

50376
1996
11

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE
LILLE**

Année 1996

n° d'ordre : 1673

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

présentée par :

Maryse DELEHEDDE

**Implication des protéoglycannes de type héparane
sulfate dans le contrôle de l'activité biologique du
FGF-2 sur les cellules de cancer du sein.**

Soutenue le 12 janvier 1996 devant le jury suivant :

Président :	Pr. B. BOILLY
Directeur du travail :	Dr. H. HONDERMARCK
Rapporteurs :	Pr. D. BARRITAUULT Dr. JP. PEYRAT
Examineurs :	Dr. E. DEUDON Dr. D. FERNIG



Avant-Propos

Ce travail a été réalisé dans l'Unité "Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses " (EA 1033) du Centre de Biologie Cellulaire, dirigée par le Pr. B. Boilly, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire.

Je tiens tout d'abord, à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Dr. H. Hondermarck, pour m'avoir guidée et soutenue tout au long de ce travail. J'ai énormément appris en travaillant à ses côtés et je suis très fière d'avoir été son élève.

Je remercie vivement les membres de ce jury présidé par le Pr. B. Boilly :

- le Pr. D. Barritault (Laboratoire CRRET, Créteil) et le Dr. J.P. Peyrat (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, C.O.L., Lille) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse.

- le Dr. D. Fernig (Department of Biochemistry, University of Liverpool) pour l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à ce travail.

- le Dr. E. Deudon (U402, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Paris) pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences et de son soutien tout au long de la thèse. Mes séjours chez toi ont toujours été très productifs et stimulants. Tu m'as également fait le très grand cadeau de ta confiance et de ton amitié. Sois assurée de ma profonde reconnaissance.

Je voudrais également remercier les membres du laboratoire de Biochimie (INSERM U402) ainsi que Brigitte, Claire, François, et JM Deudon, qui m'ont toujours si chaleureusement accueillis lors de mes périples parisiens.

Je remercie tout ceux qui m'ont aidée tout au long de ma formation doctorale et en particulier : Martine Demol (Culture cellulaire/Diagnostics Pasteur), Louis Hornez (C.O.L), le Pr. B. Gosselin (CHR Calmettes), le Dr. C. Sartiaux, (CRTS) ainsi que le Pr. B. Lassalle.

Je n'oublierai pas de remercier le Dr. M. Mouze pour ces bouffées d'air pur, les Dr. Y. Baille et T. Dugimont pour leurs sourires, le Dr. J.P. Maufroid pour son optimisme communicatif, Simon Descamps pour son aide et sa disponibilité ainsi que tous mes amis du LBD et du SN3...

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à ceux qui m'ont aidée dans la rédaction de ce manuscrit, moralement ou matériellement : Sabine bien évidemment, Carine, les Cranberries, Rodolf, Hervé, Edith et le petit Maxence.

Enfin je voudrais remercier tous mes amis des "trains quotidiens" : Marianne et ses petits pains, mais aussi Françoise, Sonia, Anne-Sophie, Hélène, Annie, Dominique, Luc, Alexandre, Marcel, Annick, Rodolf, Daniel, Anne, Hubert, Nathalie, Denis, Laurence, Domitille, Michèle, Sylvie, Jean, Armelle, Christian, Elsa, Florence, Fabien, Serge et Stéphane...

*A mon Père et à ma Mère,
Pour leur Force et leur Foi...*

*"L'essentiel est invisible pour les yeux..."
Antoine de Saint-Exupéry*

**IMPLICATION DES PROTEOGLYCANNES DE TYPE
HEPARANE SULFATE DANS LE CONTROLE DE
L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DU FGF-2 DANS LES
CELLULES DE CANCER DU SEIN.**

SOMMAIRE.

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE.....	1
I - Le FGF-2.....	2
I-1 - Introduction.....	2
I-2 - Structure du FGF-2.....	4
I-3 - Isoformes du FGF-2.....	6
I-4 - Internalisation du FGF-2.....	7
I-5 - Distribution tissulaire du FGF-2.....	8
II - Récepteurs du FGF-2 à activité tyrosine kinase (FGFR).....	9
II-1 - Introduction.....	9
II-2 - Caractéristiques structurale des FGFR.....	9
II-3 - Isoformes du FGFR.....	12
II-4 - Liaison des FGF à leurs récepteurs FGFR.....	13
II-5 - Voies de signalisation intracellulaire.....	16
II-6 - Expression et régulation des FGFR.....	19
III - Sites de fixation de basse affinité du FGF-2 (HSPG).....	20
III-1 - Introduction.....	20
III-2 - Structure moléculaire et synthèse des chaînes d'HS.....	22
III-3 - HSPG et FGF-2.....	27
III-4 - Régulation de l'expression des HSPG fixant le FGF-2.....	31
IV - Présentation du modèle.....	32
IV-1 - Introduction.....	32
IV-2 - Expression des FGF dans la glande mammaire.....	33
IV-3 - Effet du FGF sur la prolifération de cellules mammaires.....	34
IV-4 - Récepteurs du FGF-2 dans la glande mammaire.....	34
IV-5 - Hypothèse et démarche expérimentale.....	35

CHAPITRE 2 : Effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires.....	37
I - Introduction.....	38
II - Matériel et méthodes.....	39
II-1 - Culture cellulaire.....	39
a - lignées cellulaires.....	39
b - Conditions de culture.....	41
II-2 - Méthodes d'investigation de la prolifération cellulaire.....	41
II-2-1 - Numération cellulaire.....	42
II-2-2 - Mesure du contenu en ADN.....	42
II-2-3 - Marqueurs du cycle cellulaire.....	42
II-2-4 - Estimation de la durée du cycle cellulaire.....	43
II-2-5 - Analyse d'images microscopiques ou cytométrie à balayage.....	45
a - Principe.....	45
b - Paramètres.....	48
c - Traitement des données.....	48
III - Résultats.....	49
III-1 - Numération cellulaire.....	49
III-2 - Mesure du contenu en ADN.....	52
III-3 - Marqueurs du cycle cellulaire.....	52
III-4 - Estimation de la durée du cycle cellulaire.....	56
IV - Discussion.....	58
IV-1 - Comparaison des méthodes d'investigation du cycle cellulaire.....	58
IV-2 - Caractéristiques prolifératives des cellules cancéreuses mammaires.....	61
IV-3 - Effet du FGF-2 sur les cellules cancéreuses mammaires.....	61

CHAPITRE 3 : Mise en évidence et comparaison des protéoglycannes synthétisés par les cellules épithéliales mammaires.....	65
I - Introduction.....	66
II - Matériels et méthodes.....	75
II-1 - Isolement des protéoglycannes des cellules épithéliales mammaires.	75
II-2 - Chromatographie échangeuse d'anions.....	76
II-3 - Identification des chaînes de GAG par digestions enzymatiques.....	77
II-4 - Chromatographie de tamisage moléculaire.....	77
II-5 - Méthode de dosage colorimétrique des protéoglycannes sulfatés par le bleu alcian.....	78
III - Résultats.....	79
III-1 - Incorporation globale de [³⁵ S]dans les protéoglycannes néosynthétisés.....	80
III-2 - Descriptif et analyse des profils chromatographiques : charge, taille et nature des PG..	81
a - protéoglycannes de la couche cellulaire des MDA-MB-231.....	82
b - protéoglycannes libérés dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231.....	84
c - protéoglycannes de la couche cellulaire des MCF-7.....	86
d - protéoglycannes libérés dans le milieu de culture des cellules MCF-7.....	91
III-3 - Dosage colorimétrique des PG sulfatés par le bleu Alcian.....	93
IV - Discussion.....	93
IV-1 - Méthodes d'études des protéoglycannes.....	93
IV-2 - Protéoglycannes et cancer du sein.....	96
IV-3 - Diversité de taille et de charge des PG des cellules épithéliales mammaires.....	99

CHAPITRE 4 : Mise en évidence de l'implication des protéoglycannes

dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2.....	102
I - Introduction.....	103
II - Matériels et méthodes.....	106
II-1 - Etude des interactions entre les PG et le FGF-2.....	106
II-1-1 - Marquage du FGF-2 par l'iode 125.....	106
II-1-2 - Liaison du ¹²⁵ I FGF-2 sur cellules en culture.....	107

II-1-3 - Liaison des protéoglycannes aux membranes cationiques.....	108
II-1-4 - Liaison du ¹²⁵ I FGF-2 aux PG fixés sur membranes cationiques.....	108
II-2 - Etude de l'activité mitogène du FGF-2 après modification structurale des PG.....	109
II-2-1 - Dégradation enzymatique des chaînes de glycosaminoglycannes.....	109
II-2-2 - Inhibition de la sulfatation des PG par le chlorate de sodium.....	110
II-2-3 - Effet du β-D-Xyloside.....	111
II-3 - Etude de l'effet des PG purifiés sur l'activité mitogène du FGF-2.....	111
II-3-1 - Milieux conditionnés.....	111
II-3-2 - Protéoglycannes purifiés.....	111
III - Résultats.....	112
III-1 - Interaction entre le ¹²⁵ I FGF-2 et les PG des cellules épithéliales mammaires.....	112
III-1-1 - Liaison du ¹²⁵ I FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires.....	112
III-1-1-1 - Implication des chaînes d'HS dans la fixation de ¹²⁵ I FGF-2.....	112
III-1-1-2 - Implication de la sulfatation des PG dans la fixation de ¹²⁵ I FGF-2.....	112
a - Inhibition par le chlorate de sodium de l'incorporation de [³⁵ S] Sulfate.....	112
b - Le chlorate de sodium n'inhibe pas la synthèse des GAG.....	116
c - Inhibition par le chlorate de sodium de la liaison du ¹²⁵ I FGF-2.....	119
III-1-2 - Liaison du ¹²⁵ I FGF-2 sur les PG immobilisés.....	119
III-2 - Effet d'une modification des PG sur l'activité mitogène du FGF-2.....	124
III-2-1 - Dégradation enzymatique des chaînes de glycosaminoglycannes.....	124
III-2-2 - Inhibition de la sulfatation des PG.....	125
III-2-3 - Effet du β-D-Xyloside.....	129
III-3 - Effet des PG purifiés sur la prolifération des cellules.....	129
III-3-1 - Milieux conditionnés.....	129
III-3-2 - Fractions purifiées.....	131
IV - Discussion.....	135
CONCLUSION.....	141
BIBLIOGRAPHIE.....	145
Abréviations.....	173

CHAPITRE 1
INTRODUCTION GENERALE.

INTRODUCTION GENERALE.

I - Le FGF-2.

I-1 - Introduction.

Les Fibroblast Growth Factors (FGFs) constituent une famille de facteurs de croissance et d'oncogènes présentant une affinité pour l'héparine, comportant actuellement 9 membres (figure 1) qui sont le FGF acide (FGF-1), le FGF basique (FGF-2), les produits d'oncogènes int-2 (FGF-3) et hst (FGF-4), le FGF-5, le FGF-6, le keratinocyte growth factor (KGF ou FGF-7), et les deux membres récemment découverts, le FGF-8 et le FGF-9 (Basilico et Moscatelli, 1992 ; Tanaka et al. 1992 ; Miyamoto et al. 1993). Ces différents polypeptides partagent un fort degré d'homologie de séquence entre eux (35-55%) et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux (revues dans Burgess et Maciag, 1989 ; Basilico et Moscatelli, 1992 ; Mason, 1994). Le membre prototype de cette famille est le FGF-2, purifié initialement à partir de la glande pituitaire (Gospodarowicz, 1974). Les effets du FGF-2 sont pléiotropiques : il est non seulement impliqué dans la prolifération de nombreux types cellulaires mais également dans la différenciation, notamment des cellules nerveuses en stimulant la croissance de neurites (revue dans Sensenbrenner, 1993). Ce facteur de croissance permet également l'induction du mésoderme dans les embryons de Xénope (Slack et al. 1987). Il est aussi un puissant facteur angiogène et stimule la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (i.e protéases, collagénases, héparanases) favorisant ainsi la migration cellulaire et l'invasion métastatique (Moscatelli et al. 1986 ; Folkman et Klagsbrun, 1987 ; Vlodavsky et al. 1990). Ces différents effets du FGF-2 sont permis grâce à l'existence de deux grandes catégories de sites de fixation définis historiquement selon leur affinité pour le FGF-2 : les récepteurs de haute affinité de type tyrosine kinase (FGFR), et les protéoglycannes de type héparane sulfate (HSPG) correspondant aux sites de fixation de basse affinité. Nous allons dans un premier temps, détailler la structure et les caractéristiques du FGF-2.

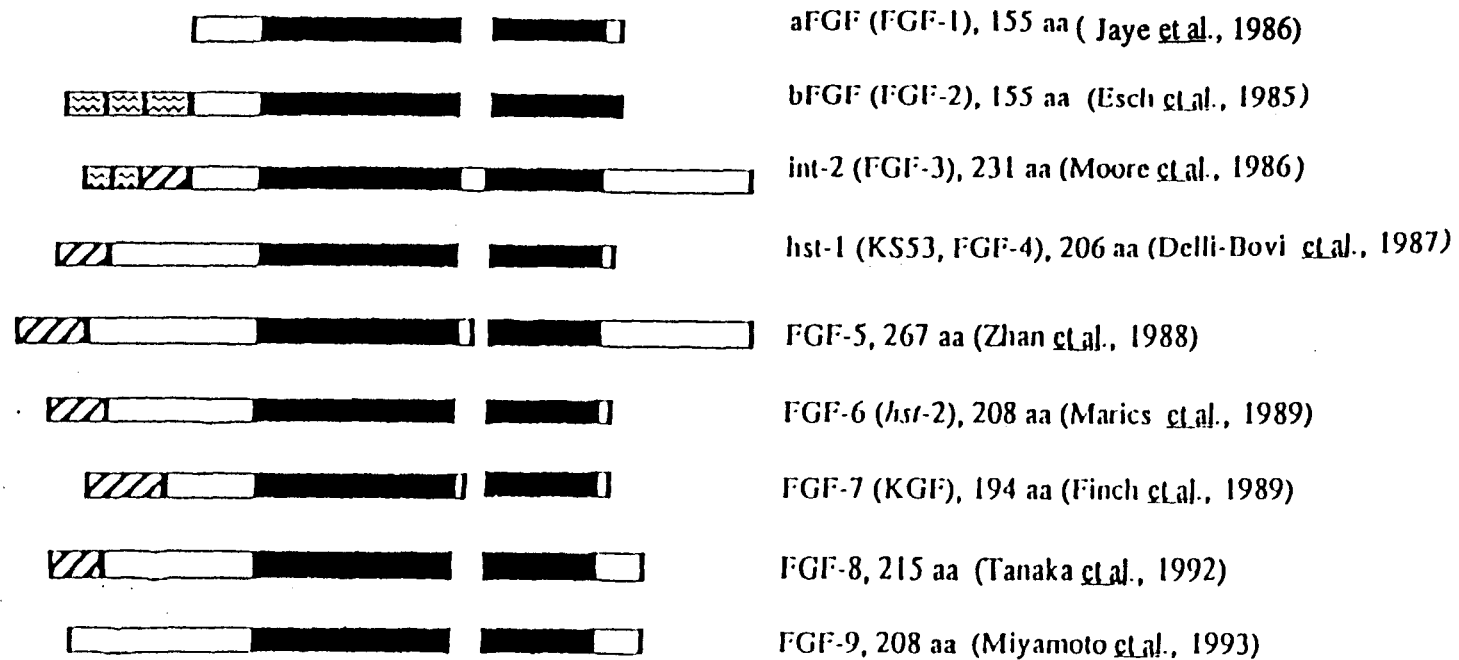


Figure 1 : Caractéristiques structurales de la famille des FGFs.

Les deux membres prototypes sont le FGF basique (bFGF ou FGF-2), et le FGF acide (aFGF ou FGF-1), qui se sont révélés des mitogènes puissants pour de nombreux types cellulaires. Leur particularité essentielle est de ne pas posséder de peptide de sécrétion. Le FGF-3 (ou int-2), le FGF-4 (ou *hst*, aussi appelé Kaposi Sarcoma FGF ou K-FGF) ainsi que le FGF-5, ont d'abord été identifiés comme des produits d'oncogènes. Le FGF-6 a été identifié sur la base d'homologie avec le FGF-4 (Rubin *et al.* 1989). Le FGF-7 (ou KGF pour Keratinocyte Growth Factor) a été reporté comme un facteur mitogène spécifique des cellules épithéliales (Finch *et al.* 1989). Le FGF-8 (encore appelé AIGF pour androgen induced growth factor) (Tanaka *et al.* 1992) a été isolé d'une lignée épithéliale mammaire de souris (SC-3 ou Shionogi cells) dont la croissance est dépendante des androgènes (testostérone). Le FGF-9 (appelé initialement GAF pour Glia-Activating Factor) (Miyamoto *et al.* 1993) n'a pas de signal de sécrétion comme le FGF-2 et le FGF-1.

■ : région responsable de la fixation aux récepteurs de surface cellulaire.

▨ : signal de sécrétion.

☞ : extensions N-terminales impliquées dans la localisation nucléaire.

D'après Fernig et Gallagher, 1994.

I-2 - Structure du FGF-2.

Le FGF-2 est un polypeptide non glycosylé de 18 kDa, possédant un pI de 9.6 (Esch et al. 1985). Il existe également des formes de haut poids moléculaire 22, 23, et de 25 kDa, qui possèdent spécifiquement du côté N-terminal une *séquence de localisation nucléaire* (Prats et al. 1989 ; Florkiewicz et Sommer, 1989).

Des études structurales approfondies ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs sites spécifiques dans la molécule du FGF-2 (figure 2). *Deux sites distincts de fixation du récepteur* ont ainsi été identifiés (revue dans Basilico et Moscatelli, 1992 ; Springer et al. 1994 ; Seddon et al. 1995). En raison de la structure tertiaire du FGF-2, le premier site de fixation au récepteur correspond en fait à une séquence discontinue d'acides aminés, dont les capacités de fixation proviennent essentiellement des interactions hydrophobes des résidus Tyr-24, Tyr-103, Leu-140, et Met-142 ainsi que des résidus polaires Arg-44 et Asn-101 (Springer et al. 1994). Le second domaine de fixation au récepteur présente une plus affinité réduite (250 fois plus faible que celle du premier site). Cependant, trois acides aminés qui le constituent (Lys-110, Tyr-111 et Trp-114) apparaissent indispensables à l'activité mitogène du FGF-2 (Springer et al. 1994).

Le troisième domaine important dans la structure de ce facteur de croissance est le *domaine de liaison à l'héparine* (Baird et al. 1988 ; Heath et al. 1991 ; Zhang et al. 1991 ; Arakawa et al. 1994 ; Thompson et al. 1994 ; Li et al. 1994a). Ce domaine apparaît nécessaire à l'activité du FGF-2 puisqu'après mutagenèse dirigée ou modification chimique des acides aminés le constituant, la prolifération induite par ce facteur est fortement diminuée (Burgess et al. 1990 ; Heath et al. 1991 ; Li et al. 1994a ; Thompson et al. 1994). Récemment, Thompson et ses collaborateurs (1994) ont ainsi identifié une séquence discontinue de onze acides aminés chargés positivement, qui interviennent spécifiquement dans la liaison du FGF-2 à l'héparine (les acides aminés Lys-128, Arg-129, Lys-134, Lys-138 apparaissent indispensables). Les interactions entre le FGF-2 et l'héparine sont essentiellement (70 %) de nature non ionique (liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals) ; les interactions électrostatiques apparaissent mineures (30 %).

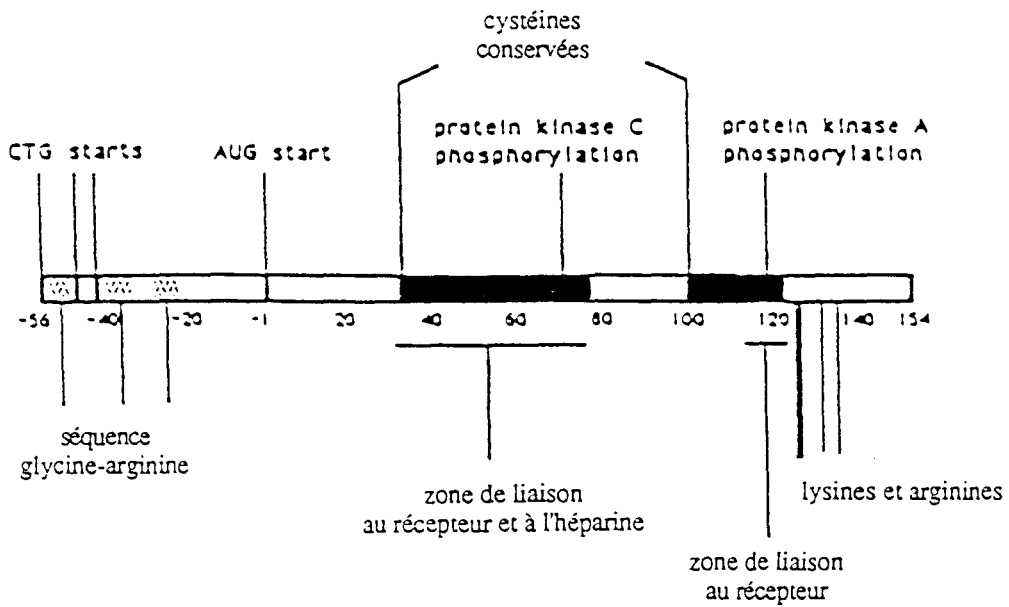


Figure 2 : Représentation schématique du FGF-2.
 L'acide aminé - 1 désigne la méthionine qui initie la forme de 18 kDa. Les différents domaines fonctionnels sont discutés dans le texte.
 D'après Basilico et Moscatelli, 1992.

Quatre cystéines caractérisent également cette molécule dont deux d'entre elles semblent hautement conservées entre les différents membres de la famille des FGF (revue dans Basilico et Moscatelli, 1992). Cependant ces cystéines ne semblent pas nécessaires à la fonction biologique du FGF-2, puisque leur remplacement par des résidus sérines n'empêche pas l'activité mitogène de ce facteur (Fox et al. 1988).

La molécule de FGF-2 peut subir des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation du FGF-2 par la protéine kinase A et la protéine kinase C a été décrite par Feige et Baird (1989). Des protéines kinases non dépendantes de l'AMP cyclique peuvent également intervenir spécifiquement à la surface des cellules d'hépatome (cellules SK-Hep) pour permettre la phosphorylation du FGF-2 (Vilgrain et Baird, 1991). D'autres modifications spécifiques ont été décrites comme la ribosylation, c'est-à-dire le transfert enzymatique d'un ADP-ribose sur le FGF-2 dans les noyaux des cellules d'hépatome (SK-Hep) et des cellules endothéliales (Boulle et al. 1995). Le rôle de ces différentes modifications n'est pas encore clairement établi.

I-3 - Isoformes du FGF-2.

Le gène du FGF-2, situé sur le chromosome 4, comporte trois exons séparés par deux introns (Mergia et al. 1986). Les ARNm transcrits à partir de ce gène sont constitués de 3.7 et 7 kilobases (Abraham et al. 1986). Lors de la transcription, l'utilisation de différents codons d'initiation permet la synthèse de quatre isoformes différentes du FGF-2. L'utilisation du codon AUG donne ainsi naissance à la forme dite de bas poids moléculaire du FGF-2 ou "Low Molecular Weight"/LMW FGF-2 (155 acides aminés : 18 kDa). L'utilisation d'un des trois codons CUG situés plus en amont, génère les formes dites de haut poids moléculaire ou "High Molecular Weight"/HMW FGF-2 (210 acides aminés : 24 kDa, 201 acides aminés : 22.5 kDa, 196 acides aminés : 21 kDa (Prats et al. 1989 ; Quarto et al. 1993 ; Patry et al. 1994). Elles présentent ainsi une séquence de localisation nucléaire du côté N-terminal de la protéine, qui permet le transport du FGF-2 jusqu'au noyau. Ces formes de haut poids moléculaire sont retrouvées préférentiellement dans le

noyau des cellules alors que la forme de 18 kDa se retrouve plus spécifiquement dans le cytoplasme (revue dans Quarto et al. 1993 ; Dono et Zeller, 1994 ; Gualandris et al. 1994).

Bien que ne possédant pas de signal de sécrétion, la forme de bas poids moléculaire (18 kDa) est retrouvée dans les matrices extracellulaires, particulièrement les membranes basales, ainsi qu'*in vitro* dans le milieu de culture des cellules (Schweigerer et al. 1987 ; New et Yeoman, 1992 ; Souttou et al. 1994). Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour tenter d'expliquer le mode de sécrétion du FGF-2, comme la mort cellulaire ou encore la rupture membranaire après blessure (revues dans D'Amore, 1990 ; Yayon et Klagsbrun, 1990 ; Yeoman, 1993). L'irradiation des cellules endothéliales en augmentant la mort cellulaire, augmente en effet, la libération du FGF-2 (Witte et al. 1989). Par ailleurs, lorsque des cellules endothéliales sont lésées, McNeil et al. (1989) ont pu observer une accumulation de FGF-2 dans le milieu de culture de ces cellules. Mais ces différentes hypothèses ne peuvent pas expliquer le contrôle nécessaire pour une régulation fine des différents effets biologiques du FGF-2 (Sato et al. 1989 ; Yeoman, 1993). Le FGF-2 pourrait également sortir de la cellule par exocytose et ainsi, il permettrait la stimulation autocrine et paracrine des cellules NIH 3T3 transfectées par le FGF-2 (Mignatti et al. 1992). Ce mécanisme d'exocytose a aussi été décrit dans le cas d'une cytokine, l'interleukine-1 β (Rubartelli et al. 1990), analogue structural du FGF-2 (Zhang et al. 1991) ainsi que dans le cas d'une lectine (Cooper et Barondes, 1990). Il convient de noter qu'à l'heure actuelle, aucun consensus n'existe au sujet de la voie de libération du FGF-2.

I-4 - Internalisation du FGF-2.

Le FGF-2 exogène induit une réponse mitogène dans un grand nombre de cellules (revue dans Basilico et Moscatelli, 1992 ; Mason, 1994) en interagissant avec ses récepteurs de haute affinité de type tyrosine kinase (FGFR) et avec des protéoglycannes de type héparane sulfates (HSPG) comme nous le détaillerons plus loin. Ces deux catégories de sites de fixation permettent également l'internalisation du FGF-2 selon des voies différentes (Moscatelli, 1992 ; Rognani et Moscatelli, 1992 ; Reiland et Rapraeger, 1993). Le FGF-2 exogène est internalisé classiquement par endocytose des FGFR membranaires, mais il peut aussi être internalisé lorsqu'il est uniquement lié aux HSPG de la surface

cellulaire (Gannoun-Zaki et al. 1991, 1994 ; Rognani et Moscatelli, 1992 ; Rusnati et al. 1993 ; Quarto et Almaric, 1994 ; Almaric et al. 1994).

L'internalisation via les HSPG peut jouer un rôle dans l'activité biologique du FGF-2. En effet, cette association stabilise la molécule et la protège de la dégradation par les enzymes lysosomiales : la durée de vie du FGF-2 dans la cellule est ainsi augmentée (Quarto et al. 1993 ; Rusnati et al. 1993). Le FGF-2 est ensuite transporté jusqu'au noyau, plus spécialement pendant la transition de la phase G1 à la phase S (Bouche et al. 1987 ; Baldin et al. 1990), s'accumule dans les structures nucléolaires et pourrait agir directement sur la transcription de certains gènes (Nakanishi et al. 1992 ; Bouche et al. 1994 ; Quarto et Almaric, 1994 ; Almaric et al. 1994) notamment en interagissant avec la protéine kinase CK II (Almaric et al. 1994 ; Bouche et al. 1994).

I-5 - Distribution tissulaire du FGF-2.

Initialement isolé de la glande pituitaire, le FGF-2 est un facteur de croissance ubiquitaire, largement retrouvé dans de nombreux organes et tissus (Baird et al. 1986 ; Gospodarowicz et al. 1987 ; Cordon-Cardo et al. 1990). Il est détecté préférentiellement dans les tissus fortement vascularisés (Vlodavsky et al. 1987 ; Hondermarck et al. 1990a ; Lobb, 1988). Par immunocytochimie, le FGF-2 a été essentiellement localisé dans les matrices extracellulaires (Vlodavsky et al. 1987 ; Folkman et al. 1988 ; revue dans Vlodavsky et al. 1991). Des expériences de déplacement de la liaison de FGF-2 radiomarqué a permis de mettre en évidence que ce facteur de croissance se lie préférentiellement aux HSPG de la matrice extracellulaire (Bashkin et al. 1989). En effet, une digestion enzymatique par l'héparinase empêche totalement la liaison de ce facteur de croissance à la matrice extracellulaire (revue dans Vlodavsky et al. 1991). Les rôles biologiques de cette liaison du FGF-2 aux HSPG seront analysés dans un prochain paragraphe. Le FGF-2 a également été caractérisé comme le principal facteur angiogène purifié des tissus tumoraux (Folkman et Klagsbrun, 1987 ; Vlodavsky et al. 1990). Il a ainsi été détecté dans de nombreuses biopsies cancéreuses (Lobb, 1988) dont les gliomes et les méningiomes (Takahashi et al. 1990) ainsi que les cancers du sein (Luqmani et al. 1992 ; Anandappa et al. 1994 ; Pennault-Llorca et al. 1995).

II - Les récepteurs des FGF à activité tyrosine kinase (FGFR).

II-1 - Introduction.

Les récepteurs à activité enzymatique tyrosine kinase (FGFR) sont les récepteurs proprement dit du FGF-2 puisqu'ils sont responsables de la transduction du signal (revue dans Jaye et al. 1992 ; Johnson et Williams, 1992 ; Fantl et al. 1993 ; Partanen et al. 1993). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui lient le FGF-2 avec une haute affinité (Kd 20-600 pM).

II-2 - Caractéristiques structurales des FGFR.

Actuellement, 4 membres de la famille ont pu être identifiés : FGFR-1 (flg ou fms like gene), FGFR-2 (bek), FGFR-3 (cek2) et FGFR-4 (Jaye et al. 1992). Ils sont codés par quatre gènes différents situés respectivement sur les chromosomes 8, 10, 4 et 5 (revues dans Jaye et al. 1992 ; Johnson et Williams, 1992). Cette famille de récepteurs appartient à un groupe plus large de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tel que l'EGF ou encore le PDGF (figure 3). Ces RTK appartiennent à une classe d'enzymes de régulation capable de catalyser sélectivement la phosphorylation de substrats protéiques sur des résidus tyrosines (Fantl et al. 1993).

La structure générale des récepteurs aux FGF (ou FGFR) est présentée en figure 4. Cette molécule est constituée d'une seule chaîne polypeptidique transmembranaire d'environ 145 kD présentant plusieurs domaines spécifiques. La partie extracellulaire des FGFR est caractérisée par un domaine composé de 3 boucles à pont disulfure analogues à celles des immunoglobulines. Elle a la particularité d'être glycosylée (6 à 9 sites potentiels) et constitue le domaine de fixation du FGF-2. Les deux premières boucles sont séparées par un segment de 4 à 8 acides aminés (principalement des acides aspartiques et glutamiques), appelé domaine acide. Ce domaine est caractéristique de la classe des FGFR (figure 3). Les FGFR possèdent également dans leur partie extracellulaire, un domaine capable de fixer l'héparine, mais avec une affinité plus faible que le FGF-2 (Kan et al. 1993 ; Pantoliano et al. 1994 ; Thompson et al. 1994). Les rôles de ces différentes interactions seront détaillés plus loin.

