblast growth factor is released from endothelial extracellular matrix in a biologically active form. *J Cell Phys* 104:68-74
- Presta M, Maier JAM, Rustani M, Ragnotti G (1989) Basic fibroblast growth factor : production, mitogenic response, and post receptor signal transduction in cultured normal and transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *J Cell Phys* 141:517-526
- Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB (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
- Pruss RM, Bartlett PF, Gavrilovic J, Lisak RP, Rattray S (1981) Mitogens for glial cells: a comparison of the response of cultured astrocytes, oligodendrocytes and Schwann cells. *Brain Res* 254:19-35
- Quarto N, Talarico D, Sommer A, Florkiewicz R, Basilico C, Rifkin DB (1989) Transformation by basic fibroblast growth factor requires high levels of expression : comparison with transformation by hst/k-fgf-. *Oncogene Res* (in press)
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF and Noble M (1988) Platelet derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333:562-565
- Raines EW, Ross R (1982) Platelet derived growth factor, high yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 257:5154-5160
- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61-84.
- Rauvala H (1989). An 18 kDa heparin binding-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factor. *EMBO J* 8:2933-2941

- Rechler MM, Nissley SP (1989) Insulin like growth factor in growth factors and their receptors I. Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 263-267
- Recio-Pinto E, Rechler MM and Ishii DN (1986) Effect of insulin, insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 6:1211-1219
- Reid HH, Wilks AF, Bernard O (1990) Two forms of basic fibroblast growth factor receptor-like mRNA are expressed in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1596-1600
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B, Dubois Dalcq (1988) A role for platelet derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 53:309-319
- Rippelino JA, Margolis RU (1989) Structural properties of the heparan sulfate proteoglycans of brain. *J Neurochem* 52:807-810
- Risau W (1986) Developing brain produces an angiogenesis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3855-3859
- Risau W, Ekblom P (1986) Production of a heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. *J Cell Biol* 103:1101-1107
- Risau W, Gautschi-Sova P, Böhlen P (1988) Endothelial cell growth factors in embryonic and adult chick brain are related to human acidic fibroblast growth factor. *EMBO J* 7:959-962
- Rizzino A, Kazakoff P, Ruff E, Kuszynski C and Nebelsick J (1988) Regulatory effects of cells density on the binding of transforming growth factor  $\beta$ , Epidermal growth factor, Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cancer Res* 48:4266-4271
- Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, Wideman J, Blacher R, Pan YC, Stein S, Lehrman SR, Smith JM, Lamb LC, Sporn MB (1983) Purification and properties of a type  $\beta$  transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22:5692-5698
- Roberts AB, Sporn MB (1989) The transforming growth factor  $\beta$ . In growth factors and their receptors I. Edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 419-472
- Robertson PL, Dubois M, Bowman PD, Goldstein GW (1985) Angiogenesis in developing rat brain : an in vivo and in vitro study. *Dev Brain Res* 23:219-223
- Rodan SB, Wesolowski G, Thomas K, Rodan GA (1987) Growth stimulation of rat calvaria osteoblastic cells by acidic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 121:1917-1923
- Rogelj S, Weinberg RA, Fanning P, Klagsbrun M (1988) Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. *Nature* 331:173-175
- Rogers KT, De Vries L, Kepler JA, Kepler CR, Speidel ER (1960) Studies on chick brain of biochemical differentiation related to morphological differentiation and onset of function. *J Exp Zool* 144:89-103