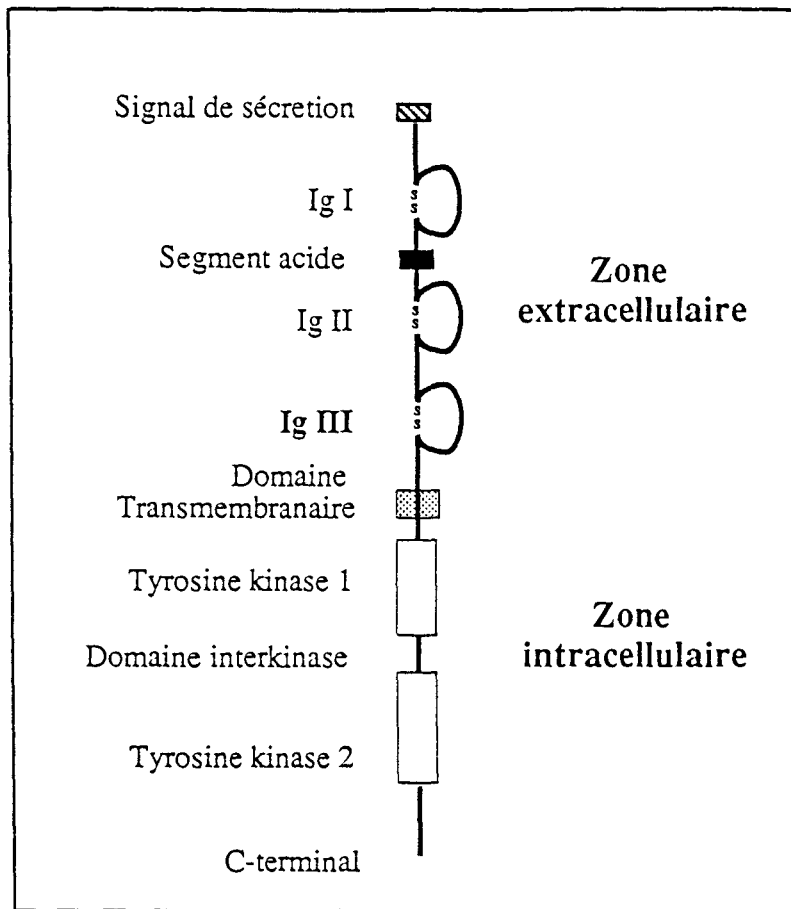


Figure 4 : Représentation schématique de la structure des récepteurs des FGF.

Les récepteurs des FGF présentent une structure extracellulaire en trois boucles immunoglobuliniques. Un domaine acide caractéristique de cette famille de récepteur, est également présent entre la première et la deuxième boucle. Le domaine catalytique intracytoplasmique est constitué de deux domaines kinases séparés par une courte séquence interkinase.

D'après Johnson et Williams, 1992.

Une courte séquence polypeptidique hydrophobe, incluse dans la membrane cytoplasmique, constitue le domaine transmembranaire du récepteur. La région cytoplasmique du récepteur, relativement courte, contient deux domaines catalytiques présentant une activité enzymatique tyrosine kinase, séparés par une courte séquence (14 acides aminés) ou domaine interkinase. Ce domaine intracellulaire possède les résidus tyrosines qui sont les sites potentiels d'autophosphorylation du FGFR.

II-3 - Isoformes des FGFR.

D'une manière originale dans la famille des RTK, les FGFR peuvent se présenter sous un très grand nombre d'isoformes, codées par des transcrits multiples résultant de mécanismes d'épissages alternatifs (Jaye et al. 1992). Ainsi un seul gène peut donner naissance à plusieurs isoformes, secrétées ou intracellulaires, et qui peuvent présenter des modifications spécifiques tant dans le domaine extracellulaire que dans le domaine intracellulaire. Il faut noter que le rôle biologique de la plupart d'entre eux reste encore à déterminer.

Les premières isoformes détectées présentent une délétion de la première boucle immunoglobuline-like extracellulaire dans le FGFR-1 (Johnson et al. 1991). Cette délétion comprend même le domaine acide pour le FGFR-2. Ces formes tronquées fixent cependant les FGF avec la même affinité que la forme native, suggérant que la boucle N-terminale comme le segment acide ne sont pas indispensables à la fixation du FGF-1 ou du FGF-2 (Dionne et al. 1990). Ces isoformes à deux boucles immunoglobuliniques sont les isoformes les plus communément rencontrées (revue dans Johnson et Williams, 1992).

Certaines formes isolées ont par contre seulement perdu soit un dipeptide RM (Arginine-Méthionine) après le segment acide, soit un dipeptide TV (Thréonine-Valine) dans la zone juxtamembranaire du domaine intracellulaire (Johnson et al. 1990 ; Jaye et al. 1992). Ce dipeptide TV pourrait correspondre à un site potentiel de phosphorylation par une sérine/thréonine kinase (Hou et al. 1991).

A ce jour, les formes les mieux connues de FGFR correspondent à un épissage différentiel au niveau des exons codant pour la troisième boucle immunoglobulinique extracellulaire. Cette boucle est codée par trois exons : l'exon IIIa pour la moitié N-terminale et les exons IIIb et IIIc pour la moitié C-terminale (figure 5). L'expression de l'exon IIIa génère une forme sécrétée du FGFR-1 dite forme soluble (Duan et al. 1992 ; Wang et Thomas, 1994). Par contre, l'expression des exons IIIb et IIIc donne naissance à des formes transmembranaires (revue dans Fantl et al. 1993 ; Partanen et al. 1993). L'exon IIIb du FGFR-3 est très différent de celui de FGFR-1 et FGFR-2 (Avivi et al. 1993 ; Jaye et al. 1992). La moitié C-terminale de la troisième boucle de FGFR-4 n'est codée que par un seul exon (l'exon IIIc'), très semblable à l'exon IIIc mais ayant également des homologies avec l'exon IIIb (Vainikka et al. 1992).

Pour exemple, nous avons présenté en figure 6, six FGFR-1 différents, produits par épissage alternatif (revue dans Fernig et Gallagher, 1994). On remarquera plus particulièrement, la forme IV du FGFR-1, qui possède un domaine catalytique à activité tyrosine kinase tronqué. Vraisemblablement inactif dans la transduction du signal, il pourrait jouer un rôle modulateur de dominant négatif (Ueno et al. 1991 ; McKeenan et Kan, 1994 ; Li et al. 1994b).

On notera également l'existence d'une forme particulière de récepteurs, le récepteur CFR (Cystein-Rich FGF Receptor). Le CFR est un récepteur transmembranaire de 150 Kd, qui présente un domaine extracellulaire fortement enrichi en cystéines et qui fixe le FGF-2 avec un Kd d'environ 1 nM. Le rôle biologique de ce type de récepteur reste à déterminer (Burrus et al. 1992 ; Olwin et al. 1994).

II-4 - Liaison des FGF à leurs récepteurs FGFR.

L'existence de quatre récepteurs, avec chacun plusieurs types d'isoformes, pose la question de la spécificité de ces différentes formes pour les différents membres de la famille des FGF. La forme soluble (IIIa), tout d'abord, est capable de lier les FGF mais avec une affinité plus importante pour le FGF-2 (Duan et al. 1992 ; Wang et Thomas, 1994).

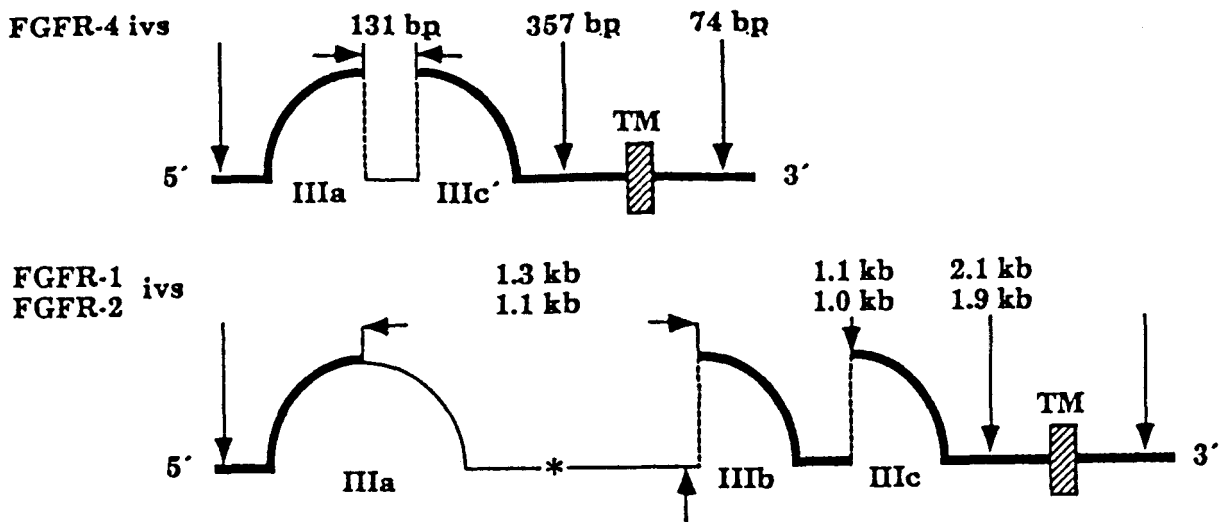


Figure 5 : Comparaison des structures génomiques des FGFR-4, FGFR-2 et FGFR-1. Les sites des introns (ou ivs) ainsi que leurs tailles sont indiqués le long de l'ADNc (flèches). Ainsi, la troisième boucle immunoglobulinique du FGFR-4 est codée par les exons IIIa et IIIc' qui sont séparés par 131 b.p. Dans le FGFR-1 et le FGFR-2, la boucle Ig- like III est codé par l'exon IIIa et les exons IIIb et IIIc selon un épissage alternatif.

* : codon stop. TM : domaine transmembranaire.

D'après Partanen et al. 1993.

	autres noms	gène	taille du mRNA	MM apparente	Liaison du FGF			
					Isoformes	FGF-1	FGF-2	KGF
FGFR-1	<i>flg, cek 1</i>	8p12	4.2, 4.3 kb	150 kDa	IIIc	++	++	-
					IIIb	++	+	nd
FGFR-2	<i>bek, cek 3</i> K-sam KGFR	10q26	4.4 kb	135 kDa	IIIc	++	++	-
					IIIb	++	+	++
FGFR-3	<i>flg-2, cek 2</i>	4p16.3	4.5, 7.5 kb	135 kDa	IIIc	++	+	-
FGFR-4		5q35	3.0 kb	110 kDa	IIIc'	++	+	-

Tableau 1 : Principales caractéristiques des récepteurs à activité tyrosine kinase du FGF ou FGFR. Les signes (+) et (++) indiquent respectivement une constante de dissociation de l'ordre de quelques dizaines ou quelques centaines de picomoles. Les valeurs de Kd respectifs n'ont pas été reportées car il existe encore quelques incertitudes. (nd = non déterminé).

D'après Partanen et al. 1993 ; Chellaiah et al. 1994 ; Bellot 1994.

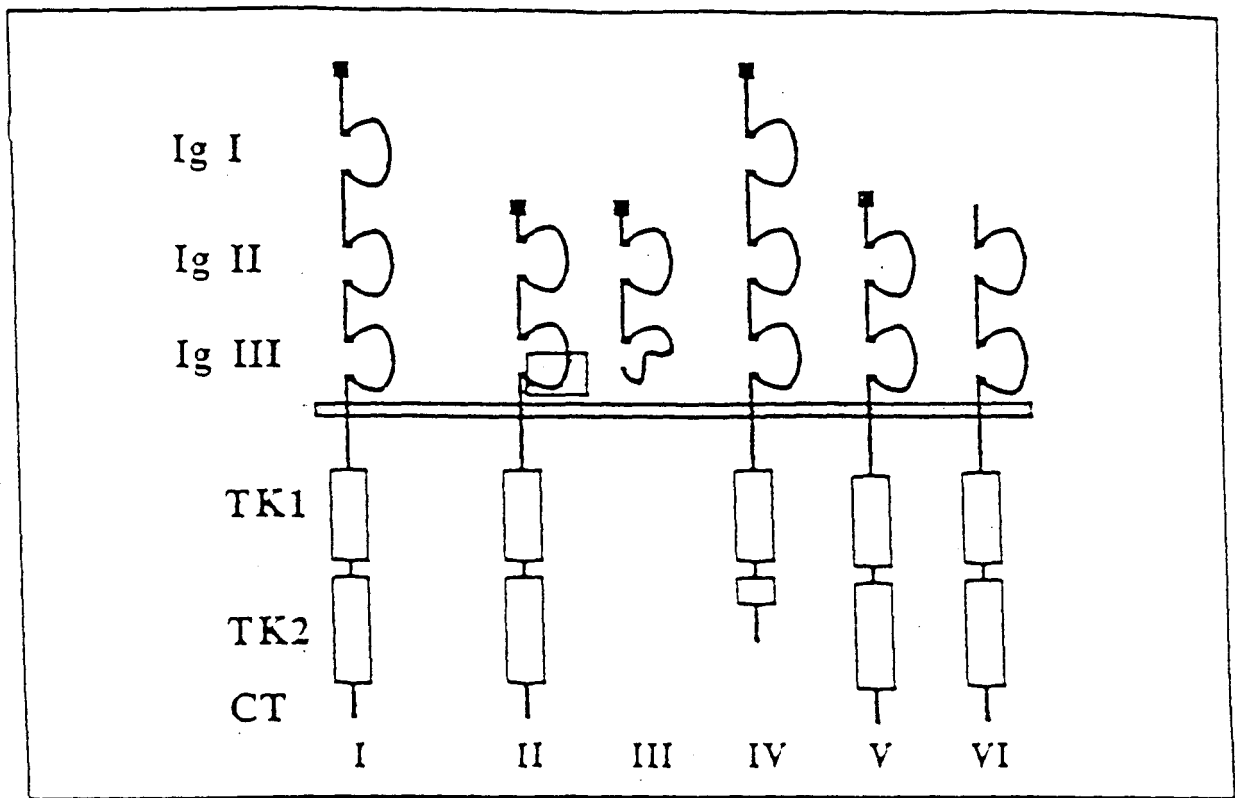


Figure 6 : Différents FGFR-1 peuvent être générés par épissage alternatif.

L'utilisation des différents exons permet d'obtenir par épissage alternatif, différentes isoformes des FGF-1. Les variations observées incluent :

- une délétion de 2 acides aminés (FGFR-1 II et FGFR-1 V)
- une boucle immunoglobuline totale

Ces formes à deux boucles immunoglobuliniques sont les isoformes les plus fréquentes.

- le domaine intracellulaire, la région transmembranaire et une partie de la troisième boucle immunoglobuline (FGFR-1 III).

Ces isoformes correspondent aux formes sécrétées du FGFR-1.

- une partie du domaine catalytique à activité tyrosine kinase (FGFR-1 IV). Ce récepteur a perdu des sites potentiels d'autophosphorylation et pourrait jouer un rôle modulateur de dominant négatif par formation d'hétérodimères avec des FGFR complets.

- le signal de sécrétion (FGFR-1 VI)

D'après Fernig et Gallagher, 1994.

L'affinité des récepteurs transmembranaires vis à vis de certains FGF, peut varier selon qu'ils résultent de la transcription des exons IIIb ou IIIc (revue Johnson et Williams, 1992 ; Partanen et al. 1993). Le tableau 1 résume les connaissances actuelles sur la fixation des FGF à leurs quatre récepteurs et plus précisément, à leurs différentes formes d'épissage (Partanen et al. 1993 ; Zimmer et al. 1993 ; Bellot, 1994 ; Cheon et al. 1994 ; Chellaiah et al. 1994).

Ces différents résultats ont été obtenus à partir de cellules transfectées avec des vecteurs d'expression portant les ADNc codant pour l'un ou l'autre des récepteurs. Le FGF-1 se lie à tous les types de récepteurs. Le FGF-2 se lie aux quatre types de récepteurs, mais avec une affinité réduite pour les isoformes IIIb ainsi que pour le FGFR-3 et le FGFR-4. On notera que le KGF (ou FGF-7) se lie par contre, uniquement à une isoforme particulière de FGFR-2, l'isoforme IIIb, aussi appelée de ce fait, récepteur du KGF ou KGFR (Miki et al. 1991 ; Yayon et al. 1992). Cette isoforme peut lier néanmoins le FGF-1 et le FGF-2 (Miki et al. 1991 ; Reich-Slotky et al. 1994).

Ces données mettent en évidence un système complexe ligand-récepteur caractérisé par différentes redondances. Ainsi, non seulement un même gène peut donner naissance à plusieurs isoformes du même récepteur, mais en plus, un récepteur donné peut fixer différents membres de la famille des FGF avec une affinité plus ou moins grande.

II-5 - Voies de signalisation intracellulaire.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont essentiellement des récepteurs de facteur de croissance, qui permettent la transmission du signal mitogène selon un schéma général dont les composantes commencent à être connues (Ullrich et Schlessinger, 1990 ; Fantl et al. 1993). La fixation du facteur de croissance sur le récepteur conduit à son activation. Les récepteurs activés se dimérisent et phosphorylent certains de leurs résidus tyrosines par un mécanisme qu'on appelle autophosphorylation. Des protéines à domaines SH2 (Src Homology 2) et SH3 peuvent alors se fixer sur les tyrosines phosphorylées, être activées à leur tour par phosphorylation et transmettre ainsi le signal à l'élément suivant. La cascade de transduction se propage alors jusqu'au noyau où des facteurs nucléaires (comme

c-myc et fos) sont mis en action pour modifier l'expression génique et par voie de conséquence, la synthèse des protéines (Hondermarck et al. 1994), ceci afin d'enclencher les processus de la division cellulaire (Ullrich et Schlessinger, 1990).

La stimulation des cellules par le FGF-2 conduit à l'augmentation du pH intracellulaire et du taux de calcium interne, de l'hydrolyse des phosphoinositides, mais surtout à celle de la phosphorylation d'un grand nombre de protéines intracellulaires. Certaines de ces protéines ont été identifiées et correspondent notamment à la phospholipase C (PLC γ) (Burgess et al. 1991 ; Shi et al. 1993), mais aussi aux protéines ras/raf1 (McNicol et al. 1993 ; Besser et al. 1995), aux kinases ERK-1 et ERK-2 (Wang et al. 1994 ; Besser et al. 1995), et aux MAP kinases (Pages et al. 1993 ; Campbell et al. 1995 ; Kudla et al. 1995 ; Liu et al. 1995).

Une première voie d'approche dans l'étude des mécanismes de transduction a consisté à utiliser des inhibiteurs spécifiques des tyrosines kinases. Il a ainsi été montré récemment, que ces inhibiteurs (dont la génistéine) peuvent bloquer totalement l'action mitogène du FGF-2 sur les cellules endothéliales bovines en empêchant la phosphorylation de certaines protéines ci-dessus citées (Hawker et Granger, 1994). Mais en fait, l'analyse précise des mécanismes de transduction du signal induit par le FGF-2 a essentiellement bénéficié de l'obtention d'ADNc codant pour les quatre FGFR identifiés. L'étude des propriétés biologiques des mutants produits par délétion ou par mutagenèse dirigée, et de leurs interactions avec des récepteurs normaux a permis d'appréhender les mécanismes d'activation et de transfert du signal des FGFR.

Tout d'abord, il a été montré que l'injection dans des oeufs de Xénope de transcrits de l'ADNc du FGFR-1 délété du domaine cytoplasmique (donc sans activité tyrosine kinase) neutralise les actions biologiques du récepteur normal (Amaya et al. 1991 ; Ueno et al. 1992 ; Li et al. 1994b). Ces constructions sont, de ce fait, appelées mutants dominants négatifs, car capables de former des hétérodimères avec les formes sauvages de FGFR-1 et d'inhiber ainsi la réponse des cellules au FGF-2 (i.e la libération de calcium et l'expression de mRNA d'actine dans les ovocytes) (Amaya et al. 1991 ; Ueno et al. 1992).

Ces résultats mettent en évidence que la transduction du signal requiert bien la formation de dimères des domaines extracellulaires des FGFR. Par ailleurs, des expériences de cotransfections de cellules murines NIH 3T3 avec des vecteurs d'expression portant respectivement l'ADNc du FGFR-2 actif et celui du FGFR-2 dont la fonction kinase a été inactivée par mutagenèse dirigée ("kinase négative") ont montré que l'addition de FGF-1 à ces cellules conduisait à la phosphorylation du FGFR-2/kinase négative. La formation de dimère entre un récepteur "kinase active" et un récepteur "kinase négative" aboutit à la phosphorylation du récepteur muté par le récepteur "kinase active" (Bellot et al. 1991). Ces expériences élégantes ont ainsi permis de mettre en évidence que les FGFR peuvent non seulement s'associer entre eux (FGFR-1 avec FGFR-1 par exemple) mais également entre les différents variants pour former des hétérodimères. Après activation et homo ou hétérodimérisation, les FGFR seraient alors capables de s'autophosphoryler (Bellot et al. 1991).

Par ailleurs, l'expression du FGFR-1 notamment dans les cellules NIH 3T3 (Mohammadi et al. 1991 ; Hou et al. 1993), a permis de mettre en évidence deux sites spécifiques d'autophosphorylation dans le domaine catalytique intracellulaire des FGFR. Ils correspondent au résidu tyrosine 653 (Hou et al. 1993) et au résidu tyrosine 766 (Mohammadi et al. 1991) et semblent conservés pour les quatre FGFR. Plus précisément, cette tyrosine 766 est directement impliquée dans la liaison par son domaine SH2 de la PLC γ (Mohammadi et al. 1991). Outre la PLC γ , il faut noter que l'activation des FGFR peut permettre l'activation des protéines ras/raf-1, avant phosphorylation des MAP kinases et consécutivement la transcription de gènes précoces (Blenis, 1993 ; Lallemain, 1994 ; Campbell et al. 1995).

Les seconds messagers qui interviennent dans la transduction du signal mitogène par les FGFR, sont encore mal connus par rapport à d'autres RTK comme l'EGFR (Ullrich et Schlessinger, 1990 ; Fantl et al. 1993). A l'heure actuelle, aucun consensus n'existe sur le rôle de l'hydrolyse des phosphatidylinositols, l'activation de la protéine kinase C (PKC) ou la mobilisation du calcium intracellulaire dans le mécanisme d'action du FGF-2. Le rôle

du calcium par exemple, apparaît complexe. Il ne semble pas nécessaire à l'activité mitogène du FGF-2, puisque le remplacement de la tyrosine 766 du FGFR-1 par une phénylalanine, ne provoque plus ni l'hydrolyse des phosphatidylinositols, ni la libération de calcium mais n'empêche pas la division cellulaire (Mohammadi et al. 1992 ; Peters et al. 1992) ou l'activité neurotrophique de ce facteur de croissance (Spivak-Kroizman et al. 1994a). Par contre, des inhibiteurs de canaux calciques peuvent bloquer la réponse au FGF-2, en empêchant la croissance des neurites (Williams et al. 1994). De même, l'activation de la PKC peut inhiber la synthèse d'ADN induite par le FGF-2 dans les cellules endothéliales (Doctrow et Folkman, 1987) alors qu'elle semble indispensable pour la mitogenèse des cellules endothéliales bovines aortiques (Presta et al. 1992). Dans les fibroblastes, le FGF-2 est également capable d'activer la PKC (Kaibuchi et al. 1986 ; Nanberg et al. 1990). Il apparaît donc que la complexité du système est grande, tant au niveau des récepteurs que dans la diversité des signaux de transduction, et pourrait rendre compte de la grande diversité des effets biologiques du FGF-2.

II-6 - Expression et régulation des FGFR.

Les données exposées montrent qu'à la possibilité de générer, à partir du même gène, plusieurs isoformes du même récepteur s'ajoute pour un récepteur donné celles de fixer des FGF différents mais aussi d'agir selon différentes voies de transduction.

La nécessité d'un tel système à redondances multiples pourrait s'expliquer par une possible spécificité tissulaire des ligands et surtout des récepteurs. Certaines études ont ainsi montré qu'*in vivo* l'expression des différents FGFR, voire de certaines formes d'épissages, peut être régulée de manière tissu voir cellule spécifique (Patstone et al. 1993 ; Orr-Urtreger et al. 1993 ; revue dans Johnson et Williams, 1993) ou encore selon l'état de prolifération (Xin et al. 1994). De plus, il a été montré récemment dans des cellules murines issues d'un tétatocarcinome (cellules F9) que l'expression des FGFR-2 mais pas des FGFR-1 pouvait être régulée après stimulation de la prolifération par le FGF-4 ou le FGF-2 (Ali et al. 1995).

Par ailleurs, par des études de radiorécepteurs, il a été observé que la quantité de récepteurs de haute affinité pour le FGF-2 diminue au cours de la différenciation du muscle squelettique (Olwin et Hauschka, 1988 ; Olwin et al. 1994) mais aussi des chondrocytes

(Iwamoto et al. 1991). Plus précisément, au cours du développement du cerveau (Hondermarck et al. 1992a) ainsi que dans le placenta (Hondermarck et al. 1990b), la diminution du nombre de récepteurs de haute affinité apparaît concomitante à la diminution des activités de prolifération cellulaire. L'implication d'une dérégulation des FGFR a été envisagée dans les phénomènes pathologiques pour expliquer une dérégulation de la prolifération. Une amplification des gènes des récepteurs a notamment été décrite dans les cancers de l'estomac (Hattori et al. 1990), dans les cancers du pancréas (Kobrin et al. 1993) ainsi que dans les cancers du sein (Adnane et al. 1992 ; Theillet et al. 1993 ; Jacquemier et al. 1994 ; Pennault-Lorca et al. 1995). De plus, des données récentes montrent que l'expression de certaines formes d'épissage des FGFR pourraient également être associées aux phénotypes malins et transformés (Yan et al. 1993 ; Itoh et al. 1994 ; Yamaguchi et al. 1994).

III - Sites de fixation de basse affinité du FGF-2 : Les Protéoglycannes de type Héparane Sulfate.

III-1 - Introduction.

Les protéoglycannes de type héparane sulfates (HSPG) sont des constituants essentiels des cellules animales, localisés à la surface cellulaire et dans les matrices extracellulaires (revue dans Kjellen et Lindahl, 1991). Ces HSPG sont en fait composés d'un axe protéique sur lequel sont liées de manière covalente une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes sulfatés, les héparane sulfates (HS). Cette liaison unique aux HSPG est illustrée en figure 7.

En raison de leur forte densité de charges négatives, notamment portées par leurs groupements sulfates, les HSPG interagissent avec de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire (MEC) et avec des facteurs de croissance, dont notamment le FGF-2 (Ruoslahti et Yamaguchi, 1991 ; Yanagishita et Hascall, 1992). Ils ont ainsi été décrits comme les sites de liaison de basse affinité du FGF-2 ($K_d = 10^{-8}$ - 10^{-9} mol/l) (revue dans Gallagher, 1994 ; Fernig et Gallagher, 1994).

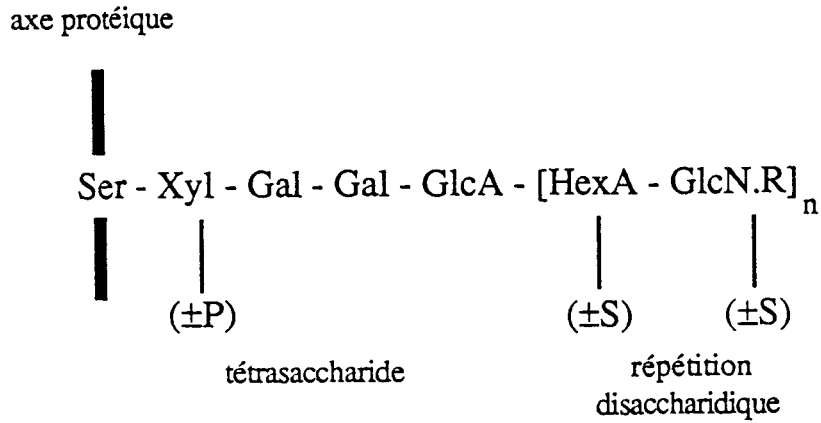


Figure 7 : Région de liaison des chaînes d'heparane sulfates.

Ce type de liaison unique aux protéoglycannes est permise par une liaison O-glycosidique entre le xylose terminal de la séquence tétrasaccharidique GlcA-Gal-Gal-Xyl et un résidu sérine de l'axe protéique. On notera également que le xylose peut être phosphorylé en C2.

(P) = Phosphate ; (S) = SO₃⁻ ; (R) = Acétyl ou SO₃⁻.

D'après Gallagher, 1994.

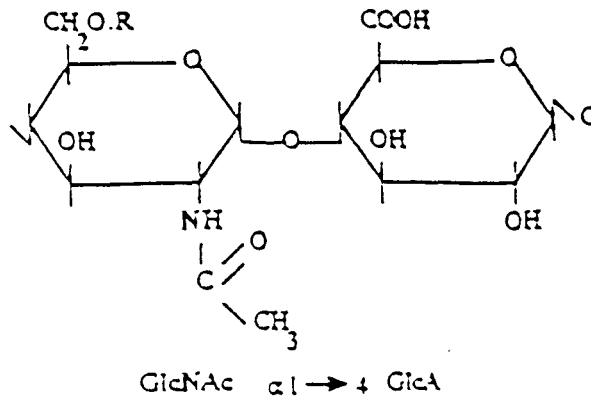
A l'heure actuelle, quatre HSPG ont été caractérisés comme capables de fixer le FGF-2. Le syndecan a été le premier formellement identifié (Kiefer et al. 1990). Il peut contenir jusqu'à 2/3 de chaînes d'HS mais également des chaînes de chondroïtine sulfates (Rapraeger et al. 1985 ; Kokenyesi et Bernfield, 1994 ; Salmivirta et Jalkanen, 1995). Deux autres HSPG de la surface cellulaire ont été identifiés comme capable de lier le FGF-2. C'est tout d'abord le betaglycan, récepteur de type III du TGF β (Lopez-Casillas et al. 1991). Ce protéoglycane a la particularité de lier le TGF β par son axe protéique, indépendamment des chaînes d'HS qui peuvent de leur côté lier le FGF-2 (Andres et al. 1992). Le glypican ensuite, peut également fixer le FGF-2 (Brunner et al. 1991, 1994). Il ne possède pas de domaine transmembranaire mais est retenu à la surface des cellules par un glycoposphatidylinositol (David et al. 1990). Plus récemment, un HSPG de grande taille (400 kDa) de la lame basale, le perlecan, a également été identifié comme pouvant interagir avec le FGF-2, et semble de plus, favoriser l'angiogenèse induite par ce facteur de croissance (Aviezer et al. 1994a).

III-2 - Structure moléculaire et synthèse des chaînes d'HS.

Les héparane sulfates sont des glycosaminoglycannes (GAG) composés d'une chaîne linéaire d'unités disaccharidiques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétyl D-glucosamine de longueurs variées (de 50 à 150 sucres). La glucosamine peut être soit N-acétylée (GlcNAc), soit N-sulfatée (GlcNSO₃). La glucosamine N-acétylée est toujours liée à un acide glucuronique (GlcA) par une liaison α 1-4, alors que le résidu GlcNSO₃ peut être lié, soit à un acide glucuronique (GlcA), soit à un acide iduronique (IdoA), qui correspond à la forme épimérisée en C5 de l'acide glucuronique (figure 8).

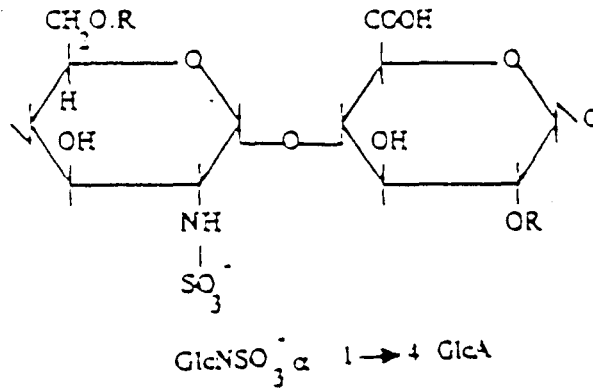
La synthèse des chaînes d'HS a lieu au sein du Golgi sur un axe protéique contenant un site spécifique d'attachement des GAG (séquence Ser-Gly) (Zhang et Esko, 1994). Le premier sucre est toujours un xylose qui se lie par une liaison O-glycosidique à une sérine de la protéine (figure 7). Il faut noter que les chaînes d'héparanes sont initialement synthétisées comme un polymère précurseur non sulphaté, composé exclusivement de disaccharides N-acétylés.

1 - Motif N-Acétylé.



2 - Motif N-Sulfaté.

(a) avec un acide glucuronique (GlcA).



(b) avec un acide iduronique (IdoA).

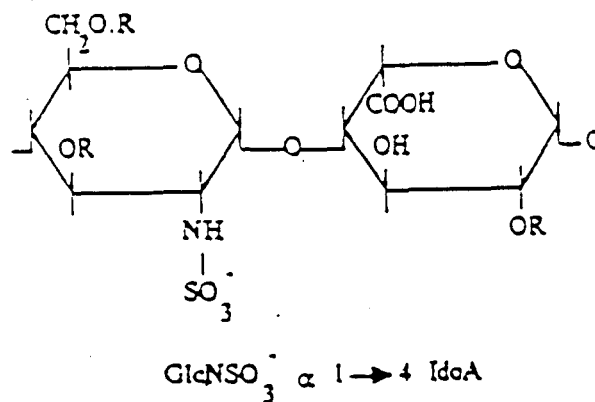


Figure 8: Unité disaccharidique des HS. Les résidus N-sulfatés et N-acétylés peuvent constituer le motif disaccharidique spécifique des HS. Le motif N-acétylé (1) contient une N-acétylglucosamine (GlcNAc) et un acide glucuronique (GlcA) et peut être sulfaté en C6 de la GlcNAc. Dans le motif N-sulfaté (2), un groupement sulfate remplace le groupement acétyl dans le résidu de glucosamine, et l'acide hexuronique peut être soit un glucuronate (GlcA), soit un iduronate (IdoA) (respectivement a et b). Il y a ainsi 5 sites potentiels de sulfatation dans les HS. Le C6 des sucres aminés ainsi que le C2 de l'iduronate sont les sites de sulfatation les plus fréquents. La sulfatation des C3 de GlcNSO₃ et du C2 de GlcA sont des événements beaucoup plus rares.

D'après Gallagher et al. 1992.

Ces chaînes polysaccharidiques seront ensuite modifiées : elles peuvent être N-acétylées et/ou N-sulfatées sous l'action d'une batterie d'enzymes spécifiques agissant de manière concertée (revue dans Lindahl, 1989).

Comme indiqué figure 9, la première modification est une déacétylation (1) et une N-sulfatation (2) de la majorité des résidus de glucosamine (GlcN). Cette seconde étape est strictement dépendante de la disponibilité du donneur de sulfate, le 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), qui est la forme active du sulfate, et nécessite une N-sulfotransférase spécifique. Les résidus d'acides glucuroniques (GlcA) peuvent ensuite être épimérisés en acide iduronique (IdoA) (3), par action d'une C5-épimérase. Le polysaccharide sera ensuite modifié par substitution de groupements ester-O-sulfate (4) en C2 de l'IdoA et/ou en C6 des résidus de GlcN. Environ 50 % des résidus de GlcNAc sont sulfatés (GlcNSO₃) au sein des chaînes d'HS. La sulfatation est réalisée grâce à la présence d'enzymes spécifiques, les O-sulfotransférases. Des séquences plus rares de sulfatation peuvent également avoir lieu en C3 des résidus de glucosamine ou en C2 des acides glucuroniques (Lindahl, 1989).

Ces nombreuses modifications donnent naissance à des produits finaux multiples et variés tant dans leur structure que dans leur sites sulfatés. La répartition spécifique des sucres sulfatés au sein du polymère génère des zones ou domaines hautement sulfatés séparés par des séquences riches en résidus N-acétylés, peu sulfatés (figure 10).

Cette organisation confère une grande hétérogénéité à la molécule et semble primordiale dans les capacités de liaison et d'interaction avec des éléments de la matrice extracellulaire. Par exemple, le GlcNSO₃ sulfaté en C3 semble un élément essentiel de la séquence pentasaccharidique initialement découverte dans l'héparine (Lindahl 1989) :



Cette séquence est capable de lier avec une très grande affinité l'antithrombine III, et serait conséquemment responsable des propriétés anticoagulantes de l'héparine.

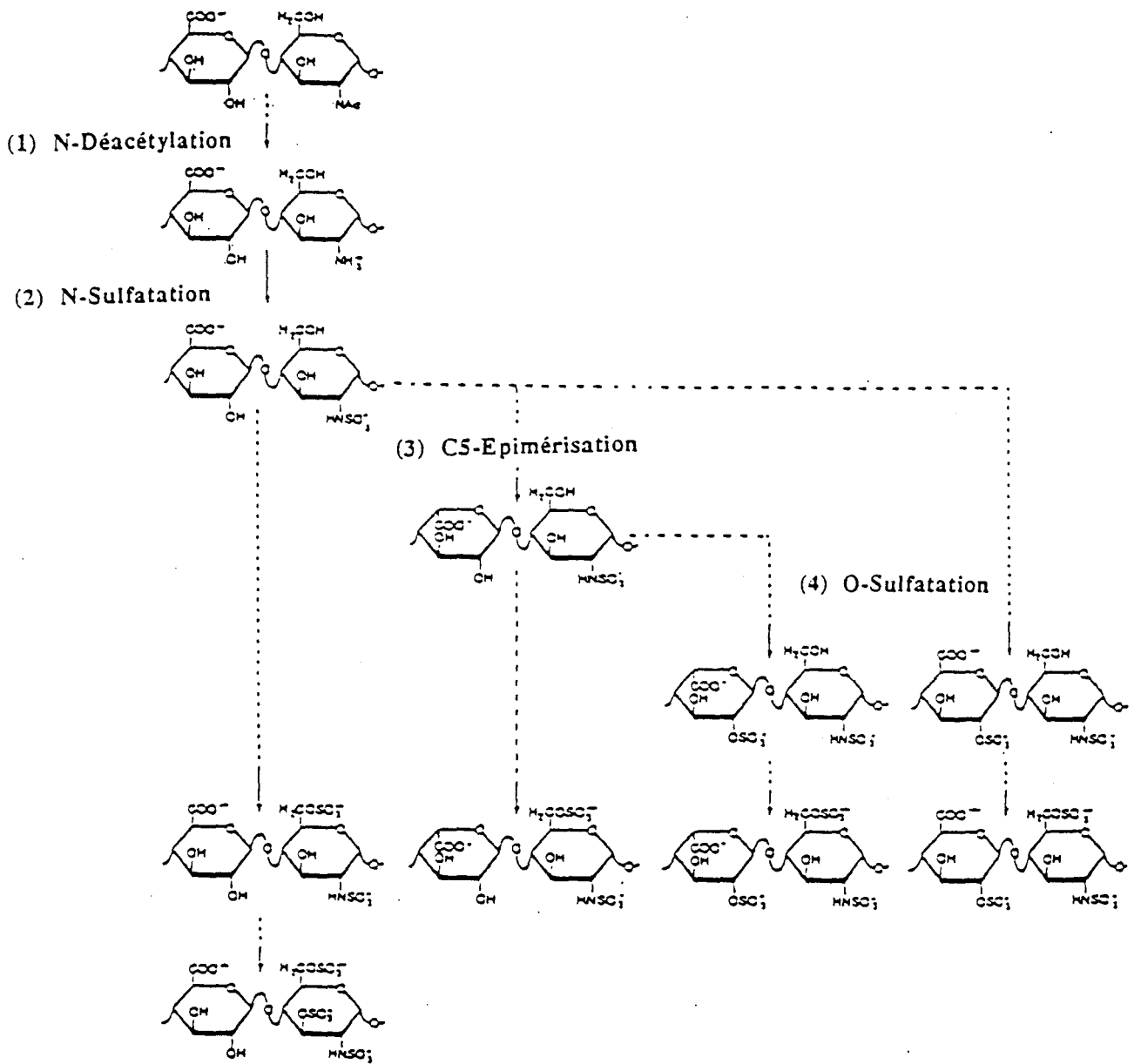


Figure 9 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles impliquées dans la biosynthèse des HSPG. A partir d'un précurseur polysaccharidique non sulfaté, un ensemble de modifications post-traductionnelles (1 à 4) doivent conduire à un polymère riche en domaines N-sulfatés. (1) N-déacétylation des unités de GlcNAc, (2) N-Sulfatation des groupements amines libres, (3) l'épimérisation en C-5 des résidus d'acide glucuronique (GlcA) en acide iduronique (IdoA), (4) une O-Sulfatation en C-2 des résidus d'IdoA et/ou en C-6 des glucosamines. Le processus de ces modifications du polymère est rapide et conduit à une très grande diversité structurale des HSPG. D'après Lindahl et Kjellen, 1991.

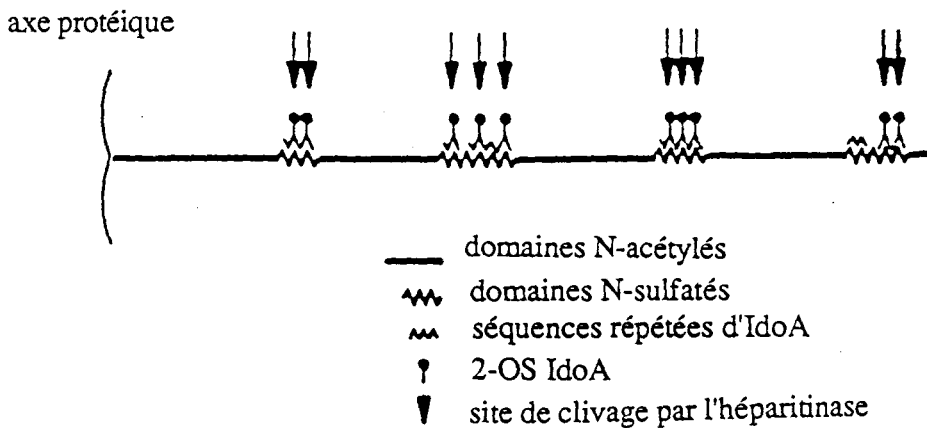


Figure 10 : Représentation schématique de la structure en domaine des chaînes d'héparane sulfates (HS).

Les chaînes linéaires d'HS présentent une structure organisée en domaines plus ou moins sulfatés. Les courts domaines N- et O-sulfatés, riches en résidus iduronate (IdoA), sont séparés par de longues séquences oligosaccharidiques ayant un faible contenu en résidus sulfatés et dont la majorité des glucosamines sont N-acétylées. Plus précisément, les séquences N-acétylées présentent une longueur moyenne d'environ 18 disaccharides tandis que les domaines N-sulfatés contiennent approximativement 5 disaccharides. Le premier site de clivage par l'héparinase est situé en moyenne à 16 disaccharides de la zone liaison de la chaîne d'HS à l'axe protéique. La taille, la distribution des domaines sulfatés le long de la chaîne d'HS ainsi que le contenu en IdoA varient de manière spécifique d'un type cellulaire à un autre et semblent rendre compte des capacités de liaison des HSPG.

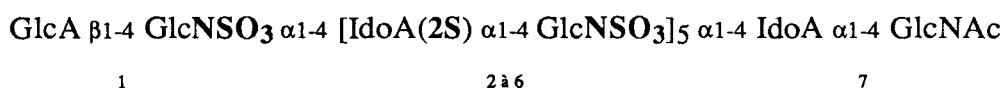
D'après Gallagher et al. 1992.

III-3 - HSPG et FGF-2.

La capacité de l'héparine à lier le FGF-2 est bien connue puisqu'elle permet de purifier de manière sélective ce facteur de croissance également appelé Heparin Binding Growth Factor (Burgess et Maciag, 1991). L'héparine augmente la stabilité du FGF-2 en le protégeant de la dénaturation par la chaleur et le pH (Gospodarowicz et Cheng, 1986 ; Sommer et Rifkin, 1989). De même, un pH acide (pH 4) ne permet pas de dissocier le FGF-2 des HSPG membranaires (Moscatelli, 1987). L'héparine permet également de protéger le FGF-2 vis à vis de la dégradation protéolytique (Saksela et al. 1988 ; Sommer et Rifkin, 1989). Ce rôle protecteur de la dégradation enzymatique dépend essentiellement de la taille ainsi que du degré de sulfatation de l'héparine comme des HS liant le FGF-2 (Habuchi et al. 1992 ; Coltrini et al. 1993). La liaison spécifique de ¹²⁵I FGF-2 aux HSPG de la matrice extracellulaire est totalement inhibée après un traitement par l'héparinase, ou encore est déplacée en présence d'héparine (Bashkin et al. 1989 ; Hondermarck et al. 1990a). Par contre, aucun déplacement n'est observé en présence de glycosaminoglycannes tels que les chondroïtine sulfates ou en présence d'héparine désulfatée (Bashkin et al. 1989 ; Ishai-Michaeli et al. 1992), soulignant l'importance de la sulfatation dans les fonctions de liaison des HSPG. Par ailleurs, les HSPG de la matrice extracellulaire permettent également la diffusion du FGF-2 (Flaumenhaft et al. 1989) et contrôlèrent ainsi leur biodisponibilité (Vlodavsky et al. 1991). En effet, ils représentent une source de FGF-2 pour une stimulation à long terme des cellules vasculaires endothéliales, mais également pour la différenciation de cellules PC12 (Rogelj et al. 1989). Ces données ont déterminé le rôle de "réservoir" des HSPG de la surface cellulaire pour le FGF-2 (Flaumenhaft et al. 1990). Ce facteur de croissance ainsi immobilisé par les HSPG peut être libéré après un traitement par la plasmine (Flaumenhaft et al. 1989 ; Saksela et al. 1990), l'héparinase (Ishai-Michaeli et al. 1990), la phospholipase C et D (Brunner et al. 1991, 1994) ou encore la thrombine (Benezra et al. 1993). Le FGF-2 complexé aux chaînes d'HS peut alors aller agir sur des cellules cibles (revue dans Vlodavsky et al. 1991) et permettre par exemple, la stimulation de la production de l'activateur du plasminogène (Saksela et Rifkin, 1990). Ce complexe est beaucoup plus stable que le FGF-2 libre et permet ainsi une plus grande diffusion de ce facteur de croissance (Flaumenhaft et al. 1990).

Récemment, différentes équipes ont tenté de déterminer la séquence oligosaccharidique des HS capables de lier le FGF-2. Cette dernière semble être caractérisée par des domaines hautement sulphatés riches en GlcNSO₃ et surtout en acide iduronique (IdoA) sulfaté en C2 (Turnbull et al. 1992 ; Habuchi et al. 1992 ; Maccarana et al. 1993 ; Tyrrell et al. 1993 ; Ishihara et al. 1993a, 1994 ; Walker et al. 1994).

La première séquence oligosaccharidique liant le FGF-2 avec une grande affinité a été isolée de fibroblastes de peau humaine (Turnbull et al. 1992). Après excision spécifique des domaines sulfatés des HS par l'héparitinase, ces auteurs ont purifié sur colonnes de chromatographie d'affinité, une séquence saccharidique de 7 unités de disaccharides (degré de polymérisation ou dp 14) capable de se lier fortement au FGF-2 et l'ont nommée séquence Oligo H :

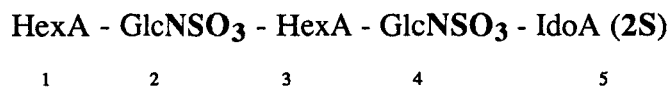


Séquence Oligo H

Il faut noter l'absence particulière dans cette séquence Oligo H de groupements sulfates en C6, qui est pourtant un résidu majeur dans l'héparine. Par contre, les résidus iduronates (IdoA 2S) apparaissent essentiels aux fonctions de liaison des HS au FGF-2. En effet, d'autres séquences oligosaccharidiques (dp = 12) ayant un faible contenu en IdoA mais de grandes proportions de groupements sulfatés en C6 présentent une affinité réduite ou intermédiaire pour le FGF-2 (Walker et al. 1994). De même, à partir de PG issus de l'aorte, Habuchi et ses collaborateurs (1992) ont montré l'importance des résidus IdoA 2S dans des séquences d'HS liant le FGF-2.

Le rôle significatif de la 2-O-sulfatation dans la liaison au FGF-2 a également été reporté par d'autres auteurs travaillant sur les HS, l'héparine ou différents fragments de la molécule initiale (Maccarana et al. 1993 ; Ishihara et al. 1993a, b ; Walker et al. 1994 ; Ishihara et al. 1994a).

Par ces travaux, la séquence saccharidique minimale capable de lier le FGF-2, a pu être déterminée (Maccarana et al. 1993) ; elle présente une affinité beaucoup plus faible pour le FGF-2 que la séquence Oligo H. Elle correspond à un pentasaccharide dont la structure est la suivante :



Différentes études ont montré que l'activation du FGF-2 requiert en fait une séquence minimum de 5 à 6 disaccharides N-sulfatés (dp 10-12) et l'activité mitogène optimale est obtenue avec des fragments de taille de dp 14-16 (Ornitz et al. 1992 ; Ishihara et al. 1993a, 1994; Guimond et al. 1993 ; Walker et al. 1994). Dans ces structures actives, les séquences sulfatées présentent un haut degré de IdoA 2S et de GlcNSO₃, alors que les groupements 6-O-sulfates sont des substitutifs mineurs (Walker et al. 1994). Cependant l'utilisation d'héparines partiellement désulfatées suggèrent que les groupements 6-O-sulfates (Guimond et al. 1993 ; Rusnati et al. 1994) pourraient avoir un rôle dans le mécanisme d'activation du facteur de croissance au sein d'un complexe ternaire FGF-2/HSPG/FGFR. En effet, des héparines spécifiquement désulfatées en C6 n'activent pas le FGF-2 bien qu'elles se lient aux récepteurs FGFR aussi fortement que l'héparine native (Guimond et al. 1993 ; Rusnati et al. 1994). De plus, ces polysaccharides désulfatés lorsqu'ils sont en forte concentration, entrent en compétition directe avec l'héparine et peuvent empêcher ainsi l'activation du FGF-2 (Guimond et al. 1993). Ces résultats ont permis d'établir l'hypothèse selon laquelle les séquences actives des HS possèdent deux sites distincts : un pour la liaison du FGF-2 (IdoA 2S), et un second au sein duquel les groupements sulfates en C6 contribueraient à la reconnaissance du récepteur de haute affinité (Guimond et al. 1993 ; Rusnati et al. 1994). L'existence d'un domaine capable de fixer l'héparine au sein du récepteur à activité tyrosine kinase est bien documentée (Kan et al. 1993 ; Pantoliano et al. 1994 ; Thompson et al. 1994 ; McKeenan et Kan, 1994 ; Spivak-Kroizman et al. 1994b). Par ailleurs, il a été montré que l'héparine peut induire un changement de conformation de la molécule de FGF-2 (Pretreliki et al. 1992) et également permettre la dimérisation du FGF-2 comme du FGF-1 (Ornitz et al. 1992 ; Zhu et al. 1993 ;

Mach et al. 1993 ; Spivak-Kroizman et al. 1994b). Ces derniers auteurs ont alors proposé qu'une oligomérisation des FGFs puisse être responsable de la dimérisation des FGFR, de leur activation et consécutivement de la prolifération cellulaire. A l'aide de récepteurs purifiés solubles, il faut noter que des études récentes reportent que l'héparine ou les HS ne sont pas indispensables à la liaison du FGF-2 (Roghani et al. 1994 ; Pantoliano et al. 1994), mais permettent d'augmenter fortement l'affinité de la liaison du FGF-2 à son récepteur. Pantoliano et al. (1994) ont ainsi défini les caractéristiques de liaisons entre le FGF-2 et l'héparine, le FGF-2 et le FGFR, le FGFR et l'héparine au sein d'un complexe d'activation tel que l'avait proposé Nugent et Edelman (1992).

Différentes approches expérimentales ont permis de mettre en évidence l'implication de l'héparine ou des HS, dans l'activité mitogène du FGF-2 (Rapraeger et al. 1991 ; Yayon et al. 1991 ; Heath et al. 1991 ; Ornitz et al. 1992). Tout d'abord, Rapraeger et al. (1991) ont montré que les fibroblastes 3T3 ainsi que les myoblastes MM14 deviennent incapables de répondre au FGF-2, après un traitement par l'héparinase, ou lorsque ces cellules sont cultivées en présence d'un inhibiteur de la sulfatation des PG. Seule une addition d'héparine ou d'HS ($dp > 8$) dans le milieu de culture, permet de restaurer l'activité mitogène du FGF-2. De leur côté, après transfection par le FGFR-1 de cellules mutantes CHO (pour Chinese Hamster Ovary) ayant une synthèse déficiente en HS, Yayon et al. (1991) ont mis en évidence que le FGF-2 était incapable de se lier à ces récepteurs à moins que de l'héparine exogène soit apportée dans le milieu de culture. Dans ce même système, Ornitz et al. (1992) ont montré que les interactions entre le FGFR et l'héparine sont indispensables à l'activité mitogène du FGF-2. De même, Heath et al. (1991) ont observé que des mutations spécifiques ciblées dans le domaine de liaison de l'héparine du FGF2, pouvaient empêcher l'activité mitogène de ce facteur sur des fibroblastes humains.

On notera que d'autres membres de la famille des FGF nécessitent également la présence d'héparine ou de séquences spécifiques d'HS sulfatés (Olwin et Rapraeger, 1992 ; Mansukhani et al. 1992 ; Chernousov et Carey, 1993 ; Nurcombe et al. 1993 ; Reich-Slotky et al. 1994) pour permettre leur activité mitogénique.

Les HS, en fonction de leurs caractéristiques structurales et de leur degré de sulfatation peuvent présenter des affinités différentes pour chaque FGF (Chernousov et Carey, 1993 ; Guimond et al. 1993 ; Ishihara, 1994b). Les structures oligosaccharidiques capables de lier et d'activer le FGF-1 et le FGF-4 semblent ainsi différentes de celles nécessaires pour la fixation et l'activation du FGF-2 (Ishihara, 1994a, b ; Guimond et al. 1993). De plus, Nurcombe et al. (1993) ont montré l'existence d'une régulation possible de la réponse au FGF-1 et au FGF-2, par des HSPG capables de présenter une affinité différente pour ces facteurs de croissance, au cours du développement embryonnaire du cerveau. Des modifications structurales très fines des HS, notamment au niveau de leur sulfatation, pourraient ainsi rendre compte de la sensibilité des cellules aux différents membres de la famille des FGF.

III-4 - Régulation de l'expression des HSPG fixant le FGF-2.

Les HSPG décrits comme sites de liaison de basse affinité du FGF-2 dans de nombreux modèles (Moscatelli, 1987, revue dans Gallagher 1994) sont largement distribués dans les matrices extracellulaires. L'expression de certains HSPG comme les syndecans peut être régulée de manière cellule- voire tissus-spécifiques, et variée suivant le stade de développement (Kim et al. 1994 ; Sanderson et al. 1994 ; revue dans Elenius et Jalkanen, 1994; Salmivirta et Jalkanen, 1995). Par ailleurs, récemment, Schmidt et al. (1995) ont montré que les cellules musculaires lisses de l'aorte étaient capables de modifier les caractéristiques structurales de leur HS en fonction de l'activité de prolifération.

Chez l'embryon, une augmentation des sites de liaison de basse affinité a été observée en fonction du stade de développement, dans le placenta de souris (Hondermarck et al. 1990b) ainsi que dans le cerveau de poulet (Hondermarck et al. 1992a) ; de plus, ces augmentations sont corrélées avec une perte de sites de haute affinité et avec la diminution des activités de prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent que les sites de fixation de basse affinité peuvent être des régulateurs potentiels de l'interaction du FGF-2 avec leur récepteur de haute affinité et donc de l'activité de ce facteur de croissance.

D'une manière particulièrement intéressante, Hondermarck et al. (1992b) ont ensuite démontré que les HS purifiés du cerveau en développement sont capables d'inhiber l'interaction du FGF-2 avec ses récepteurs membranaires et la prolifération induite par ce facteur de croissance. Ces résultats montrent que les sites à basse affinité pourraient être des régulateurs négatifs de l'interaction du FGF-2 avec les récepteurs de haute affinité.

IV - Présentation du modèle.

IV-1 - Introduction.

Le but de notre étude est de déterminer le rôle de protéoglycannes de type héparane sulfate dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules de cancer du sein.

Dans la glande mammaire normale, il faut noter que les protéoglycannes sont des éléments essentiels de la matrice extracellulaire, dont la nature et la distribution varient au cours du développement et selon la prolifération cellulaire (Silberstein et Daniel, 1982 ; Silberstein et al. 1990 ; Beck et al. 1993). Ces protéoglycannes interagissent avec les autres composés matriciels (les collagènes I et IV, la laminine, la fibronectine) afin de constituer une matrice extracellulaire fonctionnelle (revues dans Kjellen et Lindahl, 1991 ; Salmivirta et Jalkanen, 1995) ; ils participent ainsi à la morphogenèse et à la différenciation des cellules épithéliales mammaires (Parry et al. 1985 ; Lee et al. 1985 ; Patersen et al. 1992 ; Beck et al. 1993). Ils peuvent également permettre, après transfection du gène codant pour le syndecan-1, d'induire un phénotype différencié dans le cas de cellules mammaires tumorales murines (Leppa et al. 1992). Comme nous l'avons déjà signalé, les protéoglycannes de type héparane sulfate interagissent aussi avec des facteurs de croissance et plus particulièrement avec le FGF-2 (Fernig et Gallagher, 1994 ; Salmivirta et Jalkanen, 1995). Nous nous sommes intéressés dans cette étude, au(x) rôle(s) des HSPG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires en culture, dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2. Avant de préciser notre démarche expérimentale, nous allons tout d'abord rappeler les données de plus en plus nombreuses, sur l'implication du FGF-2 et de ses sites de liaisons dans la prolifération des cellules mammaires normales et cancéreuses.

IV-2 - Expression des FGF dans la glande mammaire.

Dans la glande mammaire en développement, des études ont montré que le FGF-2 est localisé dans la lame basale et en moins grande quantité dans les cellules myoépithéliales chez le rat (Rudland et al. 1993a) comme chez la souris (Coleman-Kmacik et Rosen, 1994).

In vivo, le FGF-2 et ses transcrits (ARNm) sont synthétisés par les cellules normales myoépithéliales de rat (Barraclough et al. 1990) ou humaines (Ke et al. 1993) mais pas dans les cellules épithéliales. Par immunocytochimie, le FGF-2 a été détecté dans les tissus sains ou les lésions bénignes (Gomm et al. 1991 ; Rudland et al. 1993b). Récemment, par RT-PCR et/ou Northern Blot, plusieurs équipes ont également mis en évidence l'expression spécifiques du FGF-2 dans une très grande majorité des biopsies tumorales de cancer du sein (Luqmani et al. 1992 ; Anandappa et al. 1994 ; Pennault-Lorca et al. 1995). Par dosage immuno-enzymatique (EIA), une augmentation de la concentration sérique de FGF-2 a également été décrite chez les patientes présentant un cancer du sein (Kurobe et al. 1993) et cela, dès les premiers stades de la cancérogénèse (Takei et al. 1994).

In vitro, le FGF-2, comme le FGF-1, sont également produits par les cellules épithéliales cancéreuses mammaires en culture (Luqmani et al. 1992 ; Fernig et al. 1993 ; Ke et al. 1993 ; Anandappa et al. 1994 ; Smith et al. 1994 ; Souttou et al. 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Pennault-Llorca et al. 1995).

L'implication d'autres membres de la famille des FGF a également été reportée dans le cancer du sein. L'amplification des deux oncogènes, *int-2* et *hst-1*, a été reportée dans les biopsies humaines (Lidereau et al. 1988 ; Theillet et al. 1989 ; Meyers and Dudley, 1992). Theillet et al. (1989) ont montré par *hybridation in situ* que les oncogènes *hst* et *int-2* sont présents dans les cellules tumorales et sont co-amplifiés dans 17 % des cancers de sein. Par ailleurs, la transfection de l'ADNc du FGF-4 dans les cellules hormono-dépendantes MCF-7 modifie leur pouvoir invasif et induit un phénotype tumorigène métastatique (Kurebayashi et al. 1993 ; MacLesley et al. 1993). Récemment, la présence de ARNm d'un autre membre de cette famille de facteurs de croissance, le KGF (ou FGF-7) a également été détecté par RT-PCR dans des tumeurs cancéreuses mammaires (Koos et al. 1993).

Le KGF s'est révélé un mitogène puissant *in vitro* pour les cultures primaires d'épithélium mammaire de souris (Imagawa et al. 1994) et, *in vivo*, il permet la prolifération de l'épithélium de la glande mammaire de rat (Ulich et al. 1994). Il faut également noter qu'un des derniers membres identifiés de la famille des FGF, le FGF-8 a été purifié du milieu conditionné de cellules cancéreuses mammaires murines (carcinome Shionogi 115) (Tanaka et al. 1992) et permet la croissance autocrine de ces cellules (Tanaka et al. 1992 ; Sato et al. 1993 ; Sumitani et al. 1993).

IV-3 - Effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules mammaires.

Dans les structures en développement, le FGF-2 stimule la croissance des cellules myoépithéliales, des cellules souches intermédiaires, des bourgeons terminaux mais est incapable de stimuler la croissance des cellules épithéliales ductales (Fornig et al. 1990).

Lorsqu'elles sont cultivées en gel de collagène, les cellules épithéliales issues de glande mammaire normale de souris sont stimulées à proliférer en présence de FGF-2, et synthétisent moins de caséine, un marqueur de la différenciation mammaire (Levay-Young et al. 1989).

Les cellules issues de biopsies tumorales, cultivées en culture primaire sont sensibles à la stimulation par le FGF-2 (Takahashi et al. 1989). Sur les lignées cellulaires, ce facteur de croissance stimule nettement la prolifération des cellules hormono-dépendantes MCF-7 et T47-D (Karey et al. 1988 ; Daly et al. 1988 ; Peyrat et al. 1991, 1992 ; Briozzo et al. 1991 ; Stewart et al. 1992 ; Sutherland et al. 1992 ; Musgrove et al. 1993). Par contre, aucun effet mitogène du FGF-2 n'a été reporté sur les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 (Peyrat et al. 1991), les cellules transformées (Souttou et al. 1994) ou sur les cellules normales en culture primaire (Shiwei et al. 1992 ; Sakthivel et al. 1993).