- Rogister B, Leprince P, Pettmann B, Labourdette G, Sensenbrenner M, Moonen G (1988) Brain basic fibroblast growth factor stimulates the release of plasminogen activators by newborn rat cultured astroglial cells. *Neurosci Lett* 91:321-326
- Romanoff AL (1960) The chick embryo, structural and functional development. Mac Millan, New York.
- Rose SP, Stahn R, Passovay PS, Herschman H (1976) Epidermal growth factor enhancement of skin tumor induction in mice. *Experientia* 32:913-915
- Rosengart TK, Johnson WV, Friesel R, Clark R, Maciat T (1988a) Heparin protects heparin-binding growth factor-I from proteolytic inactivation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 152:432-440
- Rowe JM, Kasper S, Shiu RP, Friesen HG (1986) Purification and characterization of a human mammary tumor-derived growth factor. *Cancer Res* 46:1408-1412
- Rubel EWD, Smith DJ and Miller LC (1976) Organization and development of brain stem auditory nuclei of the chicken : Ontogeny of n. magnocellularis and n. laminaris. *J Comp Neurol* 166:469-490
- Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronso SA (1989) Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 802-806
- Rudland PS, Gospodarowicz D, Seifert W (1974) Activation of guanyl cyclase and intracellular cyclic GMP by fibroblast growth factor. *Nature* 250:741-743
- Ruoslahti E (1988) Structure and biology of proteoglycans. *Ann Rev Cell Biol* 4:229-255
- Ruta H, How KR, Ricca R, Drohan G, Zubelshansky M, Laureys G, Barton DE, Francke (1988), Sclessinger J and Givol D (1988). A novel protein kinase gene whose expression is modulated during endothelial cell differentiation oncogene. 3 : 9-15.
- Ruta M, Burgess W, Gival D, Epstein J, Neiger N, Kaplow J, Grumley G, Dionne C, Jaye M, Schlessinger J (1989) Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the fms-like gene (FLG). *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8722-8726
- Safran A, Avivi A, Orr-Urtereger 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, Rifkin DB (1987) The opposing effect of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105:957-963
- Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB (1988) Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 107:743-751

- Saksela O, Rifkin DB (1990) Release of basic fibroblast growth factor - heparin sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator - mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110:767-775
- Saneto RP, DeVellis J (1985) Characterization of cultured rat oligodendrocytes proliferating in a serum-free, chemically defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3509-3513
- Saunders S, Jalkanen M, O'Farrel S, Bernfield M (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol* 108:1547-1756
- Scheffer C, Tseng O, Sanion N, Stern R, Gospodarowicz D (1982). Fibroblast growth factor modulates synthesis of collagene in cultured vascular endothelial cells. *Eur J. Biochem* 122 : 355-360.
- Schmidley JW, Blue P (1988) Isolation of glycosaminoglycans from basement membranes of brain microvessels. *Brain Res Bull* 20:27-31
- Schmidt JA, Tocci MJ (1989) Interleukin 1. In growth factors and their receptors I, edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 473-521
- Schubert D, Ling N, Baird A (1987) Mutiple influences of a heparin-binding growth factor on neuronal development. *J Cell Biol* 104:635-643
- Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D (1987b) Basic fibroblast growth factor : production and growth stimulation in cultured adrenal cortex cells. *Endocrinology* 120:796-800
- Schweigerer L, Neufeld G, Gospodarowicz D (1987c) Basic fibroblast growth factor as a growth inhibitor for cultured human tumor cells. *J Clin Invest* 80:1516-1520
- Schweigerer L, Neufeld G, Mergia Ayalew, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D (1987a) Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:842-846
- Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI (1983) Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Sciences* 221:236-240
- Seed J, Olwin BB, Hauschka SD (1988) Fibroblast growth factor levels in the whole embryo and limb bud during chick development. *Dev Biol* 128:50-57
- Senior RM, Huang SS, Griffin GL, Huang JS (1986) Brain-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts and astroglial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 141:67-72
- Seno M, Sasada R, Kurokawa T, Igarishi K (1990) Carboxyl-terminal structure of basic fibroblast growth factor significantly contributes to its affinity for heparin. *Eur J Biochem* 188:239-245
- Seyedin SM, Thompson AY, Bent ZH, Rosen DM, Mc Pherson JM, Conti A, Siegel NR, Galluppi GR, Piez KA (1986) Cartilage-inducing factor A. *J Biol Chem* 261: 5693-5695