IV-4 - Récepteurs du FGF-2 dans la glande mammaire.

Le FGFR-1 est amplifié dans les biopsies mammaires cancéreuses (Adnane et al. 1991 ; Theillet et al. 1993 ; Jacquemier et al. 1994 ; Pennault-Llorca et al. 1995). Une amplification des gènes des FGFR-2 et des FGFR-4 a également été observée dans les biopsies tumorales du sein (Adnane et al. 1991 ; Luqmani et al. 1992 ; Pennault-Llorca et

al. 1995). Les FGFR-3 n'ont par contre, pas été détectés dans les cellules en culture ou dans les biopsies (Pennault-Llorca et al. 1995). L'isoforme à deux boucles immunoglobuliniques du FGFR-1 apparaît comme la forme d'expression dominante dans les biopsies tumorales comme dans les lignées cellulaires (Luqmani et al. 1992 ; Pennault-Llorca et al. 1995). Il faut noter que les gènes des récepteurs des FGFR sont parfois coamplifiés avec d'autres gènes comme *myc* ou *bcl1* (Adnane et al. 1991).

La répartition des sites membranaires de liaison de haute et de basse affinité ont également été décrite dans les cellules issues de glande mammaire normale, dans les biopsies tumorales ainsi que dans les lignées épithéliales cancéreuses mammaires (Fernig et al. 1990 ; Peyrat et al. 1991 ; Fernig et al. 1992 ; Peyrat et al. 1992 ; Fernig et al. 1993). Les sites de liaison de haute affinité ont été ainsi observés sur les cellules normales (Fernig et al. 1990, 1992, 1993), les lignées cancéreuses (Peyrat et al. 1991) ainsi que dans 19/36 biopsies tumorales humaines (Peyrat et al. 1992). Par contre, si toutes les lignées cancéreuses mammaires étudiées possèdent des sites de liaison de haute affinité, la quantité de sites de basse affinité peut présenter des variations très importantes. En effet, Peyrat et al. (1991) ont observé que des cellules hautement invasives MDA-MB-231 présentent beaucoup de sites de liaison de basse affinité au sein de leur membrane au contraire des cellules MCF-7 sur lesquelles ils n'ont pu être mis en évidence par dosage radiorécepteurs.

IV-5 - Hypothèse et démarche expérimentale.

Les travaux de Peyrat et al. (1991, 1992) ont révélé l'existence d'une sensibilité différente au FGF-2 de cellules possédant des sites de liaison de haute affinité en nombre comparable. Par contre, la quantité des sites de liaison de basse affinité (i. e. protéoglycannes de type héparane sulfate) apparaît dramatiquement différente. Ces sites sont en effet, présents en très grand nombre au niveau des cellules peu ou pas sensibles au FGF-2 (BT 20, MDA-MB-231), mais ne sont pas détectés au niveau des types cellulaires répondant très bien à la stimulation de ce facteur de croissance (MCF-7, T47D).

Les précédents travaux menés dans notre laboratoire sur le placenta (Hondermarck et al. 1990b) et au cours du développement du cerveau (Hondermarck et al. 1992a, b), nous ont amenés à penser que des différences de sensibilité des cellules cancéreuses mammaires au FGF-2 pourraient être due à une nature et/ou à une distribution différentes des sites de liaison de basse affinité.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous déterminerons, dans un premier temps, par une étude cytométrique approfondie, l'effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires hormono-dépendantes (lignée MCF-7), hormono-indépendantes et métastatiques (lignée MDA-MB-231) ainsi que sur des cellules transformées (lignée HBL 100), utilisées comme cellules de référence (chapitre 2).

Nous étudierons ensuite, après purification et fractionnement chromatographiques, la nature et la répartition des protéoglycannes synthétisés par les cellules présentant une différence de sensibilité pour le FGF-2 (chapitre 3).

Enfin, nous déterminerons les capacités d'interaction des protéoglycannes purifiés avec le FGF-2, et l'effet de ces mêmes PG sur l'activité mitogène du FGF-2, après modifications structurales par des enzymes de dégradation ou par un inhibiteur spécifique de la sulfatation (chapitre 4).

CHAPITRE 2

**EFFET DU FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 SUR
LA PROLIFERATION DES CELLULES EPITHELIALES
MAMMAIRES.**

CHAPITRE 2

EFFET DU FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES

I - INTRODUCTION.

Les cellules épithéliales cancéreuses mammaires produisent du FGF-2 *in vitro* (Luqmani et al. 1992 ; Ke et al. 1993 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Pennault-Llorca et al. 1995). Cependant, ce facteur semble avoir des effets différents suivant le type cellulaire considéré. En effet, le FGF-2 est un puissant stimulateur de la prolifération des cellules hormono-dépendantes MCF-7 et T47-D (Karey et al. 1988 ; Daly et al. 1988 ; Peyrat et al. 1991 ; Briozzo et al. 1991 ; Sutherland et al. 1992 ; Stewart et al. 1992 ; Musgrove et al. 1993) ; par contre aucun effet mitogène n'a été reporté ni sur les cellules normales issues de biopsies non cancéreuses, en culture primaire (Shiwei et al. 1992 ; Sakthivel et al. 1993) ni sur les cellules métastatiques MDA-MB-231 (Peyrat et al. 1991). L'insensibilité au FGF-2 des cellules MDA-MB-231 a été démontrée après incorporation de thymidine tritiée, dans les cellules en cours de synthèse d'ADN.

Afin de préciser l'action du FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires, nous avons entrepris d'étudier, d'une part les paramètres définissant les capacités prolifératives des cellules décrites comme sensibles (lignée MCF-7) ou insensibles au FGF-2 (lignée MDA-MB-231), et d'autre part les modifications induites par ce facteur de croissance sur les différents paramètres du cycle cellulaire. Les cellules HBL 100 non tumorigènes ont également été étudiées comme cellules de référence, par rapport au phénotype malin. Notre étude a bénéficié d'une approche cytométrique par l'utilisation d'analyseurs d'images de type SAMBA 200 et SAMBA 2005 (Alcatel-TITN). Les marqueurs du cycle cellulaire

(anticorps Ki-67 et anti-PCNA) définissent la population cellulaire engagée dans le cycle cellulaire. Après incorporation de bromodéoxyuridine (analogue structural de la thymidine), nous avons déterminé la durée du cycle cellulaire et de ses différentes phases. Ces différentes approches nous ont ainsi permis de mieux comprendre le mode d'action du FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires.

II - MATERIELS ET METHODES.

II-1 - Culture Cellulaire.

a- Lignées Cellulaires.

Notre choix d'étude s'est porté sur trois lignées épithéliales mammaires bien établies : deux lignées cancéreuses ayant des caractéristiques invasives différentes, et une lignée immortalisée (figure 11). Ces lignées ont été gracieusement fournies par le Dr. JP. Peyrat (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Oscar Lambret, Lille).

La lignée cellulaire MCF-7 est issue d'une effusion pleurale d'une femme atteinte d'un adénocarcinome mammaire possédant des taux significatifs de récepteurs aux oestrogènes (Soule et al. 1973). Ces cellules hormono-sensibles sont très bien différenciées et expriment différents marqueurs épithéliaux précis (E-Cadherine, kératines, desmoplakines I et II) mais absolument pas la vimentine (Sommers et al. 1994).

La seconde lignée cancéreuse étudiée est la lignée MDA-MB-231. Elle est isolée elle aussi d'une effusion pleurale chez une femme âgée de 51 ans atteinte d'un adénocarcinome mammaire, mais très faiblement différencié (Cailleau et al. 1974). Ces cellules épithéliales sont hormono-indépendantes et possèdent un haut pouvoir invasif. Très fusiformes, elles présentent un phénotype fibroblastique et expriment la vimentine (Sommers et al. 1994).

La lignée épithéliale HBL 100 a été établie à partir de cellules isolées du lait d'une femme allaitante (exfoliation desquamante). Ces cellules ne présentent pas de récepteurs aux oestrogènes. Bien qu'aucune trace de lésion cancéreuse ne fut observée dans le lait de cette patiente, une analyse de caryotype a révélé la présence de cellules anormales dès le 7^{ème} passage. De plus, ces cellules sont immortalisées et expriment l'antigène T SV40 (Caron de Fromental et al. 1985).

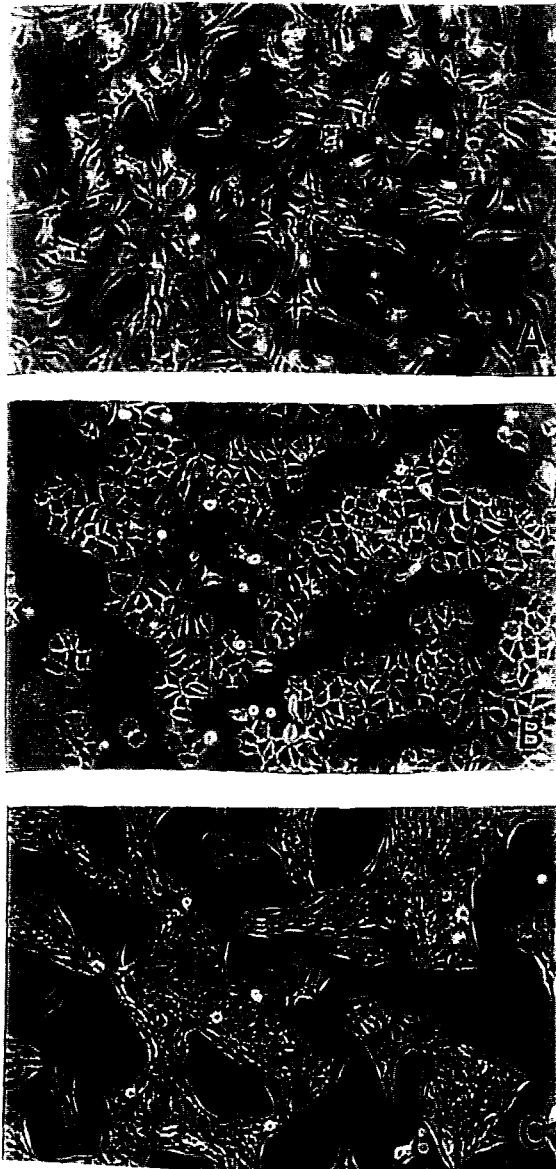


Figure 11 : Cellules épithéliales mammaires observées par microscopie en contraste de phase. Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture MEM contenant 10 % de SVF, comme décrit dans la section matériels et méthodes.

A : Cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231.

Très invasives, elles sont beaucoup plus étalées sur le substrat que les cellules MCF-7. Issues d'une tumeur très peu différenciée, elles présentent des caractéristiques de type fibroblastiques.

B : Cellules hormono-dépendantes MCF-7.

Issues d'un adénocarcinome différencié, les cellules MCF-7 présentent un phénotype typiquement épithélioïde, et sont capables de former des jonctions serrées.

C : Cellules HBL 100.

Les cellules épithéliales HBL 100 sont issues du lait d'une femme allaitante, ne présentant aucune lésion tumorale. Cependant, ces cellules sont transformées par le virus SV40. Sur le substrat, les cellules HBL 100 prolifèrent de manière clonogénique.

La barre correspond à 50 μ m.

A faible passage, elles ne forment pas de tumeurs lorsqu'elles sont injectées aux souris *Swiss nude*. Ces cellules ont été utilisées dans cette étude comme cellules de référence par rapport au phénotype malin des deux lignées précédentes.

b - Conditions de culture.

Les cellules épithéliales mammaires sont cultivées dans un milieu MEM complet (sels de Earle, Eurobio) contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté par chauffage (56°C, 30 mn), 0.6 µg/ml d'insuline, 2 mM de L-glutamine, 20 mM Hepes, 2 g/l de bicarbonate de sodium, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Eurobio). Elles sont maintenues à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 95 % d'air et 5 % de dioxyde de carbone.

Il faut noter que dans un souci de rigueur, les études cinétiques ainsi que les extractions de protéoglycannes (chapitres 3 et 4) ont été effectués sur des cellules cultivées au même passage (MCF-7, passages 35-45 ; MDA-MB-231, passages 480-490 ; HBL 100, passages 35-45) et dans les mêmes conditions de culture.

II-2 - Méthodes d'investigation de la prolifération cellulaire.

Les cellules sontensemencées à 6000 cellules/cm² dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon). Les cellules en phase exponentielle de croissance sont rincées 2 fois puis placées pendant 24 heures dans un milieu MEM dépourvu de sérum de veau foetal, mais contenant de la fibronectine (2 µg/ml) et de la transferrine (30 µg/ml) (Sigma). Après renouvellement de ce milieu, le FGF-2 (Amgen) est appliqué pour une période de 48 heures (figure 12).

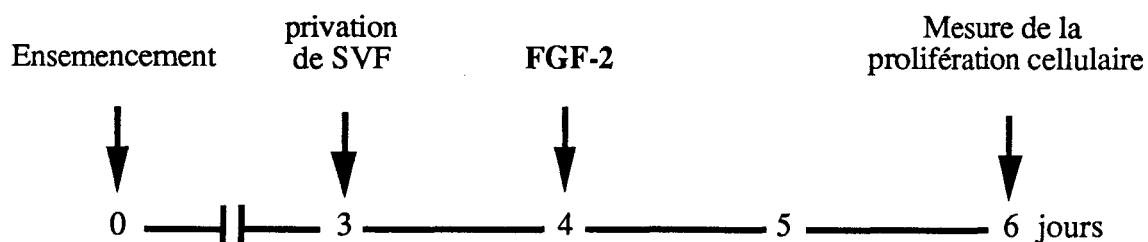


Figure 12 : Protocole du test d'activité biologique du FGF-2.

II-2-1- Numération cellulaire.

Après 48 heures d'incubation en présence ou non de FGF-2 (à des concentrations croissantes de 0 à 50 ng/ml), les cellules sont rincées et détachées par une solution de trypsine/EDTA (Eurobio) et comptées à l'aide d'un hématocytomètre (cellule de Malassez). Les expériences sont toujours réalisées en triple.

II-2-2- Mesure du contenu en ADN.

Les cellules, cultivées sur des lamelles de verre, recouvertes de collagène de queue de rat, sont fixées au méthanol pendant 10 mn à - 20°C. Le méthanol s'est révélé l'agent fixateur préservant le mieux les antigènes nucléaires (Giroud, 1987 ; Delehedde, 1992). Après rinçage dans le PBS, l'ADN des cellules est soumis à une hydrolyse par l'acide HCl 5N pendant une heure à 20°C. Selon la réaction nucléaire de Feulgen (Feulgen et Rossenbeck, 1924), le réactif de Schiff va alors pouvoir se lier spécifiquement aux groupements aldéhydes libérés après hydrolyse de l'ADN. Cette réaction est stoechiométrique, autrement dit elle va permettre d'apprécier directement la quantité d'ADN présente dans le noyau. Les cellules sont donc incubées pendant une heure et à l'obscurité, en présence du réactif de Schiff (Sigma). Elles sont ensuite rincées 3 x 5 mn par une solution de bisulfite de sodium (10 %), puis par 3 x 5 mn d'eau. Les cellules sont déshydratées et montées dans une résine (Xam, Merck). La quantité d'ADN est déterminée par analyse d'images à l'aide du Système d'Analyses Microscopiques à Balayage Automatique, SAMBA 200 (Alcatel-TITN, France). Les noyaux cellulaires sont détectés, segmentés et analysés par calcul de 15 paramètres spécifiques décrivant la densité, la texture chromatine ainsi que la forme et la couleur (Giroud, 1982 ; Brugal, 1984). La proportion de cellules dans les phases S+G2+M du cycle cellulaire est déterminée à l'aide des histogrammes représentant la densité optique intégrée.

II-2-3- Marqueurs du cycle cellulaire.

Le marquage immunocytochimique est réalisé suivant la méthode indirecte peroxydase-antiperoxydase (ou méthode d'amplification PAP). Après fixation par le méthanol, les cellules cultivées sur les lamelles sont incubées pendant une heure en présence

du premier anticorps. Les anticorps monoclonaux anti-PCNA (Clone PC 10, Dako, Danemark) et Ki-67 (Dako) sont dilués respectivement au 1 : 100 et au 1 : 50 dans du PBS contenant 0.5 % Tween 20 et 0.5 % de sérum albumine bovine (SAB). Après chaque incubation, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-IgG de souris préparé chez le lapin (incubation de 30 mn, à 20°C). Il est dilué au 1 : 30 dans un mélange de sérum de veau foetal et de PBS (V/V). Les cellules sont ensuite incubées pendant 20 mn à 20°C, avec le troisième anticorps, un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1 : 300 dans un mélange SVF/PBS (V/V). L'activité de la peroxydase est détectée par la 3.3'-diaminobenzidine ou DAB (10 mg dans 20 ml de tampon Tris/HCl 0.1 M, pH 7.6, contenant 0.05 % d'H₂O₂). Les noyaux sont finalement contrecolorés par l'hématoxyline de Harris (Réactifs RAL, France). Après déshydratation, les préparations sont montées dans le Xam. Le pourcentage de cellules positives est estimé par comptage à l'analyseur d'images SAMBA 200, sur un minimum de 2000 cellules.

II-2-4- Estimation de la durée du cycle cellulaire.

La 5-bromodésoxyuridine ou BrdU (Sigma) est ajoutée directement au milieu de culture à une concentration de 10 µM. Des incubations de 30 mn à 5 heures sont réalisées à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées à intervalles réguliers par du méthanol (10 mn, à -20°C). Puis elles sont hydrolysées par l'acide chlorydrique 5N (20 mn, à 20°C) afin de dénaturer l'ADN bicaténaire, qui devient ainsi accessible à l'anticorps monoclonal anti-BrdU (Gratzner, 1982). Les sites de peroxydase endogène sont alors saturés par incubation dans du PBS contenant 30 % de méthanol, 1 % de sérum de chèvre et 0.3 % d'H₂O₂ (30 mn, à 20°C). Les préparations sont incubées pendant 2 heures à 37°C en chambre humide, avec l'anticorps monoclonal murin antiBrdU (Sigma) dilué au 1 : 100, dans du PBS contenant 0.5 % de Tween 20 et 0.5 % de SAB. Puis elles sont incubées pendant une heure à 37°C, en chambre humide, avec un anticorps anti-IgG de souris marqué à la peroxydase. Cet anticorps préparé chez la chèvre est dilué au 1 : 100, dans du PBS contenant 0.5 % de Tween 20 et 1 % de sérum de chèvre. Après chaque incubation, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS.

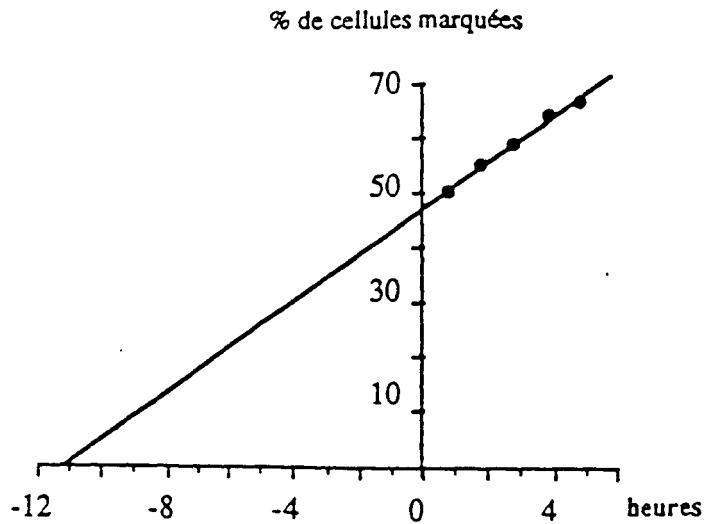


Figure 13 : Relation entre l'indice de marquage par la BrdU (IM_{BrdU}) et le temps d'incorporation. L'indice de marquage est représenté sur l'axe des ordonnées et le temps de marquage sur l'axe des abscisses. L' IM_{BrdU} augmente de manière constante avec le temps de présence de la BrdU. La durée de la phase S (T_s) peut être estimée par la droite de régression. D'après Sasaki et al. 1987.

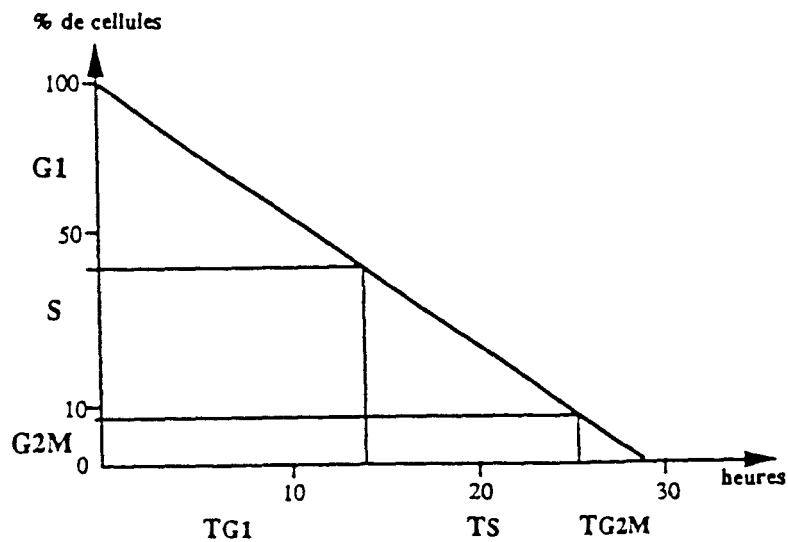


Figure 14 : Méthode d'Okada pour l'estimation graphique de la durée du cycle cellulaire. Le pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire (G1/G0, S, G2/M) étant connu (par analyse d'images après coloration de Feulgen), il est possible de déterminer graphiquement la durée de chacune des phases du cycle cellulaire. L'axe des ordonnées (log) représente le pourcentage de cellules dans les phases du cycle. L'axe des abscisses (linéaire) représente le temps ; l'échelle est déterminée par la connaissance du T_s (durée de la phase S). D'après Sasaki et al. 1987.

L'activité de la peroxydase est ensuite détectée comme décrit précédemment. Les cellules sont contrecolorées par l'hématoxyline de Harris. Le nombre de cellules marquées, donc ayant incorporées la BrdU (i.e. les cellules en cours de synthèse d'ADN) est déterminé à l'aide de l'analyseur d'images (SAMBA 200) sur un minimum de 2000 cellules. Selon la méthode de Sasaki et al. (1987), les pourcentages obtenus permettent de déterminer la durée de la phase S (figure 13) et consécutivement la durée de chacune des phases du cycle cellulaire (figure 14).

II-2-5- Analyse d'images microscopiques ou cytométrie à balayage.

Les travaux d'analyse d'images ont été effectués sur des appareils de type SAMBA 200 et SAMBA 2005 (Alcatel-TITN, France) pour Système d'Analyse Microscopique à Balayage Automatique (figure 15 A).

a - Principe.

Un analyseur d'images est un appareil permettant d'acquérir une image du monde physique (image optique) afin de la traiter et de l'analyser grâce à un système informatique. Pour cela, il doit disposer d'un capteur convertisseur analogique-numérique qui peut être soit un photomultiplicateur (SAMBA 200), soit une caméra vidéo (SAMBA 2005). Grâce à celui-ci, une image du monde physique va être digitalisée sur 256 niveaux de gris (image numérique). L'image d'une cellule peut ainsi être représentée sous la forme d'un tableau de valeurs numériques. Cette image numérique est alors segmentée, c'est-à-dire transformée sur deux niveaux de gris (image binaire) par la création d'un seuil de segmentation (figure 15 B).

Cette segmentation est l'étape-clé de l'analyse d'images, car elle permet de sélectionner parmi les points de l'image ceux qui appartiennent à la cellule ou aux organites cellulaires à caractériser, de l'isoler du fond de la préparation, et d'écartier également d'éventuels artefacts. Elle est sous le contrôle direct de l'utilisateur et se traduit par la création d'un masque binaire (ou masque de segmentation) à partir duquel 15 paramètres sont automatiquement calculés.

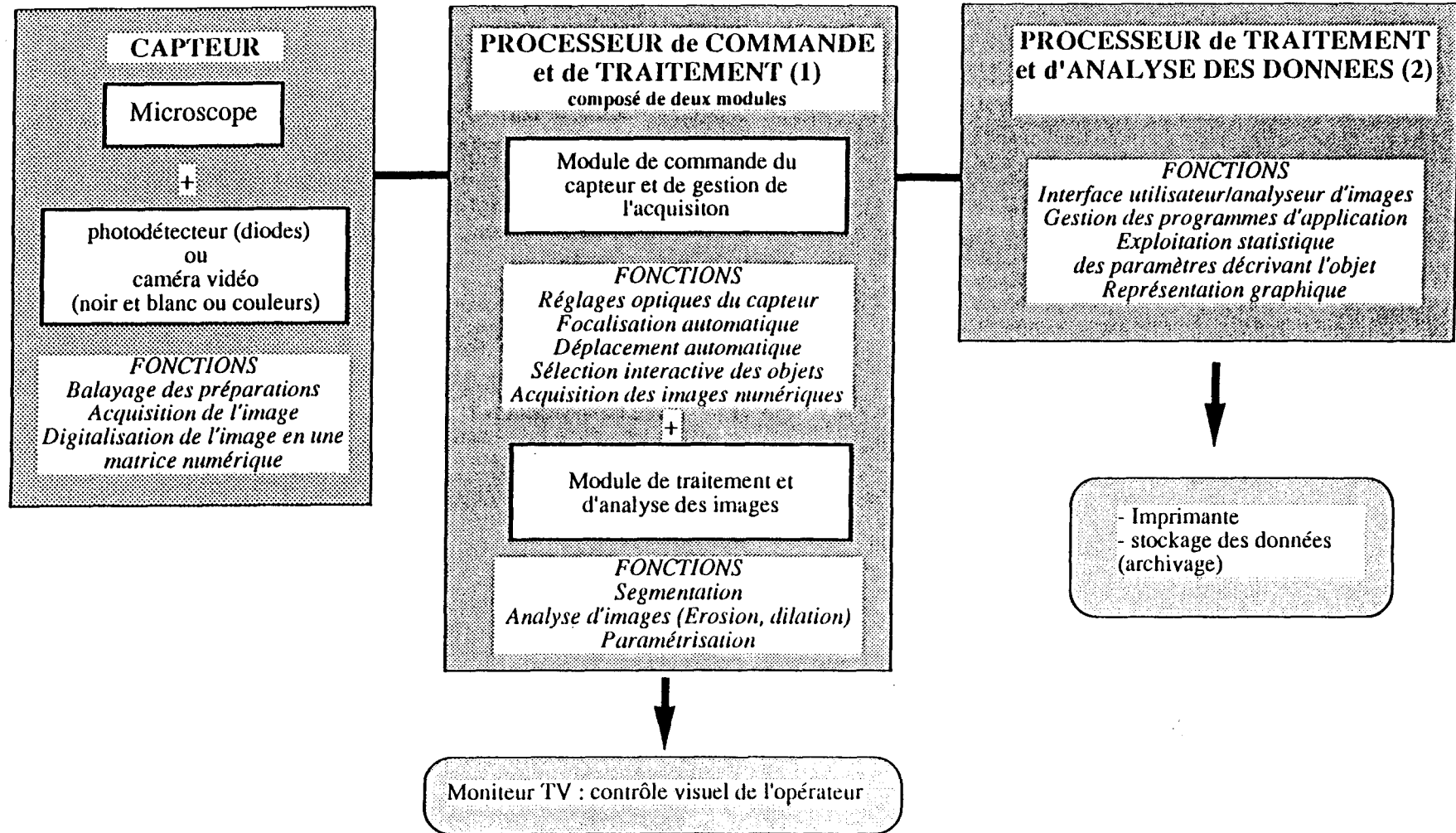
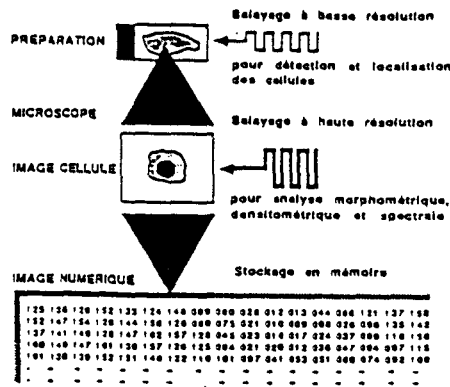


Figure 15 A : Schéma général d'organisation du système SAMBA. Le capteur est constitué d'un microscope connecté à un système d'acquisition de l'image (photodétecteur ou caméra vidéo). Ce capteur a pour fonction de représenter chaque point d'une image (ou pixel) par ses coordonnées ainsi que par une valeur numérique proportionnelle à l'intensité lumineuse portée par ce point. L'image numérique obtenue peut alors être traitée par les différents processeurs : (1) amélioration des contrastes, sélection des points images appartenant à l'objet à analyser (ou segmentation), calculs des paramètres caractérisant la forme, la densité, la couleur ou la texture de l'objet ; (2) traitement des données qui vont permettre d'extraire parmi ces multiples paramètres ceux qui présentent une variation significative, et de les représenter graphiquement.

D'après Brugal et al. 1979 ; Giroud, 1987.

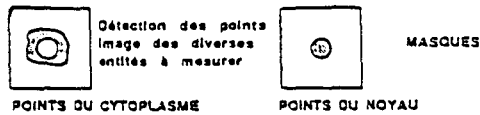
Figure 15 B : Principales étapes de l'analyse d'images microscopiques.

1 - Acquisition des images à l'aide de capteurs.



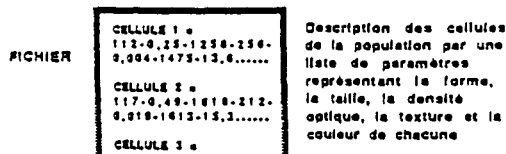
2 - Segmentation des images.

Permet de sélectionner parmi les points de l'image ceux qui appartiennent à la cellule et aux organites à caractériser.



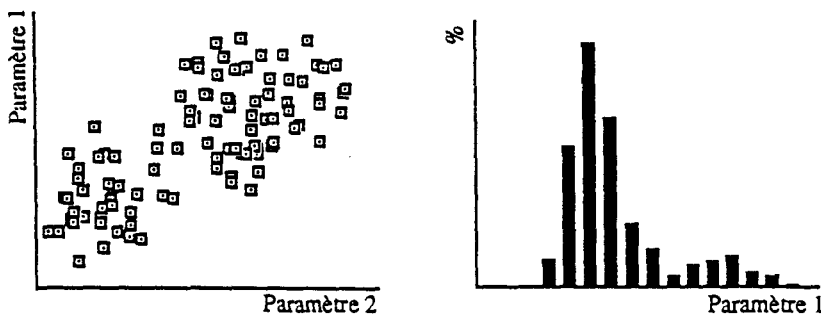
3 - Paramétrisation .

Permet de calculer les différents paramètres spécifiques de chaque cellule étudiée.



4 - Traitement des données (Analyse statistique et représentation graphique).

Permet d'extraire parmi les multiples paramètres calculés ceux qui présentent une variation significative.



5 - Stockage des données (Archivage).

Fichiers informatiques.

D'après Brugal 1989.

b - Paramètres.

Une population cellulaire peut donc être décrite par 15 paramètres regroupés en quatre grandes familles :

- des paramètres **densitométriques** qui traduisent des valeurs intégrées et moyennes de la lumière traversant l'objet. Ils nécessitent l'utilisation d'un colorant spécifique du constituant cellulaire étudié mais surtout stoechiométrique (c'est-à-dire dont la densité optique est directement proportionnelle à la quantité de matériel coloré). Ainsi, la *densité optique intégrée* (DOI) permet de mesurer la quantité d'ADN nucléaire exprimée en unités arbitraires. La *densité optique moyenne* (DOM) mesure le rapport entre la DOI et la surface du noyau et exprime la concentration en ADN.

- des paramètres **morphologiques** ou **morphométriques** qui traduisent la forme et les dimensions de l'objet analysé telles que la *surface* (S) et le *périmètre* (P). Ces paramètres sont liés à la distribution spatiale des point-image (ou pixels) constituant l'objet dans l'image.

- des paramètres **texturaux** qui traduisent les relations spatiales entre les densités optiques mesurées dans l'objet. Ainsi, la *distribution des niveaux de gris* mesure l'uniformité de la distribution de la densité optique. La *distribution des longueurs de sections* mesure la fréquence des faibles et fortes condensations de chromatine. Ils sont très importants car ils révèlent les variations de texture chromatinienne au cours du cycle cellulaire par exemple, mais également après des essais thérapeutiques.

- des paramètres **colorimétriques**, qui traduisent les propriétés de *teinte* (longueur d'onde dominante), de *luminance* (énergie lumineuse dans la couleur) et de *saturation* (degré de pureté spectrale).

c - Traitement des données.

Cette étape permet d'extraire parmi les multiples paramètres calculés sur les cellules d'une population ceux qui présentent une variation significative dans le contexte étudié. Ces paramètres peuvent alors être représentés graphiquement sous une forme monoparamétrique

(histogramme de distribution), biparamétrique (nuage de points) ou multiparamétrique (plan factoriel).

L'analyse des paramètres mesurés, le contrôle de leur signification statistique ainsi que la représentation graphique de leurs variations sont réalisés consécutivement à leur saisie grâce aux programmes implantés dans le processeur d'applications de l'analyseur d'images.

III - RESULTATS.

III-1 - Numération cellulaire.

Les courbes de croissance présentées en figure 16, permettent d'observer la prolifération des cellules cancéreuses mammaires dans les conditions optimales de croissance (présence de sérum de veau foetal) et en l'absence de tout agent stimulateur de la croissance (milieu de sevrage). Nos résultats montrent que chacune des lignées est toujours capable de proliférer mais plus lentement, en absence de SVF. Les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 sont les cellules qui prolifèrent le plus rapidement que ce soit en absence ou en présence de sérum.

La sensibilité des cellules cancéreuses mammaires au FGF-2 a ensuite été estimée en présence de concentrations croissantes de ce facteur de croissance (0 à 50 ng/ml). L'incubation des cellules MCF-7 avec le FGF-2 (5 ng/ml) augmente de deux fois le nombre de cellules par rapport au contrôle (figure 17). Ce taux est équivalent à la stimulation maximale que l'on peut obtenir en présence de sérum. Aucun changement significatif du nombre de cellules, après 48 heures d'incubation, n'a pu être observé pour les cellules MDA-MB-231 et les cellules HBL 100 et ce quelque soit la concentration testée. Néanmoins, ces cellules sont toujours stimulables par le SVF.

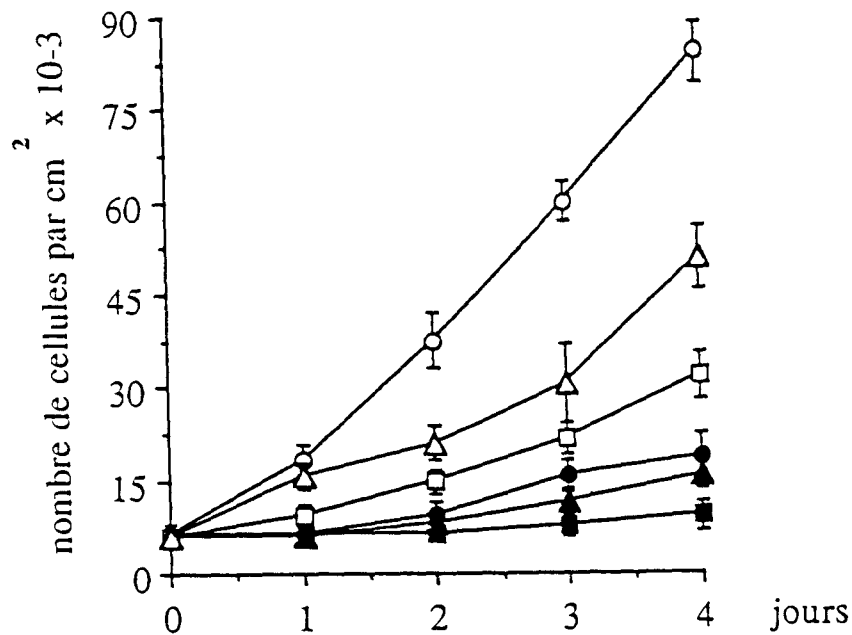


Figure 16 : Courbes de croissance des lignées épithéliales mammaires. Les cellules MCF-7 (carrés), les cellules MDA-MB-231 (cercles) et les cellules HBL 100 (triangles) sont ensemencées à la densité de 6000 cellules/cm² dans de boîtes de Pétri de 35 mm. Après deux rinçages, elles sont placées dans un milieu MEM contenant 10 % SVF (signes vides) ou dans un milieu dépourvu de sérum (signes pleins). Les cellules sont décollées en présence de trypsine/EDTA, et le nombre de cellules est mesuré à l'aide d'un hématocytomètre.

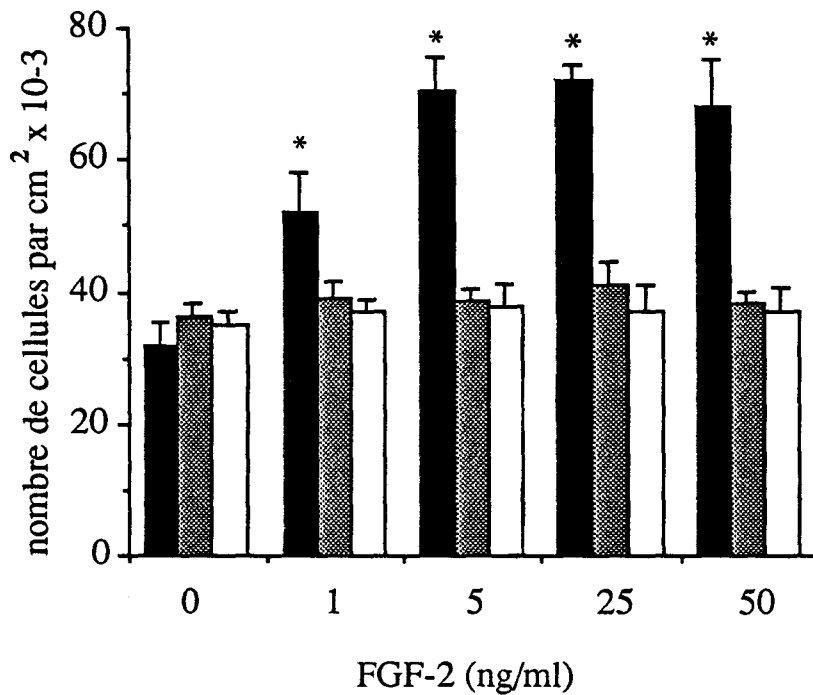


Figure 17 : Action du FGF-2 sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Les cellules MCF-7 (■), les cellules MDA-MB-231 (▒) et les cellules HBL 100 (□) sont placées pour 24 heures dans un milieu dépourvu de sérum. Le FGF-2 est ensuite ajouté selon des doses croissantes de 0 à 50 ng/ml. Après 48 heures d'incubation, les cellules sont décollées en présence de trypsine/EDTA et comptées à l'aide d'un hématocytomètre. Chaque valeur correspond à la moyenne plus ou moins l'écart type de trois mesures. (*p < 0.01).

III-2 - Mesure de la quantité d'ADN.

La coloration nucléaire de Feulgen (figure 18 A) est stoechiométrique : elle est directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le noyau des cellules. Le paramètre exprimant la quantité d'ADN nucléaire, à savoir la densité optique intégrée (DOI) a été représenté sous la forme d'histogrammes, en fonction du pourcentage de noyaux. Les histogrammes obtenus sont bimodaux, c'est-à-dire qu'ils présentent deux pics significatifs (figure 19). Le premier pic correspond aux cellules ayant une quantité d'ADN égale à 2 C, caractéristique des phases G0 et G1 du cycle cellulaire. Le second pic correspond aux cellules ayant une quantité double d'ADN (4 C), les cellules en phase G2/M (figure 19). Ces deux pics sont séparés par un ensemble de cellules ayant un contenu d'ADN intermédiaire, et qui sont en fait, en phase S du cycle cellulaire (phase de synthèse de l'ADN).

Cette analyse nous indique que dans le cas des cellules MCF-7, le FGF-2 à 5 ng/ml augmente le pourcentage de cellules dans les phases de S+G2+M du cycle cellulaire, de 16 % à 28 % (figure 20). Ce nouveau taux est équivalent à celui obtenu en présence de 10 % de SVF, c'est-à-dire en taux optimal de croissance. Dans le cas des cellules MDA-MB-231 et des cellules HBL 100, l'ajout de FGF-2 ne modifie pas le pourcentage de cellules dans les phases de S+G2+M du cycle.

III-3 - Marqueurs du Cycle Cellulaire.

Les marqueurs nucléaires du cycle cellulaire (PCNA et Ki-67) sont connus pour être présents pendant les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire mais non pas pendant la phase G0 ou phase de quiescence (revue dans Linden et al. 1992 ; Duchrow et al. 1994). Les cellules exprimant ces antigènes montrent une coloration strictement nucléaire. Au cours de la phase de mitose, un faible marquage cytoplasmique peut être observé; en effet, après rupture de la membrane nucléaire, les antigènes nucléaires se retrouvent libérés dans le cytoplasme (figure 18 B).

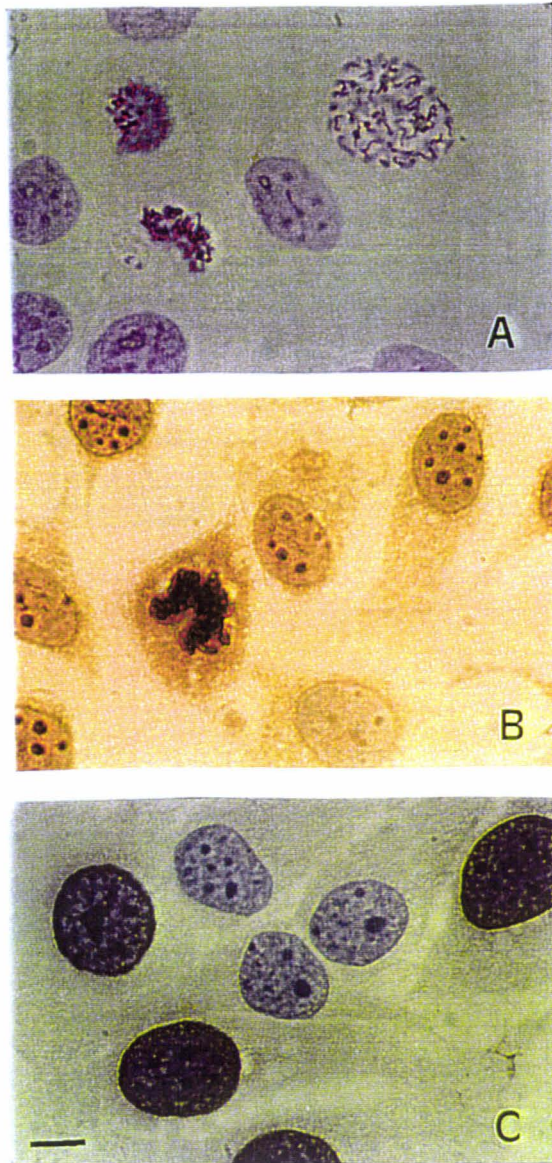


Figure 18 : Méthodes d'investigation de la prolifération cellulaire.

Les cellules MCF-7, cultivées sur des lamelles de verre, sont fixées dans du méthanol pendant 10 mn à -20°C , comme décrit dans la section matériels et méthodes.

A : Coloration de Feulgen. Le réactif de Schiff colore spécifiquement l'ADN des noyaux. Des figures de mitose sont observées dans les cellules MCF-7 en phase exponentielle de croissance.

B : Immunomarquage des cellules MCF-7 par l'anticorps Ki-67 (anti-marqueur de cycle cellulaire). Le marquage obtenu est strictement nucléaire. Seules les cellules engagés dans le cycle cellulaire sont immunomarquées. Au cours de la mitose, un marquage cytoplasmique peut être observé après rupture de la membrane nucléaire.

C : Immunodétection des cellules MCF-7 en phase S du cycle cellulaire. Les cellules en cours de synthèse d'ADN ont incorporé un analogue de la thymidine, la BrdU, qui peut être détecté à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-BrdU (contrecoloration par l'hématoxyline de Harris).

(Barre : $10\ \mu\text{m}$)

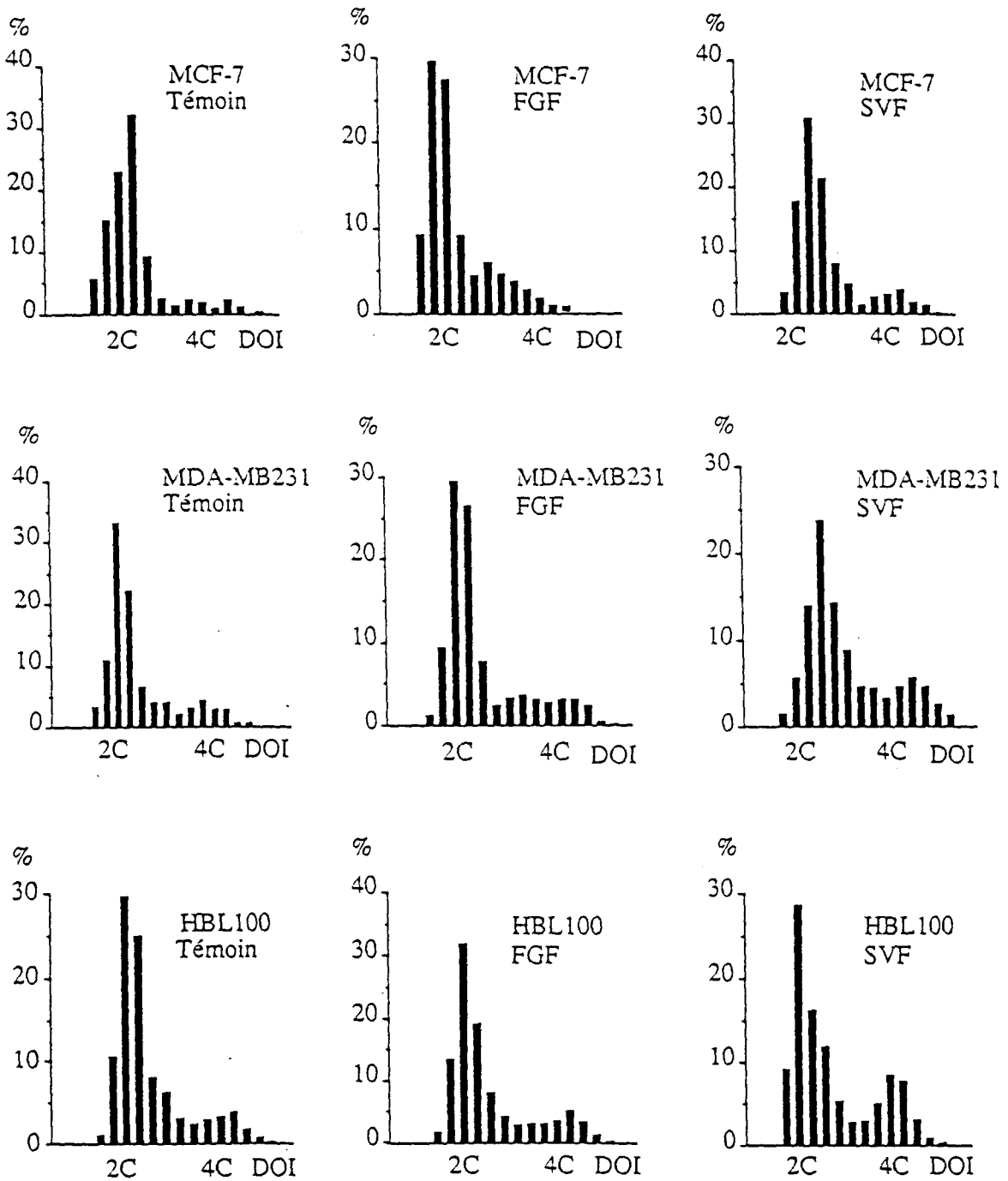


Figure 19 : Histogrammes de la densité optique intégrée. Après coloration stoechiométrique de Feulgen, la densité optique intégrée (DOI) exprime en valeur arbitraire, la quantité d'ADN nucléaire. La valeur 2C exprime la quantité d'ADN présente dans les cellules en G0/G1. La valeur 4C caractérise les cellules en G2. En ordonnée, le pourcentage de noyaux dans chaque classe.

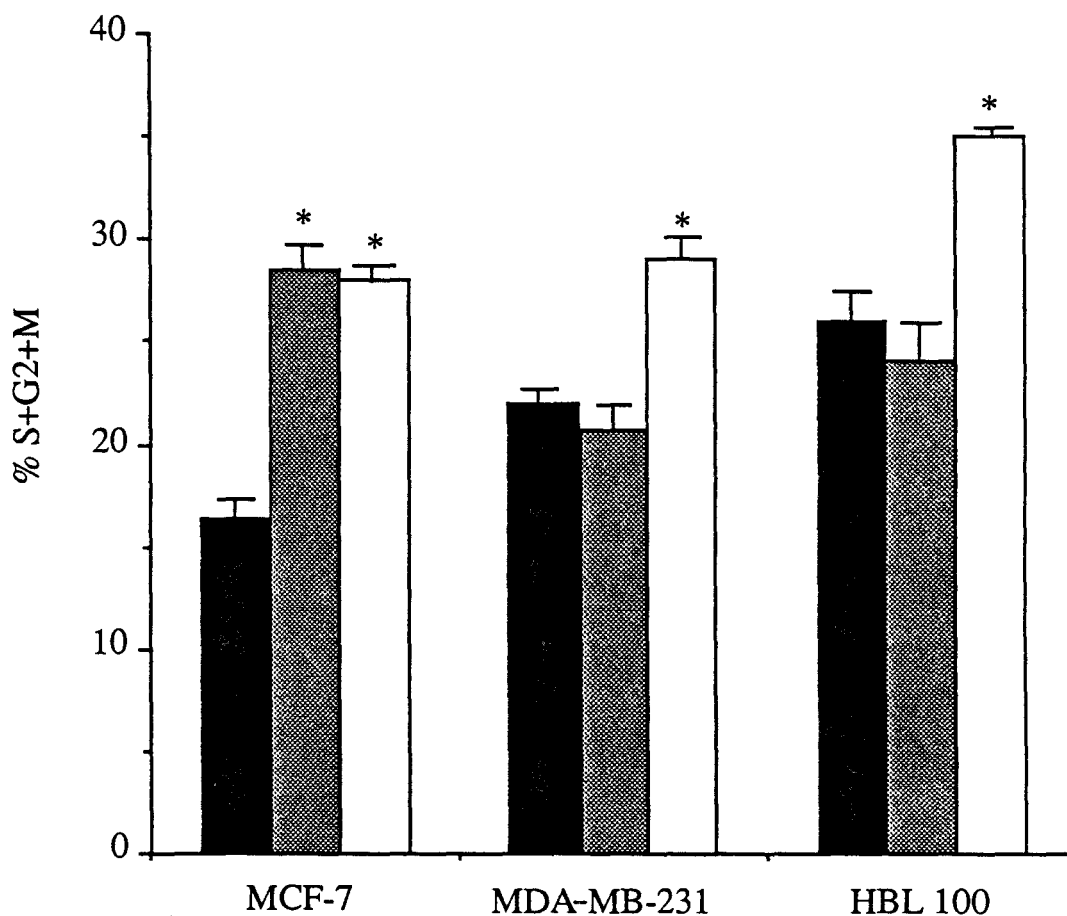


Figure 20 : Effet du FGF-2 sur le pourcentage de cellules dans les phases S/G2/M du cycle cellulaire. Les cellules sont cultivées comme décrit dans la rubrique matériels et méthodes. Après coloration stoechiométrique de Feulgen, le pourcentage de cellules dans les phases S/G2/M, calculé à partir des histogrammes de densité optique intégrée, est mesuré dans des conditions de sevrage (■), en présence de FGF-2 à 5 ng/ml (▣) ou dans du milieu contenant 10% de SVF (□). Chaque valeur représente la moyenne statistique des résultats de trois expériences indépendantes (* p < 0.01).

Après 48 heures en présence de FGF-2, le pourcentage de cellules MCF-7 exprimant le Ki-67 passe de 13 à 27 % (tableau 2). De même, le pourcentage de cellules MCF-7 exprimant la PCNA augmente de 31 à 58 %. Par contre, aucune variation significative des indices de marquage par ces marqueurs de cycle n'est obtenue dans le cas des cellules MDA-MB-231 et des cellules HBL 100. Nous pouvons remarquer que les proportions de cellules en cycle sont déjà très élevées même en l'absence de facteur de stimulation.

III-4 - Estimation de la durée du cycle.

La BrdU, analogue de la thymidine, est incorporée dans les nouvelles molécules d'ADN synthétisées pendant la phase S (figure 18 C). Les cellules peuvent alors être repérées grâce à un anticorps anti-BrdU après qu'une hydrolyse par l'HCl 5N ait dénaturé l'ADN double brin en ADN simple brin (Gratzner, 1982). Des incubations de durées variables rendent possible l'évaluation de la durée de la phase S. Pour cela, le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-BrdU est calculé pour chaque temps d'incubation grâce à l'analyseur d'images. Le pourcentage de cellules immunomarquées, c'est-à-dire le pourcentage de cellules en phase S, augmente de 33 à 49 % pour les cellules MCF-7 en présence de FGF-2. Par contre, il ne varie pas de manière significative pour les cellules MDA-MB-231 (38 à 40 %) ainsi que pour les cellules HBL 100 (28 à 30 %). Ces pourcentages de cellules nous ont ensuite permis de mesurer la durée du cycle cellulaire et de ses différentes phases par la méthode de Sasaki et al. (1987), comme décrit dans la section matériel et méthodes.

Le tableau 3 regroupe les résultats obtenus. Le FGF-2 diminue la durée de la phase G1 (28 à 16 heures) et par conséquent la durée du cycle cellulaire (31 à 45 heures) dans le cas des cellules MCF-7. Les durées des phases S et G2/M restent constantes. Par contre, aucune variation significative de la durée des phases n'est détectée pour les deux autres lignées étudiées. En présence de SVF, la diminution de la durée du cycle cellulaire que nous observons est toujours due à une diminution de la phase G1.

		MCF-7	MDA-MB-231	HBL 100
Ki-67	Témoin	13 % (11-14)	53 % (51-55)	72.5 % (72-73)
	FGF-2	27 % (25-29)	51 % (50-52)	69 % (68-70)
	SVF	86 % (85-87)	84 % (83-85)	94 % (93-95)
PCNA	Témoin	31 % (30-32)	69 % (67-70)	91.5 % (91-92)
	FGF-2	58 % (55-63)	72 % (70-75)	95.5 % (95-96)
	SVF	89 % (88-90)	88 % (87-89)	98.5 % (98-99)

Tableau 2 : Pourcentage de cellules immunomarquées par la PCNA ou le Ki-67 après 48 heures de traitement par le FGF-2 (5 ng/ml). Le pourcentage représente la valeur moyenne de trois expériences (les valeurs minimales et maximales sont indiquées entre parenthèses).

	MCF-7			MDA-MB-231			HBL 100		
	Témoin	FGF-2	SVF	Témoin	FGF-2	SVF	Témoin	FGF-2	SVF
G1/G0	28	16	14	20	18	13	29	27	14
S	13	11	10	10	10	8	16	16	16
G2/M	4	4	2	2	2	2	2	2	2
Total	45	31	26	32	30	23	47	45	32

Tableau 3 : Effet du FGF-2 sur la durée du cycle cellulaire et de ces différentes phases. Les durées sont exprimées en heures.

IV - DISCUSSION.

IV-1 - Comparaison des méthodes d'investigation de la prolifération cellulaire.

Les différentes méthodes d'investigation de la prolifération cellulaire ont été entreprises afin de définir au mieux les caractéristiques cinétiques des cellules épithéliales mammaires étudiées (figure 21).

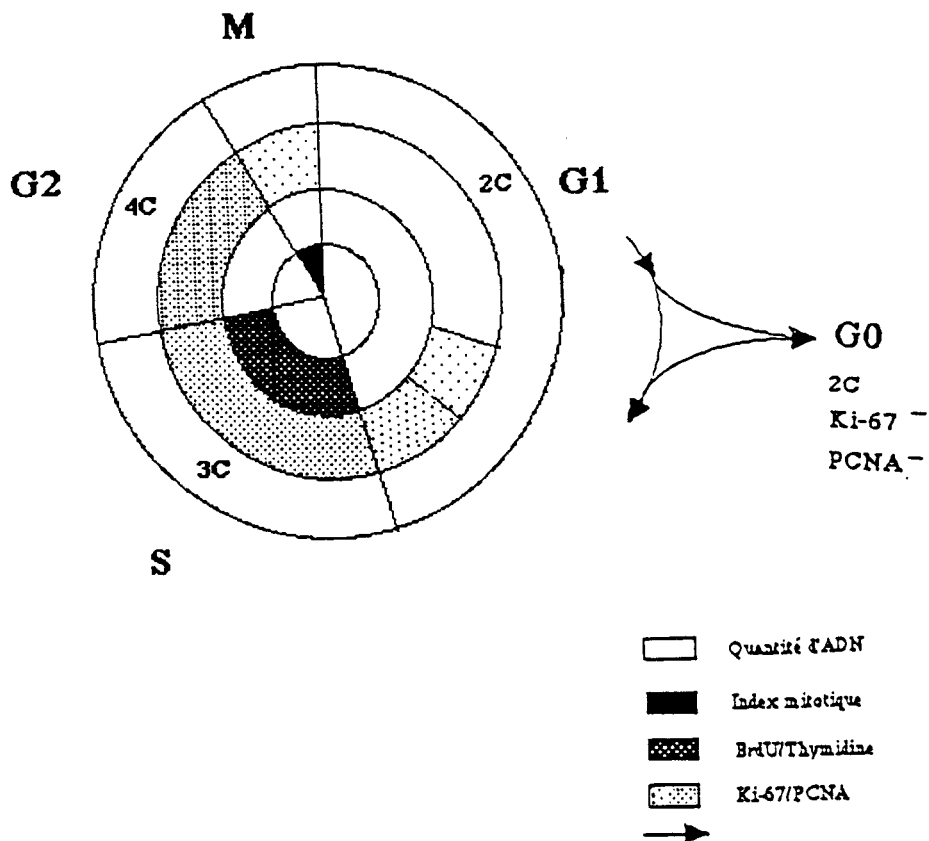


Figure 21 : Méthodes d'investigation de la prolifération cellulaire.
D'après Linden et al. 1992.

La numération cellulaire tout d'abord, est une technique classique en culture cellulaire. C'est une méthode directe qui ne nécessite pas d'étapes intermédiaires d'incorporation ou de coloration des structures cellulaires. Par l'observation microscopique, elle permet de contrôler directement l'état et l'intégrité cellulaire sur le matériel vivant, et d'appréhender un accroissement global de la population cellulaire étudiée.

Les autres méthodes permettant d'estimer la prolifération cellulaire nécessitent une ou plusieurs étapes supplémentaires de coloration ou d'incorporation de précurseurs spécifiques.

Utilisée historiquement pour étudier la prolifération cellulaire, la mesure de l'index mitotique consiste à rechercher et à compter les figures de mitoses d'une préparation cellulaire après coloration topographique. Cette méthode est assez limitée puisqu'elle ne nous renseigne que sur une période très brève du cycle cellulaire, à savoir la phase de mitose (ou phase M). Elle est surtout utilisée en anatomo-pathologie dans les études morphologiques et reste un critère d'établissement du diagnostic et du grade tumoral. Au vu des outils plus performants à notre disposition, cette technique n'a pas été retenue dans notre travail.

L'incorporation de molécules précurseurs de la synthèse d'ADN permet d'étudier la phase S du cycle cellulaire. Ces molécules peuvent être :

- soit des molécules radiomarquées telles que la thymidine tritiée
- soit des analogues structuraux tels que la BrdU.

Les cellules ayant incorporé la BrdU peuvent être détectées à l'aide d'un anticorps spécifique de la 5-BrdU (Gratzner, 1982) (immunocytologie, cytométrie de flux), évitant ainsi l'utilisation des molécules radiomarquées. Ces méthodes définissent strictement le compartiment des cellules en phase de synthèse d'ADN ou phase S du cycle cellulaire (Dolbeare, 1995). Couplées à d'autres mesures spécifiques, elles permettent de déterminer plus aisément la durée totale du cycle cellulaire.

La coloration des cellules par des colorants stoechiométriques a permis de mesurer la quantité d'ADN nucléaire. Le développement des technologies pour estimer la densité de coloration a permis de révéler des différences significatives de la quantité d'ADN objectivement non appréciables à l'oeil. Le principal inconvénient de cette technologie est qu'elle ne permet pas de différencier les cellules situées en phase de quiescence (phase G0) des cellules situées en phase G1, puisque ces cellules possèdent la même quantité d'ADN à savoir 2C.

Le développement d'anticorps contre des molécules spécifiques du cycle cellulaire a permis de définir ce que l'on appelle des marqueurs de cycle. Les plus utilisés sont les anticorps Ki-67 et anti-PCNA.

L'anticorps Ki-67 (Gerdes et al. 1983) détecte un antigène nucléaire (la protéine Ki-67) qui est présent uniquement durant les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire mais pas pendant la phase de quiescence G0 (revue dans Duchrow et al. 1994). Son expression débute en milieu de G1 et se maintient pendant les phases S, G2 et M. Les cellules en phase de quiescence (G0) n'expriment absolument pas cet antigène. Ainsi, la détection immunocytochimique du Ki-67 permet de définir exactement la quantité de cellules engagées dans le cycle cellulaire. Actuellement, le nombre de ces marqueurs ainsi que leur champs d'utilisation ne font que s'accroître (Kubbutat et al. 1994) et des anticorps plus faciles d'utilisation (MIB-1, MIB-3) ont été produits en utilisant une structure partielle recombinante du Ki-67 (Kubbutat et al. 1994).