- Sharma A, Dahiya R (1988) Bovine basic fibroblast growth factor identification and binding of its receptor on PC12 cells. *Biomed Biochim Acta* 47:975-983
- Sherr CJ, Stanley ER (1989) Colony - stimulating factor 1 (Macrophage colony-stimulating- factor) in growth factors and their receptors I - edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 667-698
- Shimasaki S, Emoto N, Koba A, Mercado M, Shibata F, Cooksey K, Baird A, Ling N (1988) Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 152:717-723
- Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M (1984) Heparin affinity : purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223:1296-1299
- Sidman RL, Miale IL, Feder N. (1959) Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone : An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp Neurol* 1 : 322-333
- Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, 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
- Silverstein JJ, Consigli SA, Lyser KM, Verpault C (1989) Basic fibroblast growth factor in the chick embryo, immunolocalization to striated muscle cells and there precursors. *J Cell Biol* 108:2459-2466
- Simpson RJ, Moritz RL, Lloyd CJ, Fabri LJ, Nice EC, Rubira MR, Burgess AW (1987) Primary structure of ovine pituitary basic fibroblast growth factor. *FEBS Lett* 224 : 128-132
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, Mac Donald HR, Mc Mahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jakson JL, Call SM, Friend D, Alpert AR, Gillis S, Urdal DL, Dower SK (1988) cDNA expression cloning of the IL1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Sciences* 241:585-589
- Slack J, Darlington B, Heath H, Godsave S (1987) Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326:197-200
- Slack JMW, Isaacs V (1989) Presence of basic fibroblast growth factor in the early *Xenopus* embryo. *Development* 105: 147-154
- Smith RS, Simth LA, Ride L, Weimar V (1981) Effects of growth factor on corneal woud healing, invest. *Ophtalmol. Vis Sci* 20:222-229
- Sommer A, Brewer MT, Thompson RC, Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB (1987) A form of human basic fibroblast growth factor with an extended amino terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 144:543-550
- Sommer A, Rifkin B (1989) Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor : protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J Cell Physiol* 138:215-220
- Sporn MB and Roberts AB (1988) Peptides growth factors are multifunctionnal. *Nature* 332 : 217-219

- Stanley ER, Heard PM (1977) Factors regulating macrophage production and growth- Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem* 252 : 4305-4312
- Story MT, Esch F, Shimasaki S, Sasse J, Jacobs SC, Lawson RK (1987) Amino-terminal sequence of a large form of basic fibroblast growth factor isolated from human benign prostatic hyperplastic tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 142:702-709
- Sudhalter J, Folkman J, Suahn CM, Bergendal K, D'Amore PA (1989) Importance of size, sulfation, and anticoagulant activity in the potentiation of acidic fibroblast growth factor by heparin. *J Biol Chem* 264, 6892-6897
- Suzuki K (1965) The pattern of mammalian brain gangliosides. *J Neurochem* 12:629-638
- Takakashi K, Suzuki K, Kawahara S and Onot (1989). Growth stimulation of human breast epithelial cells by basic fibroblast growth factor in serum free medium *Int. J. Cancer* 43 : 870-874.
- Takeyama Y, Tanimoto T, Hoshijima M, Kaibuchi K, Ohyanagi H, Saitoh Y, 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
- Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S (1972) Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* 247:5928-5934
- Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T (1985) Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 101:2330-2334
- Thomas D (1990) Ontogeny of fibroblast growth factors and their receptors during mouse brain development. These d'université, Lille I
- Thomas KA (1987) Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1:434-440
- Thomas KA, Riley MC, Lemmon SK, Baglan NC, Bradshaw RA (1980) Brain fibroblast growth factor : nonidentity with myelin basic protein fragment. *J Biol Chem* 255:5517-5520
- Thomas KA, Rios Candelore M, Fitzpatrick S (1984) Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 357-361
- Thompson JA, Anderson KD, DiPietro JM, Zwiebel JA, Zametta A, Anderson WF, Maciag T (1988) Site-directed neovessel formation *in vivo* .*Science* 241:1349-1352
- Thompson P, Desborde JM, Giraud J, Pouliquent Y, Barritault D, Courtois Y (1982) The effect of an eye derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration. *Exp Eye Res* 34:191-199
- Thompson P, Desbordes SM, Girand J, Pauliquen J, Barritault D, Courtois Y (1987) The effect of an eye-derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration. *Exp Eye Res* 34:191-199