La PCNA (proliferating cell nuclear antigen) est une protéine nucléaire non-histone de 36 kDa, qui agit comme protéine auxiliaire de l'ADN polymérase δ (Miyachi et al. 1978 ; Bravo et al. 1987 ; Waseem et Lane, 1990). Cette protéine est exprimée différemment durant le cycle cellulaire et son taux de synthèse est directement corrélé à l'état prolifératif des cellules (Celis et al. 1987). La synthèse de cette protéine commence en milieu de la phase G1 et augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau en phase S (Prelich et al. 1987). Elle est également impliquée dans les phénomènes de réparation de l'ADN (Shivji et al. 1992). Comme le Ki-67, cet antigène recherché par immunocytochimie permet de définir les cellules engagées dans le cycle cellulaire dans une population définie.

Les différentes méthodes que nous avons utilisées, se sont révélées complémentaires. La spécificité de chacune d'elle nous a permis de déterminer avec précision l'activité du FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires étudiées.

IV-2 - Caractéristiques prolifératives des cellules cancéreuses mammaires.

Issues d'un adénocarcinome mammaire différencié, les cellules MCF-7 présentent un phénotype typiquement épithélioïde. Elles expriment les marqueurs spécifiques des cellules épithéliales, comme la cadhérine E, les kératines ou les desmoplakines I et II, et sont capables de former un épithélium avec des jonctions serrées (Sommers et al. 1994). Ainsi, à confluence, elles vont former un tapis cellulaire (ou monocouche). Lorsqu'elles sont cultivées en absence de sérum, leur vitesse de prolifération est réduite mais elles ne rentrent pas toutes en phase de quiescence comme nous l'a démontré notre étude par les anticorps marqueurs de cycle (Ki-67 et anti-PCNA). Elles ne sont donc pas synchronisées lorsque le FGF-2 est appliqué.

Les cellules MDA-MB-231 sont des cellules métastatiques présentant un haut pouvoir invasif. A l'inverse des cellules différenciées MCF-7, elles expriment fortement la vimentine, caractère fibroblastique par excellence, mais n'expriment ni la cadherine E, ni les desmoplakine I et II (Sommers et al. 1994). Issues d'un carcinome très peu différencié, elles prolifèrent activement. A confluence, elles continuent de proliférer pour finalement se détacher du substrat. Ces cellules sont beaucoup moins dépendantes que les cellules MCF-7 du sérum de veau foetal. Elles ne sont pas stimulables non plus par le facteur de croissance des cellules épithéliales (EGF pour Epidermal Growth Factor), alors qu'elles possèdent des récepteurs membranaires de type tyrosine kinase spécifique de l'EGF, en plus grand nombre que les cellules MCF-7 (Mueller et al. 1994). Par contre, comme les cellules MCF-7, elles sont stimulables par l'IGF1 (Sheikh et al. 1993) et par le NGF (Descamps, 1995).

IV-3 - Effet du FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires.

Sur les cellules MCF-7, le FGF-2 a un effet mitogène puissant. Comme le montre la coloration de Feulgen et l'immunodétection par les marqueurs de cycle (Ki-67 et PCNA), cet effet correspond en fait au recrutement partiel des cellules quiescentes (ie en phase G0) qui sont stimulées à ré-entrer en phase G1 et à poursuivre leur cycle cellulaire. De plus, la durée de la phase G1 diminue et conséquemment de la durée totale du cycle cellulaire. La durée des autres phases reste quasi constante.

Ces résultats démontrant l'effet mitogène du FGF-2, sont en accord avec ceux obtenus après incorporation de [³H] Thymidine (Peyrat et al. 1991) et par comptage cellulaire (Karey et al. 1988 ; Stewart et al. 1992). L'effet mitogène du FGF-2 a été décrit sur une autre lignée hormono-dépendante, la lignée T47-D (Karey et al. 1988 ; Peyrat et al. 1991 ; Sutherland et al. 1992 ; Musgrove et Sutherland, 1993). Ces derniers auteurs ont montré par une approche cytométrique (Cytométrie de Flux) que le pourcentage de ces cellules en phase S doublait après stimulation par le FGF-2.

Aucun effet mitogène du FGF-2 (de 5 à 50 ng/ml) n'a été obtenu sur les cellules MDA-MB-231 et sur les cellules HBL 100. Aucun des paramètres étudiés (le nombre de cellules, le pourcentage relatif de cellules dans les phases S+G2+M, le pourcentage de cellules en cycle et la durée du cycle) ne présente de variation significative en présence de FGF-2. L'absence d'effet du FGF-2 sur les cellules HBL 100 est en accord avec des résultats obtenus sur des cultures primaires dérivées de glandes mammaires humaines (Shiwei et al. 1992 ; Szakthivel et al. 1993).

La raison de cette différence de sensibilité des cellules épithéliales mammaires à l'activité mitogène du FGF-2 reste à définir.

Une première hypothèse de l'absence d'effet du FGF-2 sur les cellules MDA-MB-231 et HBL 100 pourrait être la production autocrine de ce facteur de croissance induisant la prolifération de ces cellules, alors insensibles au FGF-2 exogène. En plus du FGF-2, les cellules MDA-MB-231 sont connues pour produire d'autres molécules de croissance comme la pléiotrophine (Fang et al. 1992 ; Riegel et Wellstein, 1994) ou encore l'héréguiline- α (Küng et al. 1994). Cette autocrinie pourrait expliquer la haute proportion, en l'absence de sérum de veau foetal, de cellules marquées par les anticorps Ki-67 et anti-PCNA, donc à savoir la grande proportion de cellules dans le cycle cellulaire. Cependant, notre étude cinétique a clairement mis en évidence que les cellules tumorales MDA-MB-231, tout comme les cellules HBL 100, montrent une croissance très ralentie en l'absence de sérum, et que la production autocrine de facteurs de croissance quels qu'ils soient, n'est donc pas suffisante pour amener les cellules à leur taux optimal de prolifération. Ces cellules sont par ailleurs toujours stimulables par le SVF. Par conséquent, une production

autocrine de FGF-2 ne permet pas d'expliquer l'absence de sensibilité des cellules MDA-MB-231 et HBL 100.

Pour qu'il y ait stimulation par le FGF-2, les cellules épithéliales mammaires doivent présenter des récepteurs fonctionnels à leur surface. La présence de récepteurs de haute affinité sur les cellules épithéliales mammaires a été démontrée par des techniques de radiorécepteurs sur les lignées MCF-7 (Peyrat et al. 1991 ; Briozzo et al. 1991) et sur les cellules MDA-MB-231 pourtant insensibles au FGF-2 (Peyrat et al. 1991). Cependant ces techniques de radiorécepteurs ne nous renseignent pas sur le type de récepteurs ni sur la capacité de ces récepteurs à permettre la transduction du signal. En utilisant la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction), Luqmani et ses collaborateurs (1992) ont montré que toutes les cellules exprimaient FGFR-1, et que seules les cellules MCF-7 exprimaient FGFR-2 au contraire des cellules MDA-MB-231 et HBL 100. Ces résultats ont été confirmés récemment, par Penault Lorca et ses collaborateurs (1995), qui ont montré toujours par RT-PCR, que les cellules T47-D comme les cellules MCF-7, possèdent le gène de FGFR-2. L'absence de récepteurs spécifiques pourrait rendre compte de l'insensibilité des cellules MDA-MB-231 au FGF-2. Des altérations structurales comme des troncations du côté C-terminal et des variations d'affinité pour les récepteurs du FGF ont déjà été décrites dans des tumeurs, sur d'autres modèles cellulaires (Kobrin et al. 1993 ; Yan et al. 1993). Dans le cadre du cancer du sein, une étude récente montre qu'une surexpression de FGFR-1 serait responsable d'une inhibition de croissance en présence de FGF-2 des cellules hormono-dépendantes MDA-MB-134 (Mac Leskey et al. 1994). L'activité tyrosine kinase est associée aux différentes formes de récepteurs et semble nécessaire à l'effet mitogène du FGF-2 (Johnson et Williams, 1993). Récemment, les cellules MDA-MB-231 ont été montrées comme possédant une activité inhibitrice de la tyrosine kinase qui empêcherait la phosphorylation du récepteur à l'insuline et rendrait compte de l'insensibilité de ces cellules à l'insuline (Costantino et al. 1993). Mais jusqu'à présent, aucune activité de ce type n'a été décrite à propos d'autres récepteurs de facteurs de croissance.

En plus de se lier à des récepteurs de haute affinité, le FGF-2 se lie à des sites de fixation présentant une basse affinité, les protéoglycannes de type héparane sulfates (revue dans Gallagher, 1994). Pour stimuler la prolifération cellulaire, le FGF-2 semble devoir interagir avec les deux catégories de récepteurs (Rapraeger et al. 1991 ; Yayon et al. 1991 ; revue dans Fernig et Gallagher, 1994). Si le mécanisme moléculaire de cette interaction n'est pas encore clairement établi, actuellement deux fonctions des HSPG ont déjà été décrites (revue dans Fernig et Gallagher 1994 ; Gallagher, 1994) : ils peuvent (1) stocker le FGF-2 (*sites de liaison de basse affinité du FGF-2*) et (2) permettre l'interaction du FGF-2 avec son récepteur de haute affinité (FGFR) et la transduction du signal (*activateurs du FGF-2*). Or, les sites de fixation de basse affinité n'ont pas été mis en évidence sur les cellules MCF-7, pourtant sensibles au FGF-2 (Peyrat et al. 1991, 1992). Par contre, et d'une manière particulièrement intéressante, cette même étude a mis en évidence que les cellules MDA-MB-231, insensibles au FGF-2 alors qu'elles possèdent des récepteurs de haute affinité, produisent énormément de sites de liaison de basse affinité pour le FGF-2 (Peyrat et al. 1991). Une étude récente a par ailleurs démontré, que la surexpression (par un facteur 10) du syndecan-1, le prototype même des HSPG liant le FGF-2 (Kiefer et al. 1990 ; revue dans Elenius et Jalkanen, 1994) inhibe la prolifération induite par le FGF-2 dans les cellules NIH 3T3 (Mali et al. 1993). Cependant, ces cellules transfectées restent sensibles à d'autres facteurs de croissance comme l'EGF (Mali et al. 1993). L'insensibilité des cellules MDA-MB-231 au FGF-2 pourrait donc être due à la présence d'une très grande quantité de sites de basse affinité, qui correspondent vraisemblablement à des protéoglycannes de type héparane sulfate et qui pourraient entrer en compétition avec les sites de haute affinité.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons entrepris au cours du chapitre 3, de purifier et de caractériser les protéoglycannes des cellules épithéliales cancéreuses mammaires, sensibles ou non au FGF-2.

CHAPITRE 3

**MISE EN EVIDENCE ET COMPARAISON DES
PROTEOGLYCANNES SYNTHETISES PAR LES CELLULES
EPITHELIALES MAMMAIRES.**

CHAPITRE 3

MISE EN EVIDENCE ET COMPARAISON DES PROTEOGLYCANNES SYNTHETISES PAR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES.

I - Introduction : Diversité structurale et complexité moléculaire des PG.

Les protéoglycannes (PG) représentent une famille importante de macromolécules des membranes cellulaires et de la matrice extracellulaire, caractérisée par une grande variété de structures et de tailles. Selon un schéma général, un protéoglycane apparaît constitué par un axe protéique de taille variable sur lequel viennent se greffer de manière covalente une ou plusieurs chaînes linéaires polysaccharidiques de glycosaminoglycannes (GAG). En raison de cette structure complexe, la masse moléculaire des protéoglycannes peut varier de quelques centaines de millions pour les plus gros d'entre eux (ceux du cartilage comme l'aggrégan), à quelques dizaines de mille comme la serglycine dans les vésicules sécrétoires (revue dans Kjellen et Lindahl, 1991). Les structures de quelques protéoglycannes caractéristiques sont présentées en figure 22.

La complexité et la diversité des protéoglycannes s'expriment tout d'abord au niveau de la structure moléculaire des chaînes de GAG. Les chaînes de GAG sont des polymères dont l'unité de base n fois répétées (ou motif) est un dissaccharide composé d'une hexosamine et d'un acide hexuronique ou d'un galactose. Ce motif structural permet de répertorier les GAG en quatre grandes familles (figure 23). On distingue ainsi :

- 1 - La famille des chondroïtine sulfates (CS) et des dermatane sulfates (DS), dont le motif structural de base (figure 23-1), est composé d'un acide hexuronique (iduronate ou glucuronate) et d'une N-acétylgalactosamine : $(\text{HexUA } \beta 1-3 \text{ GalNAc})_n$.

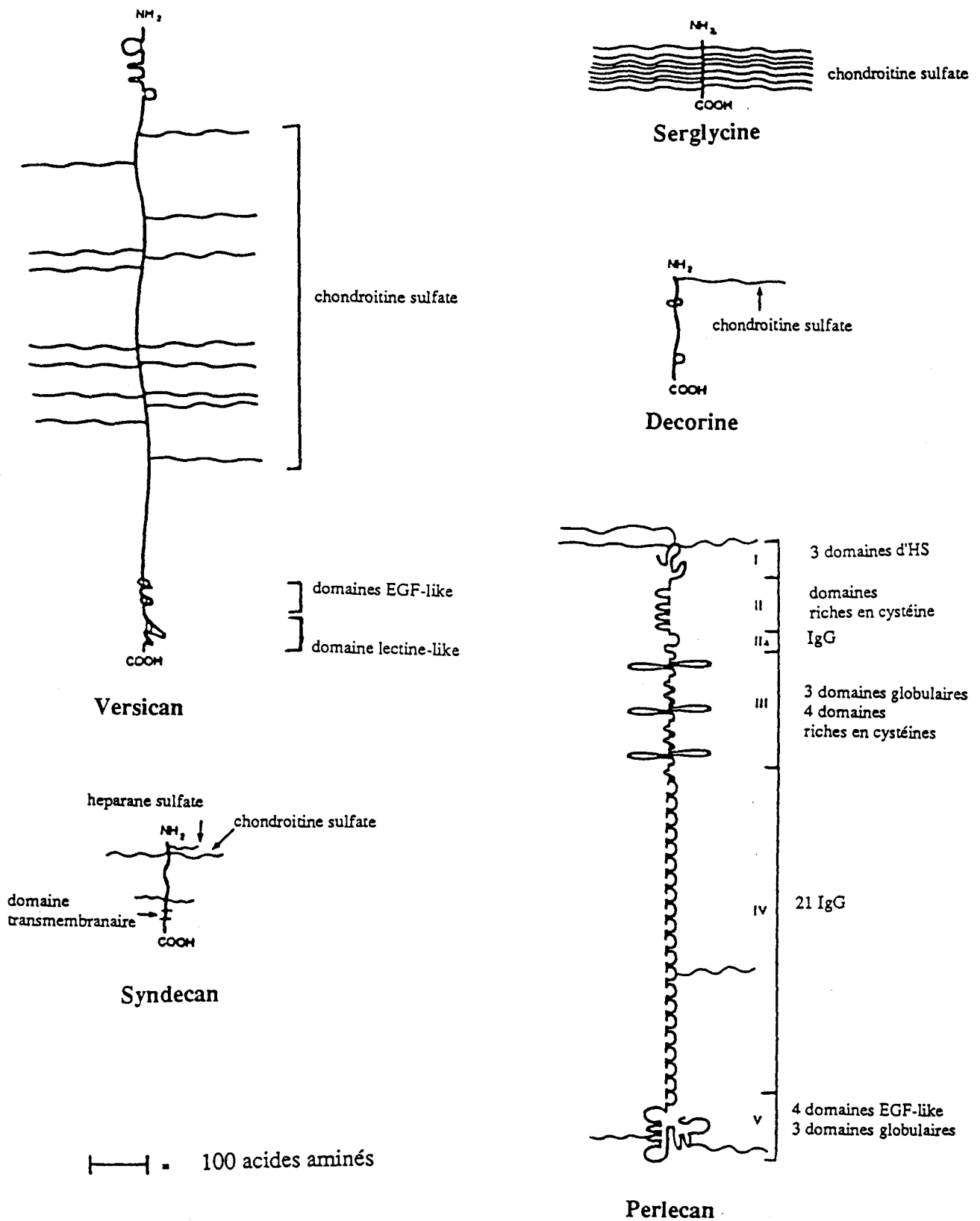


Figure 22 : Représentation schématique de la structure de quelques protéoglycannes. Une échelle de 100 acides aminés permet de mettre en évidence la grande diversité de taille des axes protéiques des protéoglycannes. On peut remarquer que le nombre de chaînes de GAG peut aller d'une seule chaîne unique (decorine) à plusieurs dizaines (serglycine). La répartition de ces chaînes glycaniques le long de l'axe protéique, ainsi que leur nature moléculaire confèrent aux protéoglycannes nombre de leur propriétés biologiques.
D'après Ruoslahti et al. 1992.

La sulfatation spécifique des sucres et/ou l'épimérisation de l'acide uronique en iduronate caractérisent les différents membres de cette famille : le chondroïtine 4-sulfate (ou chondroïtine sulfate A), le chondroïtine 6-sulfate (ou chondroïtine sulfate C) et le chondroïtine sulfate B, encore appelé dermatane sulfate.

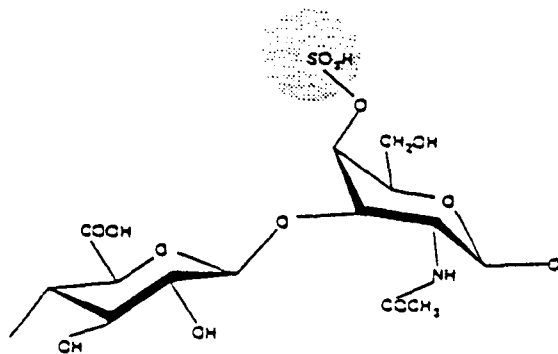
- 2 - La famille des héparane sulfates (HS) et de l'héparine (figure 23-2), dont le motif de base est constitué d'un acide glucuronique et d'une N-acétylglucosamine : $(\text{GlcUA } \beta\text{1-4 GlcNAc})_n$. La forme épimérisée de l'acide glucuronique (GlcUA), à savoir l'acide iduronique (IdoUA), est la forme la plus fréquente retrouvée dans le polymère d'héparine.

- 3 - La famille des kératane sulfates (KS) : $(\text{Gal } \beta\text{1-4 GlcNAc})_n$.

A l'inverse des autres glycosaminoglycannes, les KS ne contiennent pas d'acide uronique (figure 23-3). Ce sont des polymères de galactose et de N-acétylglucosamine (ou de glucosamine sulfatée).

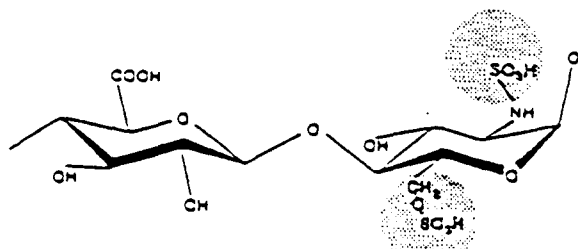
- 4 - Il existe, de plus, un type particulier de GAG dont la particularité essentielle est de ne pas être sulfaté : c'est l'acide hyaluronique composé d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine (figure 23-4).

Comme indiqué en figure 23, les GAG peuvent être substitués au cours de leur biosynthèse, par des groupements sulfates soit sous forme de O-ester, soit sous forme de N-ester. Les différents sites de sulfatation possibles sur les carbohydrates ajoutent encore à la diversité des chaînes glycaniques. La sulfatation spécifique des chaînes de GAG est importante puisque c'est elle qui confère un caractère anionique aux protéoglycannes, et leur fournit la haute densité de charges négatives, qui leur permet d'interagir avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire ainsi qu'avec certains facteurs de croissance, notamment le FGF-2.



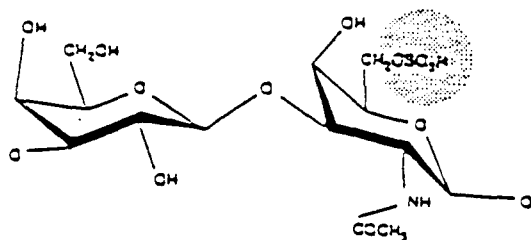
GlcUA(β 1-3)GalNAc(β 1-4)
or IdoUA(α 1-3)GalNAc(β 1-4)

1 - Chondroïtine sulfate



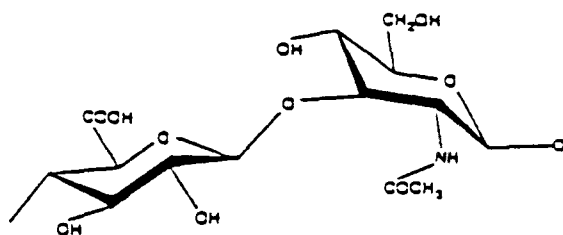
GlcUA(β 1-4)GlcNAc(α 1-4)
or IdoUA(α 1-4)GlcNAc(α 1-4)

2 - Héparane sulfate



Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)

3 - Keratane sulfate



GlcUA(β 1-3)GlcNAc(β 1-4)

4 - Acide hyaluronique
(non sulfaté)

Figure 23 : Unité disaccharidique constituant les chaînes des glycosaminoglycannes.

(1) Les chondroïtine sulfates (CS) et dermatane sulfates (DS) sont des structures polymériques dont le motif de base n fois répétés, est constitué par un acide hexuronique (iduronate ou glucuronate) et une N-acétylgalactosamine. La figure montre un groupement sulfate en position C4 de la N-acétylgalactosamine. (2) Les héparane sulfates (HS) et l'héparine sont caractérisés par un motif structural composé d'un acide uronique et d'une N-acétylglucosamine. Les différents sites de sulfatations possibles génèrent un grand nombre de structures possibles. La figure 2 ne nous illustre qu'une de ces possibilités. (3) Le motif structural des kératane sulfates (KS) est composé d'un galactose et d'une N-acétylglucosamine, qui peut être sulfatée. (4) L'acide hyaluronique (AH) est le seul GAG non sulfaté. Il est composé de disaccharides répétés d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine. Les chaînes d'HA ne sont jamais liées à un axe protéique. En ombré, sites typiques de sulfatation.

D'après Yanagishita 1993.

En plus de la diversité des chaînes glycaniques, les protéoglycannes présentent différents types d'axe protéique, apportant ainsi un degré supplémentaire à leur complexité moléculaire. La combinaison d'un axe protéique spécifique avec une ou plusieurs chaînes de GAG, donne naissance à un protéoglycane particulier, ayant une structure, des propriétés biologiques et une localisation qui lui sont propres.

Il est ainsi possible de classer les protéoglycannes en fonction de leur localisation cellulaire principale (1) en protéoglycannes extracellulaires (ou de la matrice extracellulaire), en (2) protéoglycannes de la surface cellulaire et en (3) protéoglycannes intracellulaires (tableau 4).

<i>Nom</i>	<i>Type de GAG</i>	<i>Nombre de chaînes de GAG</i>	<i>Axe Protéique (kDa)</i>
(1) PG Extracellulaires			
Versican	CS	12-15	265
Aggrecan	CS/DS	~100	208-221
Decorine	CS/DS	1	36
Biglycan	CS/DS	2	38
Fibromoduline	KS	1	42
Perlecan	HS	2-15	400
(2) PG de la surface cellulaire			
Syndecan (s)	HS ou HS/CS	1-3	30-80
Glypican	HS	3-4	62
Betaglycan	CS/HS	1-4	110
Thrombomoduline	CS	1	58-60
NG2	CS	2-3	251
(3) PG Intracellulaires			
Serglycine	CS/DS	10-15	10-19

Tableau 4 : Classification des principaux protéoglycannes selon leur localisation.

D'après Esko, 1991.

Les *protéoglycannes extracellulaires* peuvent être de grande taille comme le versican (265 kDa), ou de taille beaucoup plus modeste comme la decorine (36 kDa). Ils présentent des propriétés mécaniques importantes et possèdent de nombreuses charges négatives qui favorisent la rétention d'eau et de sels, constituant un environnement hydraté favorable à tous les phénomènes de transport et d'échanges. Ils interagissent également avec d'autres constituants comme le collagène ou la fibronectine. D'une manière générale, on remarquera que ces protéoglycannes présentent essentiellement des chaînes de type chondroïtine sulfate (CS). Dans la lame basale, il faut noter cependant l'expression spécifique d'un HSPG de haut poids moléculaire (axe protéique de 400 kDa), le perlecan, présent dans la glande mammaire normale et tumorale (Guelstein et al. 1993 ; Iozzo et al. 1994). Cet HSPG (qui tire son nom de l'allure en collier de perle qu'il présente en microscopie électronique) est capable de se lier fortement au FGF-2 et semble impliqué dans la néovascularisation induite par ce facteur de croissance (Aviezer et al. 1994a).

Parmi les *protéoglycannes de la surface cellulaire*, on distingue tout d'abord les protéoglycannes transmembranaires, qui possèdent un ancrage dans la membrane. L'exemple le plus représentatif de ce type de PG est le syndecan (Saunders et al. 1989 ; Kiefer et al. 1990 ; Bernfield et al. 1992 ; Elenius et Jalkanen, 1994). En fait, il convient de parler de famille du syndecan. A l'heure actuelle, quatre membres ont pu être répertoriés : le syndecan-1, de nature hybride, c'est-à-dire comportant à la fois des chaînes HS et des chaînes CS ; le syndecan-2 ou fibroglycan ; le syndecan-3 encore appelé N-syndecan (neuro-syndecan) ; et enfin le syndecan-4 (amphiglycan ou ruydocan) (revue dans Elenius et Jalkanen, 1994). Initialement isolé des cellules mammaires murines NMuMg, le syndecan-1 comporte un axe protéique de 309 acides aminés (figure 22 et figure 24 A). Du côté C-terminal, une courte séquence (34 acides aminés) constitue le domaine intracellulaire cytoplasmique. Le domaine transmembranaire est constitué par 25 acides aminés hydrophobes. Il faut également noter l'existence d'un site de clivage protéolytique (séquence basique) à proximité du domaine transmembranaire (Rapraeger et al. 1985). La partie extracellulaire qu'on appelle également *ectodomaine*, comporte cinq sites potentiels d'attachement des chaînes de GAG.

Peut se lier aux molécules de la matrice extracellulaire (collagène I, III, fibronectine) et aux facteurs de croissance comme le FGF-2.

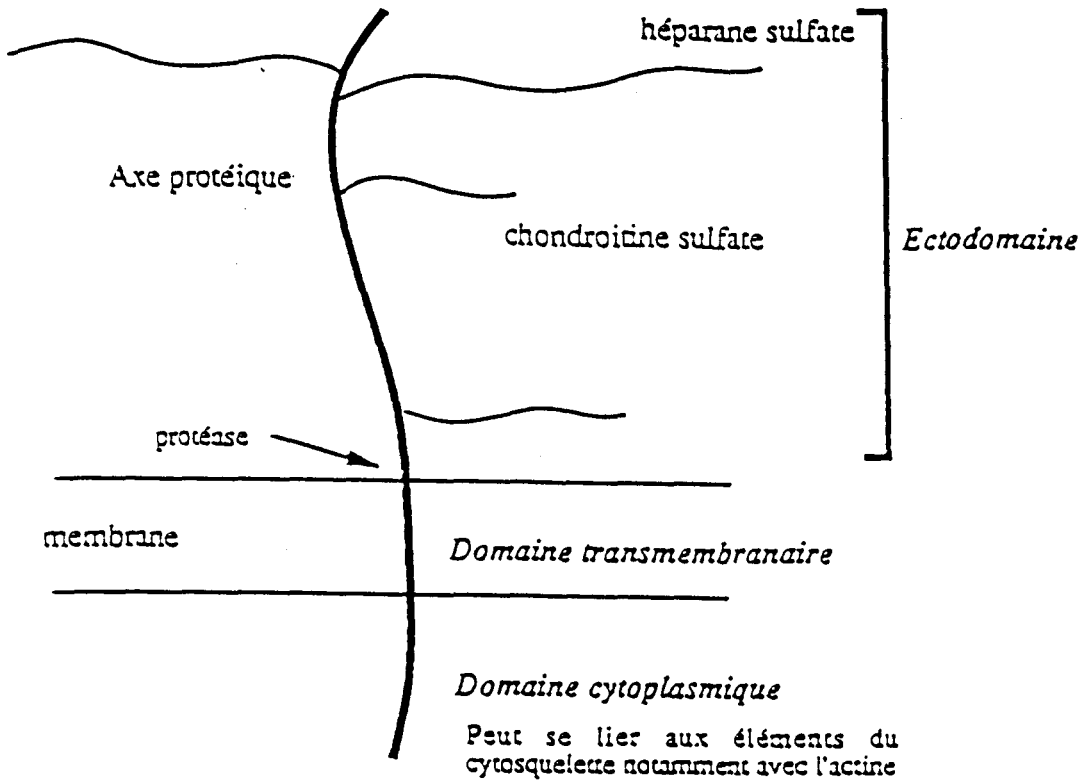


Figure 24-A : Représentation schématique du syndécan-1.

Le syndécan-1 est le prototype des protéoglycannes de type héparane sulfate qui possèdent un domaine transmembranaire. Il possède à la fois des chaînes d'héparane sulfates (capables de lier le FGF-2), et des chaînes de chondroïtine sulfates. La partie cytoplasmique du syndécan peut se lier aux éléments du cytosquelette et notamment à l'actine. Un site de clivage par des protéases permet la libération de l'ectodomaine dans le milieu extracellulaire.

D'après Bernfield et al. 1992.

La longueur et le nombre de chaînes de GAG varient en fonction de l'organisation de l'épithélium qu'il soit simple ou stratifié : on parle de polymorphisme du syndecan (Sanderson et Bernfield, 1988). Le syndecan (du grec "syndein", qui lie ensemble) est capable de se lier à de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire telles que le collagène I, le collagène IV, la fibronectine, la tenascine ou encore à l'actine du cytosquelette (Fernandez-Borja et al. 1995 ; revues dans Elenius et Jalkanen, 1994 ; Salmivirta et Jalkanen, 1995). Le syndecan-1 a été le premier HSPG identifié comme site de basse affinité du FGF-2 (Kiefer et al. 1990).

Un autre protéoglycane transmembranaire remarquable est le betaglycan, qui est en fait le récepteur de Type III du TGF β (Lopez-Casillas et al. 1991). Il faciliterait le transfert de cette molécule jusqu'aux récepteurs I et II (récepteurs de type *Ser/Thr* kinase, qui sont responsables de la transduction ^{du} signal). Une particularité du betaglycan est sa capacité de lier le TGF β par sa partie protéique alors qu'il peut fixer le FGF-2 par ses chaînes de GAG de type HS (Andres et al. 1992).

L'autre grande catégorie de protéoglycannes de surface est représentée par le glypican (figure 24 B). Ne possédant ni domaine transmembranaire hydrophobe, ni domaine cytoplasmique, il est retenu à la surface des cellules par un glycoposphatidylinositol (GPI). Un traitement par la phospholipase C libère spécifiquement le FGF-2 complexé à ces protéoglycannes de type HSPG des membranes cellulaires suggérant que les glypicans *pourraient* également représenter des sites de fixation du FGF-2, notamment à la surface des cellules stromales de moelle osseuse (Brunner et al. 1991 ; Brunner et al. 1994).

Les protéoglycannes intracellulaires, beaucoup moins nombreux et de petite taille ont des fonctions très spécifiques. Citons pour exemple la serglycine qui est localisée dans des granules de sécrétion des cellules hématopoïétiques. Elle interagit spécifiquement avec des protéases et semble jouer un rôle dans les réactions de défense de l'organisme (revue dans Jackson et al. 1991).