- Thompson RW, Wadzinski MG, Sasse J, Klagsbrun M, Folkman J, Shemin RJ, D'Amore P (1986) Isolation of heparin-binding endothelial cell mitogens from normal human myocardium. *J Cell Biol* 203:300A
- Togari A, Dickens G, Kuzuya H, Guroff G (1985) The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J Neurosci* 5:307-316
- Trowell OA, Chir B, Willmer EN (1939) Growth of tissues *in vitro* VI. The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts. *J Exp Biol* 16:60-70
- Tsai HM, Garber BB and Larramendi LHM (1981b) 3H thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo : II. Dynamics of neuronal migration, displacement, and aggregation. *J Comp Neurol* 198 : 293-306
- Tsai HM, Garber BB and Larramendi LMH (1981a) 3H-thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo : I. Neuronal birthdate of telencephalic compartments in situ. *J Comp Neurol* 198 : 275-292
- Tsuda T, Hammamori Y, Yamashita T, Fukumoto Y, 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, Takai T (1985) Induction of protein kinase C activation and Ca<sup>2+</sup> mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 191:205-210
- Ueno N, Baird A, Esch F, Ling N, 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, 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
- Uhlrich A, Coussens L, Hayfick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Pownwand J, Meyes ELV, Whitwe N, Waterfield MD, Seegurg PH (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309:418-424
- Uhlrich S, Lagente O, Lenfant M, Courtois Y (1986) Effect of heparin on the stimulation of non-vascular cells by human acidic and basic FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 137:1205-1213
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Lia YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM and Ramashadran (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-761

- Unsicker K, Reichert-Preibsch H, Schmidt R, Pettmann B, Labourdette G, Sensenbrenner M (1987) Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5459-5463
- Vale W, Rivier I, Vanghan J, Mc Clintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J (1986) Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*:776-779
- Vallès AM, Boyer B, Badet J, Tucker GC, Barritault D, Thiery JP (1990) Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in rat bladder carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1124-1128
- Vigny M, Ollier-Hartmann MP, Lavigne M, Fayein N, Jeanny JC, Laurent M, Courtois Y (1988) Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane. Like structure and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor. *J Cell Physiol* 137:321-328
- Vlodavsky I, Johnson LK, Greenburg G, Gospodarowicz D (1979) Vascular endothelial cells maintained in the absence of fibroblast growth factor undergo structural and functional alterations that are incompatible with their *in vivo* differentiated properties. *J Cell Biol* 83:468-486
- Vlodavsky I, Kolkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, 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 JA, D'Amore P (1986) Neurite outgrowth induced by an endothelial cell mitogen isolated from retina. *J Cell Biol* 103:1363-1367
- Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R (1986) Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3012-3016
- Walicke PA (1988) Interaction between basic fibroblast growth factor (FGF) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Exp Neurology* 102:144-148
- Walicke PA, Feige JJ, Barid A (1989) Characterization of neuronal receptor for basic fibroblast growth factor and comparison to receptor on mesenchymal cells. *J Biol Chem* 264:4120-4126
- Watters DJ and Hendry IA (1987) Purification of ciliary neurotrophic factor from bovine hearts. *J Neurochem* 49 : 705-713
- Weibel M, Pettmann B, Labourdette G, Mische M, Bock E, Sensenbrenner M (1985) Morphological and biochemical maturation of rat astroglial growth factor. *Int J Dev Neurosci* 3:617-630
- Wertz W, Fischer G, Schachner M (1985a) Glycosaminoglycans of rat cerebellum : I - Quantitative analysis of the main constituents at post natal day 6. *J Neurochem* 44:900-906
- Wertz W, Fischer G, Schachner M (1985b) Glycosaminoglycans of rat cerebellum : I - A developmental study. *J Neurochem* 44:907-910