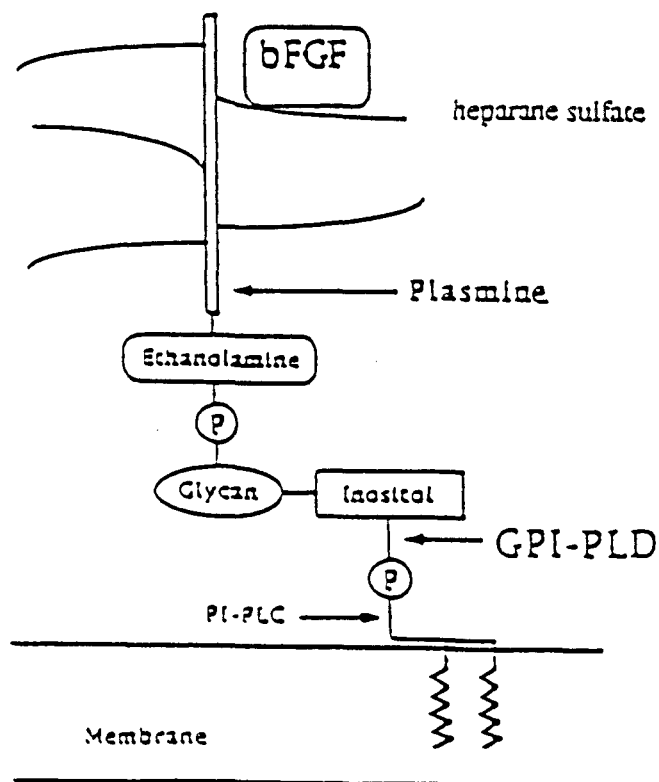


Figure 24-B : Représentation schématique du glypican.

Le glypican est retenu à la surface cellulaire par un glycoposphatidyl inositol (GPI). Il ne possède ni de domaine transmembranaire, ni de domaine cytoplasmique. Comme indiqué sur le schéma, plusieurs enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (plasmine, PLC, PLD) sont capables de libérer le FGF-2 liés à des fragments de PG plus ou moins grands.

PLC/PLD: phospholipase C/D .

D'après Brunner et al. 1994.

Comme nous venons de le décrire, les PG sont donc une famille complexe de macromolécules, dont la haute densité de charges négatives portées par leurs groupements sulfates, leur permet d'interagir spécifiquement avec des molécules de la matrice extracellulaire et notamment avec le FGF-2. Par leurs chaînes d'héparane sulfates, ils représentent ainsi les sites de basse affinité du FGF-2 déjà décrits dans plusieurs modèles (revue dans Gallagher, 1994). Dans le cancer du sein, par des études de radiorécepteurs, ces sites de basse affinité ont été découverts en très grande quantité sur les cellules métastatiques MDA-MB-231 (Peyrat et al. 1991), insensibles au FGF-2 (Peyrat et al. 1991 ; Delehedde et al. 1995) alors qu'elles possèdent des sites de liaison de haute affinité comme les cellules sensibles MCF-7. Notre hypothèse de travail est qu'une modification de la quantité et/ou de la nature des PG pourrait rendre compte de la différence de sensibilité de ces cellules au FGF-2. Aussi, après marquage métabolique par le [³⁵S] Sulfate, nous avons purifié et caractérisé les protéoglycannes synthétisés par les cellules épithéliales mammaires en culture.

II - MATERIELS ET METHODES.

II-1 - Isolement des protéoglycannes des cellules épithéliales mammaires.

Les cellules en phase exponentielle de croissance (60 % de confluence), cultivées dans des boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre (Falcon), sont incubées pendant 24 heures, en présence de 25 µCi/ml de Na₂³⁵SO₄ (ICN) dans 12 ml de milieu MEM contenant 10 % de SVF. Le milieu de culture est récupéré à la fin de la période d'incubation et la couche cellulaire est rincée par 3 ml de PBS. Ce premier rinçage est ajouté au milieu de culture et l'ensemble est centrifugé pendant 10 mn, à 1500 tours/mn, afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires. En ce qui concerne la couche cellulaire, après deux nouveaux rinçages par 5 ml de PBS, les cellules sont décollées par grattage et lysées dans 5 ml de tampon de dissociation (pH 5.8) contenant 4 M de chlorure de guanidyle, 50 mM d'acétate de sodium, des inhibiteurs de protéases (10 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 0.1 mM

phénylméthylsulfonylfluoride ou PMSF) ainsi que 0.3 % Triton X-100. Cet extrait cellulaire est placé à 4°C et sous agitation pendant 12 heures.

Parallèlement, la densité cellulaire est déterminée par comptage (cellule de Mallassez) et la quantité totale de protéines est mesurée par la méthode de Bradford (1976) (microtest BIORAD, la sérum albumine bovine servant de standard).

II-2 - Chromatographie échangeuse d'anions.

En raison de la forte densité de charges négatives de leurs chaînes de GAG, les PG peuvent être purifiés par chromatographie échangeuse d'anions. La résine employée est une base faible (Diethylaminoethyl, DEAE-Sephacel, Pharmacia), chargée positivement lorsqu'elle est ionisée, sur laquelle les PG pourront se lier de manière réversible au cours de la phase de dépôt. Un gradient linéaire de chlorure de sodium permet l'élution spécifique de ces macromolécules en fonction de leur densité de charge.

L'extrait cellulaire (en 4 M GnHCl) et le surnageant de culture sont dilués respectivement de 40 et 2 fois, afin que leurs concentrations en sels soient inférieures à la molarité du tampon d'équilibration (0.1 M NaCl). La molarité des solutions a été estimée par la mesure de la résistivité (conductimètre Accumet 30, Osi). Des inhibiteurs de protéases (10 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 0.05 mM PMSF, 0.1 M acide hexanoïque), 10 mM Tris/HCl et 0.3 % de Triton X-100 sont ajoutés à l'échantillon. Le dépôt est réalisé sous gravité et à 4°C, sur une colonne de DEAE-Sephacel (2 cm) préalablement équilibrée dans un tampon 0.1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 0.3 % Triton X-100. La colonne est ensuite abondamment rincée dans le tampon 50 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 0.5 % CHAPS pH 7.4, de manière, d'une part à éliminer le sulfate libre et les glycoprotéines sulfatées, et d'autre part à échanger le détergent. L'élution est réalisée à 7 ml/hr par un gradient linéaire (30 ml/30 ml) de NaCl (de 0.15 à 1.5 M), en présence de 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) et de 0.5 % de CHAPS. Des fractions de 1 ml sont collectées et un aliquot (50 µl-100 µl) est prélevé afin de déterminer la radioactivité totale de l'échantillon.

II-3 - Identification des chaînes de GAG par digestions enzymatiques.

Les chaînes de GAG ont été identifiées sur la base de leurs sensibilités à l'héparitinase (Jandik et al. 1994) et à la chondroitinase (Yamagata et al. 1968).

Les fractions de DEAE-Sephacel contenant les protéoglycannes radiomarqués, sont rassemblées et dessalées par dialyse contre le tampon de digestion (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM d'acide hexanoïque, 0.1 % CHAPS, pH 7). Trois aliquots identiques de 1 ml sont prélevés, complétés à 1 mg/ml de SAB, et incubés pendant une heure à 37°C en présence d'enzymes spécifiques. L'héparitinase, isolée de *Flavobacterium heparinum* (EC 4.2.2.8, Seigagaku Corporation, Tokyo) est utilisée à une concentration de 0.01 UI/ml. Cette enzyme permet la dégradation spécifique des résidus de glucosamine N-sulfatée et N-acétylée (Jandik et al. 1994). La chondroitinase ABC, isolée de *Proteus vulgaris* (EC 4.2.2.4, ICN) libère les chaînes de chondroïtine sulfates et de dermatane sulfates de l'axe protéique. Elle est utilisée à la concentration de 0.1 UI/ml. Un témoin de la digestion enzymatique est toujours réalisé en absence d'enzyme. Les tailles des protéoglycannes purifiés après DEAE-Sephacel et des fragments digérés sont déterminées par chromatographie de tamisage moléculaire (Sephacel CL-6B).

II-4 - Chromatographie de tamisage moléculaire.

Les PG et les produits issus de la digestion enzymatique vont pouvoir être séparés en fonction de la vitesse avec laquelle ils traversent les pores de la résine, c'est-à-dire suivant leur taille. Les PG de grande taille seront exclus, car incapables de pénétrer dans les pores de la résine. Ils sortiront donc très rapidement de la colonne. Par contre les molécules de petite taille seront retardées en passant dans les pores de la résine.

L'échantillon en 4 M GnHCl (1 ml) est déposé sur la colonne de Sepharose CL-6B (0.9 x 60 cm) équilibrée en 4 M GnHCl, 50 mM Tris/HCl, 0.3 % Triton X-100, pH 7. L'élution est réalisée dans ce même tampon (débit : 10 ml/h). Des fractions de 1 ml sont collectées et un aliquot (100 µl-300 µl) est prélevé afin de déterminer la radioactivité totale de chaque fraction.

La taille des macromolécules sur chromatographie de tamisage moléculaire est représentée par le K_{av} , défini comme suit :

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

où V_0 représente le volume mort de la colonne (déterminé par le bleu dextran), V_t le volume total de la colonne (déterminé par le rouge de phénol) et V_e le volume d'éluion des macromolécules étudiées.

II-5 - Méthode de dosage colorimétrique des protéoglycannes sulfatés par le bleu Alcian.

Le protocole suivi a été précédemment décrit par Buée et al. (1991). Des filtres de membrane cationique (Zetaprobe, Biorad) sont préhydratés et équilibrés dans un tampon TBS (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl) sous agitation, pendant 30 mn, à 20°C. Ces filtres sont déposés sur un appareil de Dot-Blot (Millipore) et chaque puits est lavé sous vide par 0.5 ml de TBS. Les échantillons, préparés en tampon TUT (8 M urée, 10 mM Tris/HCl, pH 8, 0.1 % Triton X-100) sont déposés et filtrés sous vide. Les puits sont rincés par 2 x 0.5 ml de TUT. Les membranes sont alors récupérées et lavées séparément dans 6 bains de 50 ml de TBS contenant 0.3 % de Triton X-100, et ce afin d'éliminer l'urée en excès. Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante et sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées pendant 20 mn, dans 3 ml de la solution de coloration (pH 5.7) contenant 0.05 M acétate de sodium, 0.05 M NaCl, 0.05 M MgCl₂, 0.2 % bleu Alcian (8GX, Sigma). Elles sont ensuite rincées abondamment par l'eau courante (6 x 20 ml x 10 mn), puis séchées. Une gamme-étalon est réalisée parallèlement à l'aide de concentrations croissantes (0 à 100 µg) de chondroïtine sulfates (cartilage de requin, Sigma). Les quantités de PG sulfatés sont ensuite déterminées par analyse densitométrique, réalisée après digitalisation de l'image (scanner) grâce au logiciel Diversity One (LKB, Pharmacia) installé sur station Sun (Sparc Classic).

III - RESULTATS.

III-1 - Incorporation globale de [³⁵S] Sulfate dans les protéoglycannes néosynthétisés.

La synthèse des protéoglycannes par les cellules épithéliales mammaires a été estimée par incorporation de sulfate radioactif lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu complet contenant 10 % de SVF. Après 24 heures de marquage métabolique, les protéoglycannes ont été purifiés par chromatographie DEAE-Sephacel et l'incorporation globale a été déterminée par mesure de la radioactivité totale éluée (tableau 5). Les données résultent de la moyenne de trois expériences indépendantes. Les cellules étudiées (MCF-7 et MDA-MB-231) présentant les mêmes quantités de protéines, nos résultats ont toujours été exprimés en cpm/10⁶ cellules.

	MCF-7 ³⁵ S cpm/10 ⁶ cellules	MDA-MB-231 ³⁵ S cpm/10 ⁶ cellules
Couche Cellulaire	11409 ± 2898	22615 ± 4029
Milieu de Culture	14020 ± 863	21548 ± 2858
Total	25429 ± 3761	44163 ± 6887

Tableau 5 : Incorporation globale de [³⁵S] Sulfate dans les PG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires. Les résultats sont exprimés en ³⁵S cpm/10⁶ cellules (moyenne ± l'écart type). Les fractions obtenues sont purifiées de chromatographie DEAE-Sephacel comme décrit dans la section matériels et méthodes.

En totalité, les cellules MCF-7 incorporent 2 fois moins de [³⁵S] Sulfate que les cellules MDA-MB-231. Les protéoglycannes libérés dans leur milieu de culture par les cellules MCF-7 correspondent approximativement à 55 % des protéoglycannes totaux synthétisés. Pour chaque lignée cellulaire, le niveau global de radiosulfate incorporé dans la couche cellulaire est comparable à celui mesuré dans le milieu de culture (50 %/50 %).

En effet, les cellules épithéliales mammaires libèrent dans le milieu de culture autant de macromolécules sulfatées qu'elles en retiennent dans leur couche cellulaire.

III-2 - Descriptif et analyse des profils chromatographiques : charge, taille et nature des protéoglycannes.

a - protéoglycannes de la couche cellulaire des MDA-MB-231.

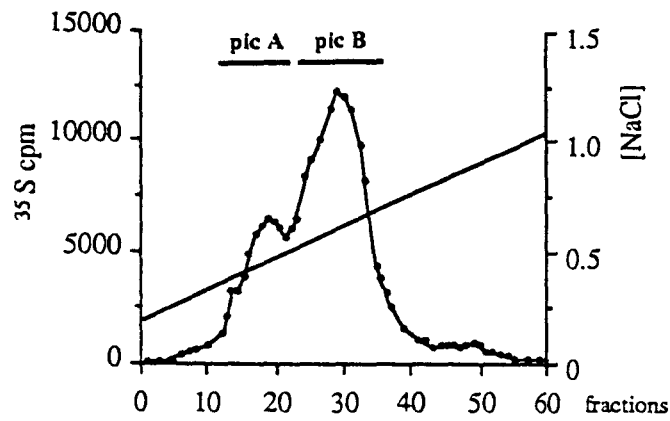
Le profil d'élution des protéoglycannes des cellules MDA-MB-231 sur chromatographie DEAE-Sephacel est reporté en figure 25. Les protéoglycannes élués sont séparés suivant leur charge et présentent deux pics à 0.4 et 0.55 M NaCl. Les fractions sont rassemblées en pic A et en pic B comme indiqué en figure 25.

La masse moléculaire du matériel purifié sur colonne échangeuse d'ions, est analysée sur des colonnes de Sepharose CL-6B en 4 M guanidine/HCl et 0.3 % de Triton X-100 (conditions dissociantes). Le matériel du pic A est élué selon deux pics ayant des K_{av} moyens de 0.1 et de 0.7, représentant respectivement 40 et 60 % des macromolécules sulfatées synthétisées. Le matériel du pic B est, pour sa part, élué pour un K_{av} moyen de 0.35.

La nature des chaînes polysaccharidiques a été étudiée après digestion enzymatique comme décrit dans la section matériel et méthodes. Ainsi, le matériel du pic de K_{av} moyen 0.1 disparaît totalement après action de l'héparitinase (figure 25). Il comprend donc essentiellement des protéoglycannes de type héparane sulfates (78 %). Les produits issus de cette dégradation enzymatique sont retenus sur la colonne de gel filtration et sortent en position proche du V_t . De plus, on observe que le pic de K_{av} 0.7 est également dégradé par l'héparitinase. Ce pic semble donc constitué de GAG libres de type HS, peu ou pas lié à une protéine. Après digestion par la chondroitinase ABC, nous avons pu constater que seulement 22 % des molécules sulfatées du pic A sont de type chondroïtine sulfates (CS).

En ce qui concerne le pic B (K_{av} 0.35), un traitement par l'héparitinase entraîne un déplacement du pic vers les plus faibles poids moléculaires. Le matériel digéré, plus petit, est retardé sur la colonne et élué pour une position de K_{av} de 0.47. Un second pic correspondant aux produits de dégradation enzymatique, apparaît pour un K_{av} de 0.88. Par contre, 70 % des macromolécules du pic de K_{av} 0.35 sont dégradées par la chondroitinase ABC et sont donc de type CSPG.

DEAE-Sephacel



Sepharose CL-6B

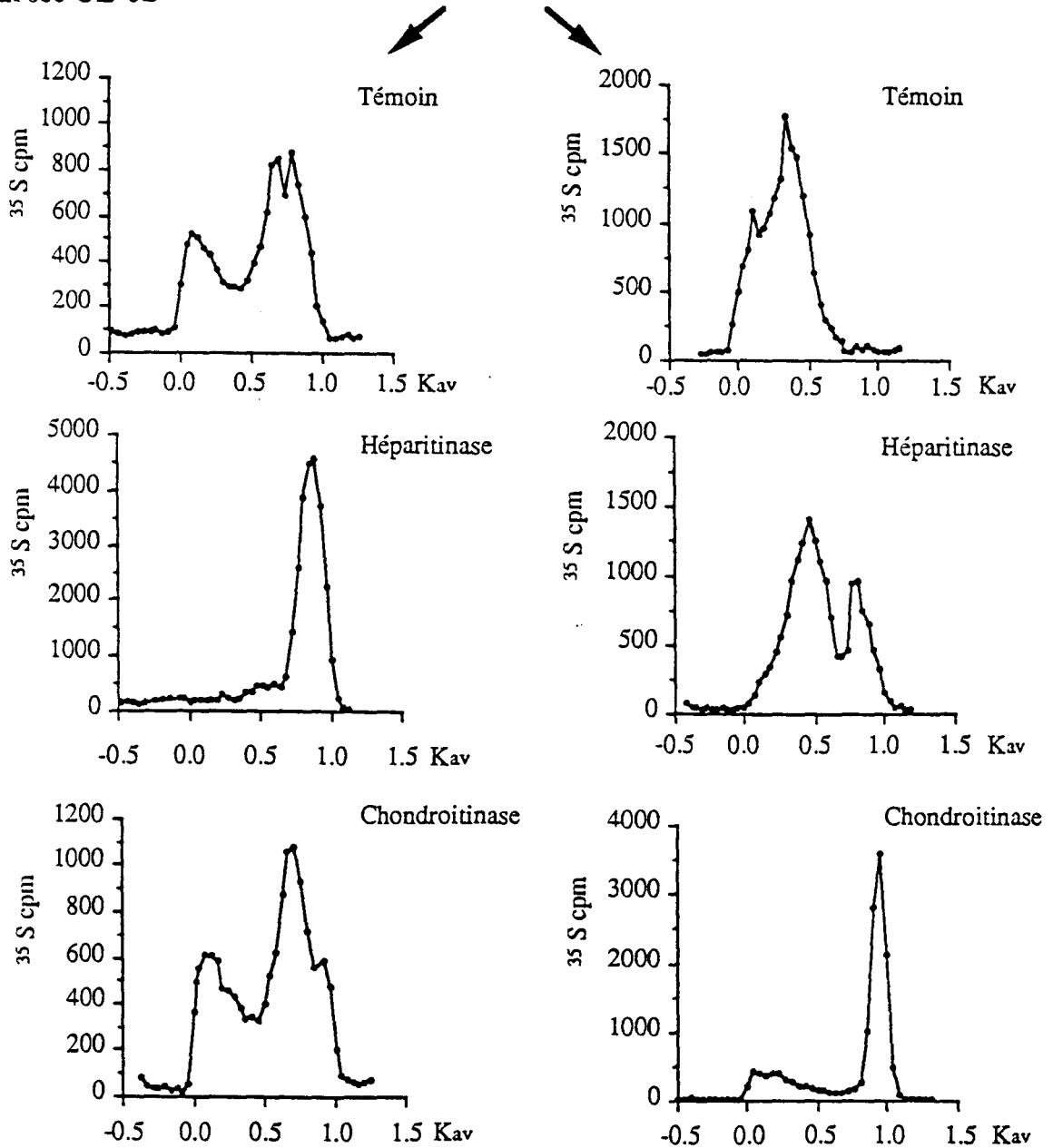


Figure 25 : Séparation et caractérisation des protéoglycannes des cellules MDA-MB-231. Les PG radiomarqués sont séparés suivant leur charge par chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Sephacel). Deux fractions A et B peuvent alors être analysées. La taille et la nature des chaînes GAG (après digestion enzymatique) sont étudiées par chromatographies de Sepharose CL-6B. Les témoins n'ont fait l'objet d'aucune digestion.

Le pourcentage de chaque catégorie de GAG a été calculé en fonction de la dégradation enzymatique. Les résultats obtenus sont regroupés dans des tableaux récapitulatifs de la taille et de la charge (tableau 6), de la nature et de la répartition des protéoglycannes dans chaque compartiment cellulaire étudié (tableau 7).

Ainsi, les proportions globales d'HSPG et de CSPG sont respectivement de 56 % et de 44 % (tableau 7). Les CSPG synthétisés sont caractérisés par leur petite taille (K_{av} 0.35). Plusieurs populations de molécules sensibles à l'héparitinase ont été identifiées : un HSPG de grande taille (K_{av} 0.1) et une population correspondant vraisemblablement à des GAG libres, qui représentent 60 % des macromolécules sulfatées de la fraction A et 30 % des PG totaux synthétisés dans la couche cellulaire.

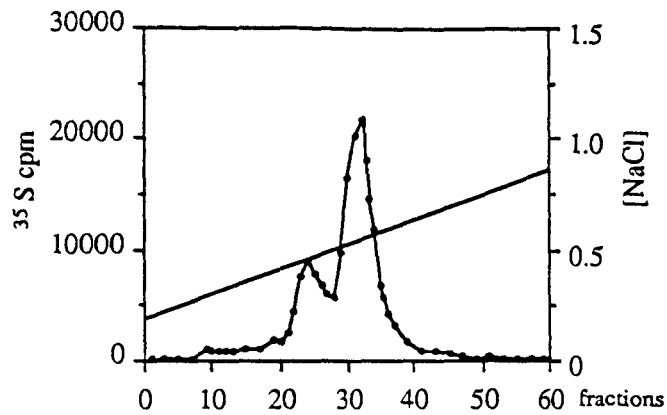
b - protéoglycannes libérés dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231.

La figure 26 nous montre tout d'abord le profil d'élution des protéoglycannes libérés dans le milieu de culture par les cellules MDA-MB-231 sur DEAE-Sephacel. Deux pics sont observés à 0.5 et 0.65 M NaCl. Les fractions contenant les protéoglycannes élués entre 0.3 et 0.7 M NaCl sont rassemblées et chromatographiées sur une colonne de Sepharose CL-6B.

Les PG sont caractérisés par un pic unique présentant un K_{av} moyen égal à 0.16 sur chromatographie de Sepharose CL-6B. Les protéoglycannes libérés dans le milieu de culture par les cellules MDA-MB-231 sont donc de grande taille. Seulement 34 % du matériel de ce pic est sensible à la digestion enzymatique par l'héparitinase (figure 26). Aucun déplacement significatif de la position d'élution (K_{av} 0.16) n'est observé après ce traitement, seule l'amplitude de ce pic est réduite. Les CSPG sont donc de grande taille. Par contre, après digestion par la chondroitinase ABC, 66 % du matériel du pic de K_{av} 0.16 est dégradé et élué en position du V_t (K_{av} 0.92). On remarque aussi que les HSPG sont également de grande taille (pic résiduel de K_{av} 0.1).

Ainsi, les cellules MDA-MB-231 libèrent principalement dans leur milieu de culture des protéoglycannes dont 66 % de CSPG de grande taille, ainsi qu'une plus faible proportion d'HSPG également de grande taille et de charge comparable (tableau 6).

DEAE-Sephacel



Sepharose CL-6B

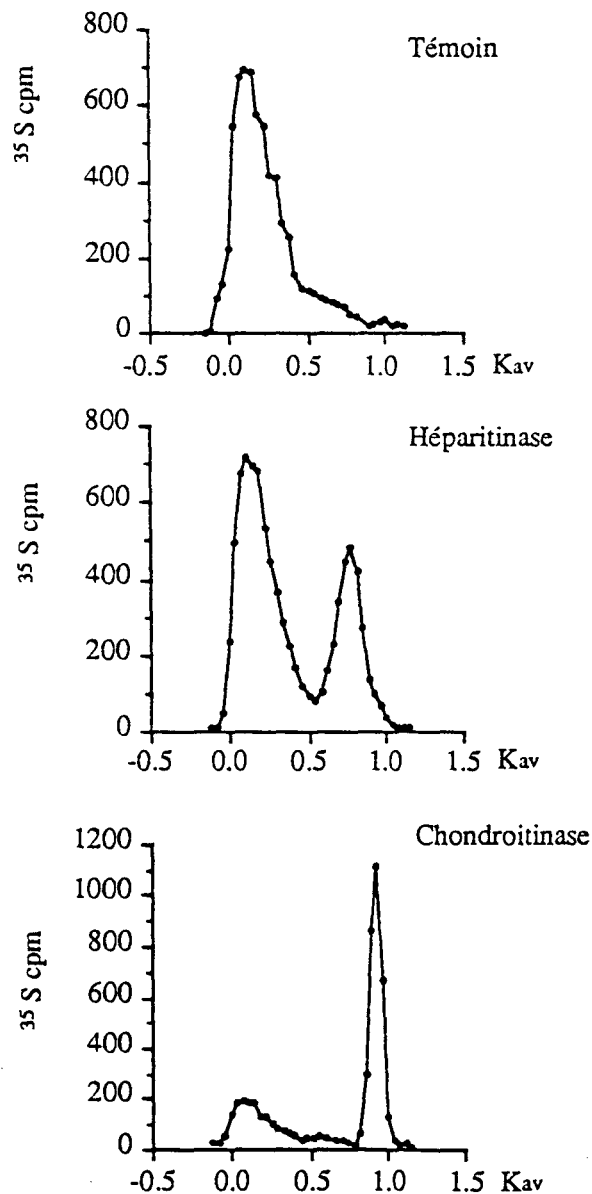


Figure 26 : Séparation et caractérisation des protéoglycannes libérés dans le milieu de culture par les cellules MDA-MB-231. Après marquage par le $[^{35}\text{S}]$ Sulfate, les PG sont purifiés par DEAE-Sephacel. Les fractions obtenues sont analysées par chromatographie de tamisage moléculaire (Sepharose CL-6B). La nature des chaînes glycaniques est déterminée par digestion enzymatique spécifique par l'héparitinase ou par la chondroitinase ABC.

En conclusion, les cellules MDA-MB-231 sont caractérisées par la présence dans leur couche cellulaire d'HSPG de grande taille (K_{av} 0.1). De plus, elles présentent spécifiquement des produits de petite taille (K_{av} 0.7) qui pourraient correspondre à des GAG libres non liés à un axe protéique. Dans le milieu de culture, elles libèrent des protéoglycannes de grande taille majoritairement de type CSPG (66 %) caractérisés par une haute densité de charge.

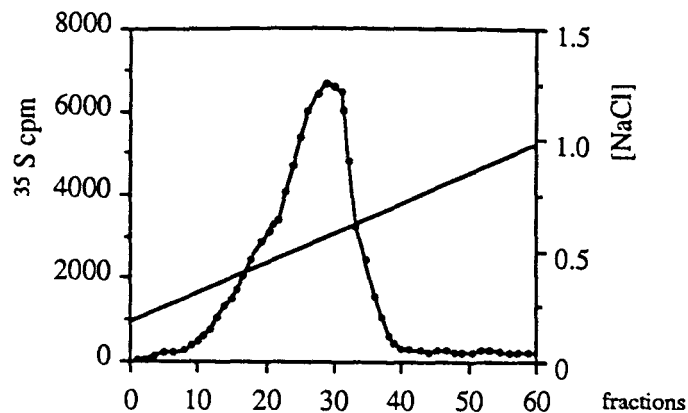
c - protéoglycannes de la couche cellulaire des MCF-7.

Les protéoglycannes des cellules MCF-7 sont élués en un seul pic à large base présentant un maximum à 0.62 M NaCl selon le profil d'éluion présenté en figure 27. Globalement, les protéoglycannes de la couche cellulaire des cellules MCF-7 présentent une charge beaucoup plus élevée que ceux des cellules MDA-MB-231, précédemment présentées. Les PG n'ont pu être séparés suivant leur charge. Aussi, les fractions comprises entre 0.3 et 0.7 M NaCl sont rassemblées et la taille des protéoglycannes est analysée sur des colonnes de Sepharose CL-6B en conditions dissociantes (4 M GnHCl et 0.3 % Triton X-100).

Ce matériel est élué de colonne de Sepharose CL-6B, en un pic présentant un maximum de K_{av} 0.42. Le pic de très faible amplitude de position d'éluion (K_{av} 0.75) pourrait correspondre à des GAG libres (non liés à un axe protéique). Après action de l'héparitinase, le pic témoin (K_{av} 0.42) n'est que partiellement dégradé et un second pic correspondant aux produits de la dégradation enzymatique, apparaît pour un K_{av} de 0.85. Seulement 38 % des PG totaux de la couche cellulaire sont donc sensibles à l'action de l'héparitinase. Par contre, 62 % du matériel du pic témoin est dégradé par la chondroitinase ABC. Le pic résiduel présente un K_{av} de 0.3 et correspond donc à des molécules de type HSPG de taille intermédiaire.

Ainsi, les cellules MCF-7 synthétisent majoritairement des CSPG (62 %) dans leur couche cellulaire (tableau 7). Ces CSPG sont caractérisés par leur haute densité de charge et leur petite taille (K_{av} 0.42) (tableau 6). Contrairement aux cellules MDA-MB-231, les HSPG apparaissent donc comme minoritaires (38 %) au sein de la couche cellulaire des cellules MCF-7.

DEAE-Sephacel



Sepharose CL-6B

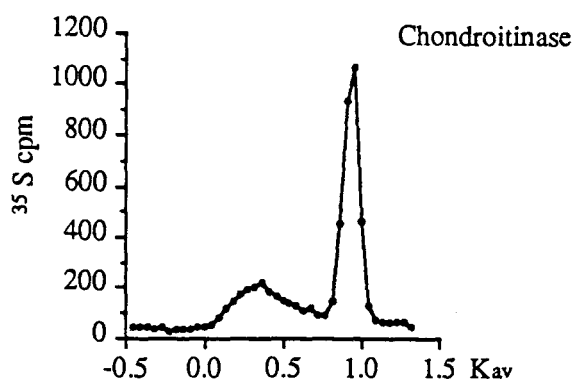
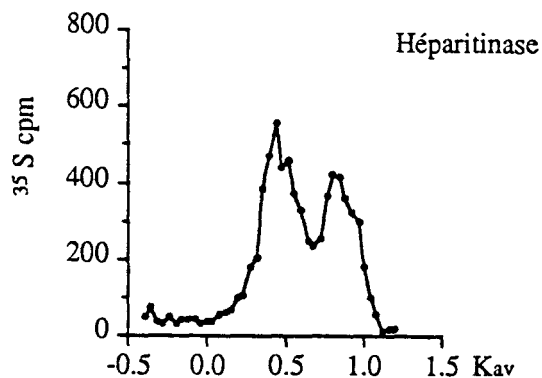
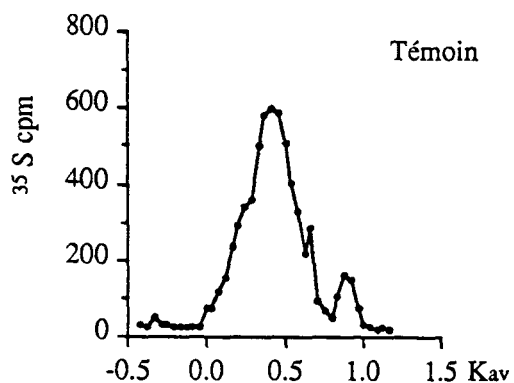


Figure 27 : Séparation et caractérisation des protéoglycannes des cellules MCF-7. Après marquage par le $[^{35}\text{S}]$ Sulfate, les PG sont purifiés par chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Sephacel) et la nature des chaînes glycaniques est déterminée après digestion enzymatique par l'héparitinase ou la chondroitinase ABC, comme décrit dans la section matériels et méthodes.

d - protéoglycannes libérés dans le milieu de culture des cellules MCF-7.