- Winkles JA, Friesel R, Burgess WH, Howk R, Mehlman T, Weinstein R, Maciati 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
- Wrana M, Bodmer S, De Martin R, Siepl C, Hofer-Warbinek R, Frei K, Hofer E, Fontana A (1987) T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12,5 Kd protein closely related to transforming growth factor  $\beta$ . Embo J 6:1633-1636
- Yamada T (1982) Transdifferentiation of lens cells and its regulation In : Mc Devitt DS (ed) Cell Biology of the Eye-Academic press, New York, pp 193-234
- Yamayata T, Saita H, Habuchi O et Suzuki (1968). Purification and properties of bacterial chondroitinore and chondro sulfate J. Biol. Chem 243 : 1523-1535.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ulrich A (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. Nature 323:226-232
- Yokota T, Arai N, Arai KJ, Zlotnik A (1989) Interleukin 4. In growth factors and their receptors I. Edited by Sporn MB and Roberts AB, Springer-Verlag, 577-607
- Yoshida T, Miyagawa K, Odagiri H, Sakamoto H, Little PF, Terada M, 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
- Zhan X, Bates B, Hu X, Goldfarb M (1988) The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. Mol Cell Biol 8:3487-3497



## TITRE DE LA THESE :

### EXPRESSION DE SITES DE FIXATION DES "FIBROBLAST GROWTH FACTORS" (FGFs) ACIDE ET BASIQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU CERVEAU DE POULET

---

Les "fibroblast growth factors" acide et basique (FGFa et FGFb) sont des facteurs de croissance mitogènes, angiogènes et neurotrophiques présents en quantités importantes dans le cerveau, mais dont la fonction dans cet organe reste inconnue. Afin de comprendre le rôle des FGFs, après avoir évalué la prolifération cellulaire, la différenciation neuronale et mesuré les quantités de FGFs, nous avons étudié l'expression de sites de fixation spécifiques de ces facteurs de croissance dans le cerveau de poulet au cours du développement.

La prolifération cellulaire, évaluée par mesure de l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine, diminue au cours du développement du cerveau et particulièrement entre E7 et E10 puis à la naissance. La différenciation neuronale, évaluée par mesure des taux de neurotransmetteurs aminergiques, augmente au cours du développement et notamment entre E10 et E15. Les quantités de FGFa et b, déterminées par mesures de l'activité biologique et dosages immunologiques augmentent de façon importante entre E10 et E15. L'utilisation de techniques de dosage radiorécepteur et de pontage moléculaire révèle que le FGFa et le FGFb interagissent au niveau de sites de fixation communs sur les membranes de cerveau. Deux catégories de sites de fixation spécifiques des FGFs ont été détectées : les sites de fixation à haute affinité ( $K_d=100$  pM pour le FGFa et 40 pM pour le FGFb) et les sites de fixation à basse affinité ( $K_d=20$  nM pour le FGFa et 10 nM pour le FGFb). Les sites de fixation à haute affinité correspondent à des récepteurs de poids moléculaires apparents proches de 130 et 95 kDa. La capacité membranaire de ces récepteurs diminue au cours du développement du cerveau et particulièrement entre E7 et E10 puis entre P1 et l'état adulte. Cette diminution du nombre de récepteurs est similaire à la diminution de la quantité d'ARNm correspondant au gène BEK (codant pour une forme de récepteur aux FGFs). Les sites de fixation à basse affinité sont généralement considérés comme étant des glycosaminoglycannes. L'extraction des glycosaminoglycannes du cerveau (E15) a permis de montrer que seuls les héparane sulfates fixent les FGFs ; leur poids moléculaire est proche de 15 et 65 kDa et leur interaction avec le FGFb est définie par un  $K_d$  de 5nM. Ces héparane sulfates empêchent la fixation du FGFb sur les membranes de cerveau et inhibent l'activité mitogène de ce facteur de croissance. Une étude radioautographique montre que les héparane sulfates fixant le FGFb sont localisés au niveau de l'ensemble du cerveau et particulièrement dans les éléments vasculaires.

L'ensemble de ces résultats permet d'aborder l'activité biologique des FGFs au cours du développement du cerveau, qui semble régulée par l'expression de sites de fixation à haute et à basse affinité pour ces facteurs de croissance.

---