Le profil d'élution de DEAE-Sephacel des protéoglycannes libérés par les cellules MCF-7 est reporté en figure 28. La molarité d'élution nécessaire pour éluer les protéoglycannes est comprise entre 0.3 et 0.8 M NaCl. Deux pics sont observés à 0.5 et 0.6 M NaCl.

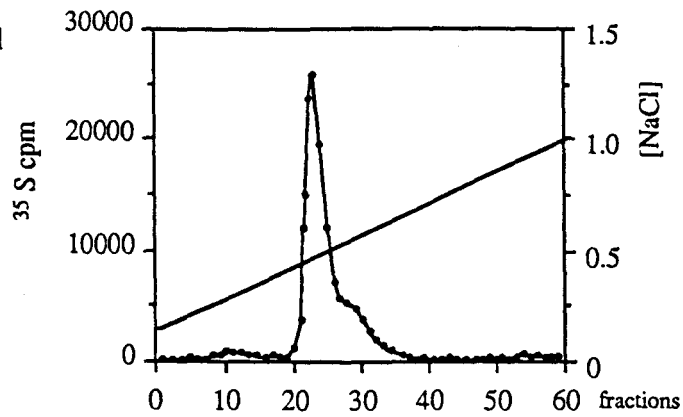
Le matériel non digéré est élué selon deux pics, ayant comme position d'élution les K_{av} respectifs de 0.05 et de 0.25, après chromatographie de gel filtration (Sephacel CL-6B). Le premier pic (K_{av} de 0.05), quasiment exclu, est fortement réduit après action de l'héparitinase. Il est donc constitué essentiellement de protéoglycannes de type HS (65 %). Le pic à 0.25 ne semble pas sensible à la digestion enzymatique par l'héparitinase.

Par contre, après traitement par la chondroitinase ABC, aucun déplacement significatif de la position d'élution du premier pic (K_{av} 0.05) n'est observé. Le second pic en position 0.25 de K_{av} est quant à lui, partiellement dégradé et les produits résultant de la digestion enzymatique apparaissent au niveau du V_t (K_{av} 0.9). Ce pic est constitué d'une population de CSPG qui correspond à 35 % des PG totaux (tableau 7).

Ainsi, les cellules MCF-7 libèrent majoritairement dans leur milieu de culture des HSPG (65 %) caractérisés par leur densité de charge élevée et leur grande taille. D'un point de vue quantitatif, on remarquera cependant que l'incorporation globale de [35 S] Sulfate dans les HSPG libérés par les cellules MCF-7 est du même ordre que celle mesurée dans les PG libérés par les cellules MDA-MB-231 dans leur milieu de culture (tableau 7/figure 29).

En conclusion, à l'inverse des cellules MDA-MB-231, les cellules MCF-7 synthétisent préférentiellement dans leur couche cellulaire des CSPG (62 %) très chargés (tableau 6). Par contre, elles libèrent majoritairement des HSPG (68 %) dans leur milieu de culture dont un HSPG de grande taille (K_{av} 0.05) (tableau 7).

DEAE-Sephacel



Sepharose CL-6B

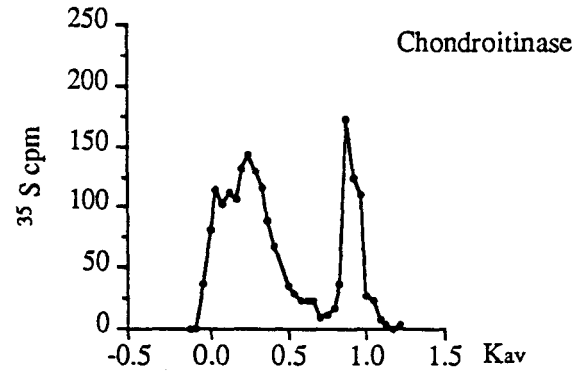
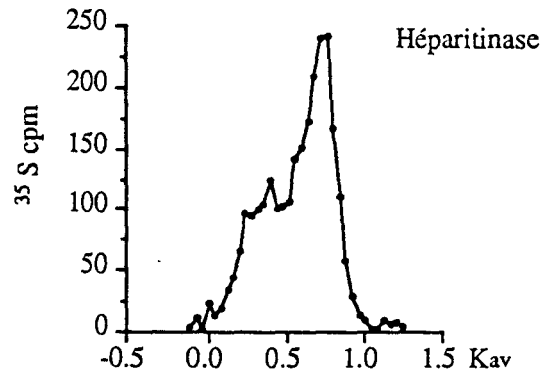
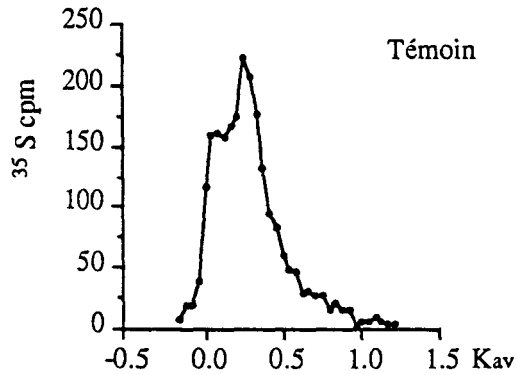


Figure 28 : Séparation et caractérisation des protéoglycane libérés dans le milieu de culture depar les cellules MCF-7. Après marquage par le [³⁵S] Sulfate, les PG radiomarqués sont séparés par chromatographie échangeuse d'anions. La taille des PG est analysée par chromatographie de tamisage moléculaire. La nature des chaînes de GAG est déterminée selon leur sensibilité aux enzymes telles que l'héparitinase et la chondroitinase ABC. Le témoin n'a fait l'objet d'acune digestion.

Les résultats, que nous venons de décrire, ont été résumés sur deux tableaux indiquant la charge, la taille, la nature (tableau 6) ainsi que la répartition couche cellulaire/milieu de culture des protéoglycannes synthétisés par les deux lignées étudiées (tableau 7). De même, la figure 29 présente l'incorporation globale de [³⁵S] Sulfate en [³⁵S] cpm x 10⁶ cellules dans les différentes lignées. Cette dernière représentation permet de mettre en évidence, d'une part que les cellules MDA-MB-231 synthétisent majoritairement des HSPG dans leur couche cellulaire, et d'autre part que le niveau d'incorporation [³⁵S] Sulfate dans les HSPG libérés dans le milieu de culture par les cellules MDA-MB-231 est du même ordre que celui obtenu pour les cellules MCF-7.

		MCF-7		MDA-MB-231	
		HSPG	CSPG	HSPG	CSPG
Charge (DEAE-Sephacel) Molarité d'éluion (NaCl)	cellules	0.62		0.4	0.55
	milieu	0.5	0.6	0.5	0.65
Taille (Sepharose CL-6B) K _{av}	cellules	0.3	0.42	0.1 0.7	0.35
	milieu	0.05	0.25	0.1	0.16

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différences de charge et de taille des PG purifiés des cellules épithéliales mammaires.

		MCF-7	MDA-MB-231
		³⁵ S cpm/10 ⁶ cellules	³⁵ S cpm/10 ⁶ cellules
<i>Couche cellulaire</i>	HSPG	4335 ± 1101 38 %	12664 ± 2256 56 %
	CSPG	7074 ± 1797 62 %	9951 ± 1179 44 %
<i>Milieu</i>	HSPG	9534 ± 534 68 %	7326 ± 972 34 %
	CSPG	4486 ± 279 32 %	14222 ± 1886 66 %
<i>Total</i>	HSPG	13389 ± 1635 54 %	19990 ± 3228 45 %
	CSPG	11560 ± 2076 46 %	24173 ± 3065 55 %

Tableau 7 : Répartition dans les différents compartiments cellulaires des HSPG et des CSPG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires. Les HSPG sont majoritaires dans la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231.

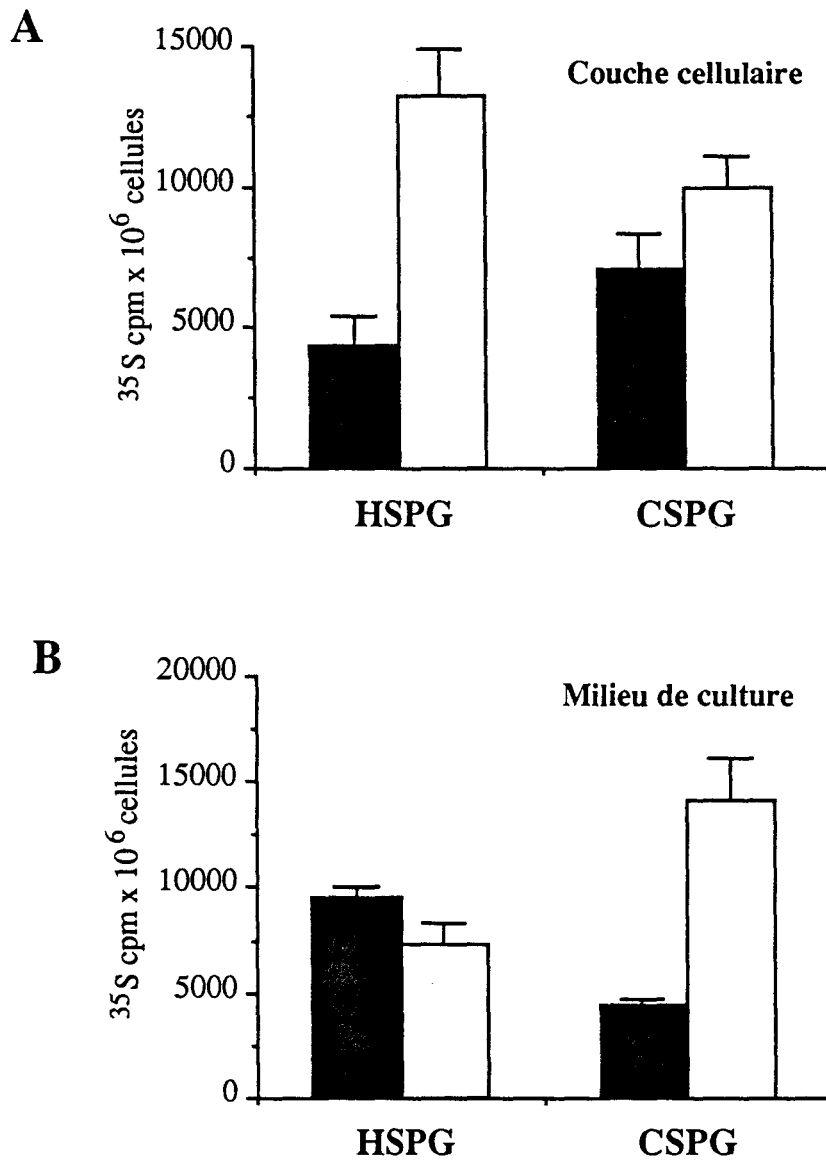


Figure 29 : Incorporation de [³⁵S] Sulfate dans les différents types de PG des cellules épithéliales mammaires. Les PG sont purifiés de la couche cellulaire (A) et du milieu de culture (B) des cellules MCF-7 (■) et MDA-MB-231 (□), comme indiqué dans la section matériels et méthodes. Les résultats sont présentés en ³⁵S cpm x 10⁶ cellules.

III- 3 - Dosage colorimétrique des PG sulfatés par le bleu Alcian.

Les PG et les GAG fortement négatifs peuvent interagir avec des colorants cationiques spécifiques comme le bleu Alcian et former des complexes stables colorés (figure 30). Après quantification par densitométrie, ce dosage colorimétrique nous a permis d'estimer la quantité de PG présente dans les échantillons purifiés après DEAE-Sephacel (tableau 8).

	MCF-7	MDA-MB-231
Couche cellulaire	8 µg	12 µg
Milieu de culture	5 µg	15 µg
Total	13 µg	27 µg

Tableau 8 : Quantité relative de PG sulfatés estimée après coloration par le bleu Alcian et densitométrie. Les résultats sont exprimés en µg par 50×10^4 cellules.

Conformément à ce que nous avons obtenu après incorporation de [^{35}S] Sulfate, les cellules MDA-MB-231 produisent globalement plus de protéoglycannes sulfatés ($25 \mu\text{g}/50 \times 10^4$ cellules) que les cellules MCF-7 ($13 \mu\text{g} / 50 \times 10^4$ cellules). On notera que cette méthode reste néanmoins très approximative car elle ne permet pas de déterminer la nature des protéoglycannes sulfatés synthétisés.

Ce test nous permettra cependant de contrôler, d'une part la quantité de PG immobilisés sur les membranes cationiques (Zetaprobe) lors des expériences d'interaction du FGF-2 sur les protéoglycannes, et d'autre part, la quantité de matériel ajouté dans le milieu de culture, lors des tests d'activité des différentes fractions.

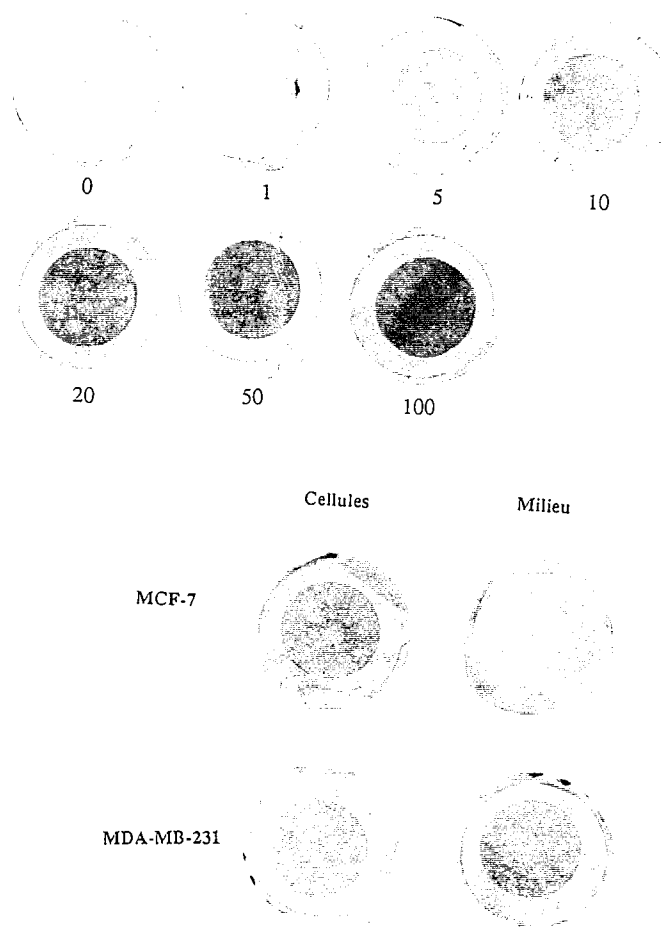


Figure 30 : Dosage colorimétrique des PG des cellules épithéliales mammaires par le bleu alcian. Les PG et les GAG fortement négatifs peuvent interagir avec des colorants cationiques spécifiques comme le bleu alcian et former des complexes stables colorés. Une gamme-étalon est réalisée parallèlement à l'aide de concentrations croissantes (0 à 100 μg) de chondroïtine sulfates (cartilage de requin, Sigma). Les quantités de PG sulfatés sont ensuite déterminées par analyse densitométrique, réalisée après digitalisation de l'image (scanner) grâce au logiciel Diversity One (LKB, Pharmacia) installé sur station Sun (Sparc Classic).

IV - DISCUSSION

IV-1 - Méthodes d'études des protéoglycannes.

Dans notre travail, après marquage métabolique par le [³⁵S] Sulfate, les protéoglycannes des cellules épithéliales mammaires ont été extraits, purifiés par chromatographie échangeuse d'ions et partiellement caractérisés après digestion enzymatique.

Le marquage métabolique par le [³⁵S] Sulfate permet d'étudier et de suivre les protéoglycannes au cours des différentes étapes de purification et de fractionnement nécessaires pour leur caractérisation. Le [³⁵S] Sulfate est le précurseur radiomarqué le plus fréquemment utilisé car il marque spécifiquement les protéoglycannes sulfatés (Yanagishita et al. 1987). La [³H] Glucosamine et la [¹⁴C] Glucosamine peuvent être aussi utilisées lorsque l'on veut suivre l'incorporation des sucres dans les chaînes de GAG au cours de leur synthèse. Cependant, ces précurseurs peuvent être également incorporés dans les composés non sulfatés comme l'acide hyaluronique ou encore les glycoprotéines. En fait, l'utilisation de sulfate radiomarqué permet d'étudier plus spécifiquement la synthèse des protéoglycannes sulfatés.

Dans notre étude, l'incorporation de précurseurs radioactifs (le [³⁵S] Sulfate) a été effectuée dans un milieu MEM normal contenant des concentrations physiologiques de sulfate (200 mg/l ; 800 µM). Outre le fait qu'il nous semblait important de rester dans les conditions du test biologique d'action du FGF-2 (établies au cours du chapitre précédent), l'utilisation d'un milieu de culture dépourvu de sulfate peut perturber la biosynthèse des protéoglycannes et donner naissance à des chaînes de GAG anormales car sous-sulfatées (Van der Kraan et al. 1988 ; Humphries et Silbert, 1988 ; Imai et al. 1994). Il faut également noter que les protéoglycannes des cellules épithéliales mammaires ont toujours été extraits à partir de cellules en phase exponentielle de croissance. Des modifications structurales des GAG des protéoglycannes ont déjà été reportées en fonction de l'état prolifératif des cellules en culture (Fedarko et Conrad, 1986 ; Kinsella et Wight, 1986 ; Schmidt et al. 1990, 1995). Ces modifications concernent particulièrement une situation d'arrêt de la

prolifération des cellules, notamment lorsqu'elles atteignent la confluence. Schmidt et al. (1995) ont mis en évidence que les cellules musculaires lisses de l'aorte, lorsqu'elles sont à confluence, pouvaient réguler rapidement et très finement la structure des chaînes d'HS synthétisées, et modifier ainsi les capacités de prolifération des cellules et/ou de sensibilité à certains facteurs de croissance. Dans le cas de cultures primaires de cellules épithéliales mammaires normales (i. e. issues de mammoplasties réductionnelles), Emerman et ses collaborateurs (1988) ont également décrit des variations importantes de la quantité mais aussi de la nature des GAG synthétisés, en fonction de la densité de culture et de la prolifération cellulaire. A l'inverse, aucune variation significative de la synthèse des GAG n'est observé par ces auteurs, dans le cas des cellules issues de tissus cancéreux, quelque soit les conditions de culture. De notre côté, nous avons précédemment montré, à l'aide des anticorps anti-marqueurs de cycle, que les cellules cancéreuses mammaires étudiées (MDA-MB-231, MCF-7) n'entrent pas toutes en phase de quiescence en cas de privation de sérum. Une étude parallèle d'échantillons cultivés en absence de sérum nous a d'ailleurs montré que les profils chromatographiques étaient identiques à ceux décrits en présence de 10 % de SVF. La charge et la proportion des espèces (HSPG et CSPG) sont également conservées dans la couche cellulaire comme dans le milieu de culture des cellules étudiées. Seule une diminution de moitié de la quantité globale de PG est observée et peut être impliquée au ralentissement du métabolisme et de la prolifération des cellules, dans des conditions de privation de sérum (résultats non montrés).

Les méthodes colorimétriques faisant appel à des colorants cationiques représentent une voie différente d'étude des protéoglycannes (ou des glycosaminoglycannes), en évitant l'utilisation de précurseurs radioactifs. Nous avons envisagé ces méthodes afin de déterminer de manière rapide, la quantité approximative de protéoglycannes sulfatés dans un échantillon donné. Le principe de ces méthodes est simple : des molécules d'un colorant spécifique, chargées positivement, vont interagir avec les sites anioniques des chaînes de GAG pour former des complexes, dont la densité de coloration proportionnelle à la quantité de matériel, sera appréciée par des méthodes densitométriques.

Ces colorants spécifiques sont nombreux. Ce peut être le bleu de diméthylène, le rouge de ruthénium, la safranine-O, le bleu cuprolinique, ou enfin le bleu Alcian. Certains composés de charge négative (protéines ou ADN) peuvent également interférer avec ces colorants. C'est pourquoi les conditions de pH et de force ionique des tampons doivent être choisies avec soin afin de permettre la détection spécifique des PG (ou des GAG). Buée et ses collaborateurs (1991) ont développé une méthode optimale de détection par le bleu Alcian des protéoglycannes sur des membranes cationiques (comme le Zetaprobe). Ainsi une concentration en chlorure de magnésium à 0.05 M permet de mettre en évidence à la fois les composés de type CS et les composés de type HS (alors que par exemple, une concentration plus forte de 0.3 M ne permet que la mise en évidence des composés de type CS). De même, un contrôle strict de la force ionique (0.05 M NaCl), du pH (5.7) et de la quantité de colorant (0.2 %) permet d'éviter le bruit de fond et une coloration non spécifique des composés synthétisés.

Ces méthodes colorimétriques, outre leur faible précision, ne nous renseignent ni sur la nature des chaînes glycaniques sulfatées impliquées dans le complexe GAG/colorant, ni sur le rapport des différentes catégories de PG (HSPG ou CSPG) au sein d'une population donnée. Dans notre étude, elles nous ont cependant permis de déterminer la quantité de matériel sulfaté dans les échantillons issus de DEAE-Sephacel, qui seront notamment utilisées dans les tests de prolifération des cellules (chapitre 4).

Il faut noter que ce type de dosages, beaucoup moins lourd et contraignant que des fractionnements chromatographiques successifs de macromolécules radiomarquées, peut être envisagé pour une détection en routine d'un grand nombre d'échantillons. D'ailleurs les premiers kits de détection ont été récemment commercialisés (Test Blyscan, REALEF, France), pour la détection de glycosaminoglycannes en pathologie, notamment rénale et foetale (détection des GAG dans les urines ou dans les liquides amniotiques).

IV-2 - Protéoglycannes et cancer du sein.

D'un point de vue quantitatif, nous avons montré que les cellules MCF-7 produisent significativement moins de protéoglycannes que les cellules MDA-MB-231. Ces résultats sont en accord avec les études déjà publiées sur les GAG (Chandrasekaran et Davidson, 1979) ou les PG totaux (Revillion et al. 1993), synthétisés par ces deux types cellulaires. Dans la littérature, il faut noter que les auteurs se sont essentiellement intéressés à la composition des chaînes de GAG présentes dans les tumeurs mammaires.

Tout d'abord, l'acide hyaluronique (AH) semble jouer un rôle important au sein de la matrice extracellulaire des cellules mammaires, étant donné les modulations de synthèse présentées en fonction de l'état de prolifération des cellules ; une synthèse importante d'AH a ainsi été décrite comme caractéristique des cellules tumorales mammaires (Takeuchi et al. 1976 ; Angello et al. 1982 ; Emerman et al. 1988). En culture primaire, les cellules non cancéreuses, issues de mammoplasties réductionnelles, en phase exponentielle de croissance, synthétisent également beaucoup d'acide hyaluronique dans leur milieu de culture comme dans leur couche cellulaire (Emerman et al. 1988). Dans notre travail, l'utilisation du [³⁵S] Sulfate ne permet pas l'étude de l'AH (non sulfaté), mais celle plus spécifique des composés sulfatés comme les CS ou les HS.

L'analyse de la répartition des différentes catégories de GAG dans les tumeurs mammaires a montré que les quantités de composés de type CSPG sont fortement augmentées dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus sains (Takeuchi et al. 1976 ; Emerman et al. 1988 ; Olsen et al. 1988 ; Alini et Losa, 1991 ; Losa et Alini, 1993). Par dosage des acides uroniques, Losa et Alini (1993) ont par ailleurs montré que cette augmentation des CS est corrélée à une diminution des composés de type dermatane sulfaté (DS).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une prédominance des composés de type CSPG dans la couche cellulaire des cellules MCF-7 mais surtout dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231.

Les CSPG sont souvent considérés comme des molécules qui favoriseraient la migration cellulaire (revue dans Wight et al. 1992 ; Iozzo, 1988). Par exemple, les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins lorsqu'elles sont quiescentes, sont très riches en composés de type HSPG (80 % des PG totaux). Par contre, lorsque ces cellules sont induites à migrer (après microblessures), elles sont capables de modifier leur matrice extracellulaire de manière à l'enrichir en PG de type CS/DS (60 % des PG totaux) (Kinsella et Wight, 1986). De même, lorsque la synthèse des CSPG est inhibée, les cellules de mélanomes perdent leur capacité de migration et d'invasion des gels de collagène de type I (Faassen et al. 1993). On notera également que, chez la souris, les cellules épithéliales mammaires transformées présentent préférentiellement des CSPG dans leur matrice, au contraire des cellules normales (NMuMg) dont elles sont issues et qui possèdent surtout des composés de type HSPG (Pejler et David, 1987). Une augmentation de la quantité de CSPG synthétisés pourraient favoriser la migration cellulaire et l'invasion métastatique des cellules, en diminuant les capacités d'interactions des cellules avec les autres molécules de la matrice extracellulaire (David et Bernfield, 1982 ; Pejler et David, 1987 ; Wight et al. 1992).

A l'opposé, les HS sont présentés dans la littérature, comme des composants quantitativement mineurs des cellules tumorales mammaires (Takeuchi et al. 1976, Emerman et al. 1988 ; Olsen et al. 1988 ; Alini et Losa, 1991 ; Losa et Alini, 1993). Alini et Losa (1991) ont ainsi mis en évidence que la quantité totale d'HS diminue *in vivo* dans les tissus néoplasiques par rapport aux tissus pré-néoplasiques. Dans notre étude, nous avons démontré que ce sont les cellules MDA-MB-231 qui synthétisent majoritairement des HSPG au sein de leur couche cellulaire. Nous avons purifié selon sa faible densité de charge, un HSPG de grande taille. Ces macromolécules de haut PM représentent 40 % des molécules synthétisées dans la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231. Une accumulation des HS de grande taille dans la couche cellulaire a déjà été observée dans le cas de cellules des mélanomes hautement invasifs (Caux et al. 1992 ; Moczar et al. 1993) ainsi que dans les cellules métastatiques du poumon (Timar et al. 1987) et semble être associée au phénotype métastatique (Mangakinis et al. 1990 ; Lapis et al. 1991).

Il faut également noter que la présence d'HSPG semble également indispensable à la tumorigenèse *in vivo*. Esko et ses collaborateurs (1988) ont ainsi montré que les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), déficientes dans leur synthèse d'HSPG, sont incapables de former des tumeurs dans les souris *nude* au contraire des cellules CHO sauvages.

Comme nous l'avons démontré, les HSPG synthétisés par les cellules MDA-MB-231 sont outre leur grande taille, caractérisés par une faible densité de charge. La sous-sulfatation des PG est généralement décrite comme une caractéristique spécifique des cellules transformées et tumorales (Fransson et Sjöberg, 1981 ; David et Van den Berghe, 1983 ; Robinson et al. 1984 ; Pejler et David, 1987 ; Piedagniel et al. 1994). Une anomalie de la structure des HS des cellules tumorales pourrait intervenir dans les capacités d'interactions avec les autres molécules de la matrice extracellulaire. Robinson et al. (1984) ont ainsi mis en évidence l'existence d'une population d'HSPG sous-sulfatés dans des cellules en culture isolées d'un hépatome de rat, dont la liaison à la fibronectine est fortement réduite, suite à la modification de la N-sulfatation de leurs résidus de glucosamine. De même, des HSPG sous-sulfatés (par traitement par le chlorate de sodium) perdent leur capacités de liaison à la fibronectine (Keller et al. 1989) et à la laminine (Brauer et al. 1990).

Dans la glande mammaire de souris, David et Van den Berghe (1983) ont montré que les cellules transformées présentent également une charge plus réduite que les cellules normales correspondantes (cellules NMuMg). Ces HSPG sous-sulfatés perdent leur capacité d'interaction avec l'antithrombine (Pejler et David, 1987) et empêche la formation d'une matrice extracellulaire (notamment la lame basale) correctement organisée (David et Bernfield, 1982).

Conformément à ces résultats obtenus sur des cellules murines, nous avons observé que les PG des cellules mammaires humaines issues de mammoplasties réductionnelles, en culture primaire, présentent une charge plus élevée (0.65 M) que les cellules cancéreuses MDA-MB-231 (0.4-0.5). Cette étude reste cependant préliminaire et demande à être approfondie (résultats non montrés).

Des produits de faible poids moléculaire, présentant une sensibilité à l'héparitinase, ont également été mis en évidence dans la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231. Ces molécules représentent environ 30 % des PG totaux radiomarqués de cette lignée. Il faut noter qu'elles sont beaucoup plus nombreuses dans les cellules métastatiques MDA-MB-231 que dans les cellules MCF-7. Dans la littérature, ces produits ont déjà été décrits pour d'autres types cellulaires comme les cellules glomérulaires de rein (Kasinath et al. 1994), les kératinocytes (Piepkorn et al. 1990), les fibroblastes 3T3 (Hovingh et al. 1993), les cellules de mélanomes (Caux et al. 1992) ou encore les macrophages (Yeoman et Rapraeger, 1993). Ce sont des chaînes libres polysaccharidiques de type héparane sulfates, faiblement sulfatées et de petit poids moléculaire (K_{av} 0.7 à 0.75, c'est-à-dire d'environ 10 kDa). Il semble qu'elles soient ici pour la première fois décrites dans le cas des cellules tumorales mammaires. Ces molécules de petite taille pourraient résulter de la dégradation enzymatique des PG de la couche cellulaire (Hovingh et al. 1993 ; Schmidtchen et Fransson, 1994). En effet, les cellules cancéreuses peuvent sécréter des protéases mais aussi des glycosidases telles que les héparanases, impliquées dans le processus invasif (Nakajima et al. 1988 ; Vlodavsky et al. 1990). De même, des HS de faible PM, produits de la dégradation enzymatique d'une endoglycosidase membranaire, sont également détectés dans les cellules de cancer du colon (Iozzo, 1987 ; Gallagher et al. 1988). Ces GAG solubles, doivent être beaucoup plus libres et mobiles que leurs homologues liés à une protéine membranaire de haut poids moléculaire, et sont retrouvés jusque dans le noyau des cellules hépatiques (Fedarko et Conrad, 1986). A l'heure actuelle, le rôle de ces molécules reste à déterminer.

IV-3 - Diversité de taille et de charge des PG des cellules épithéliales mammaires.

D'une manière générale, les PG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires sont retenus sur Sepharose CL-6B, et sont donc de taille inférieure à 200 kDa. Un PG tel que le perlecan (400 kDa) aurait forcément été exclu (Aviezer et al. 1994a). On peut donc considérer *a priori* que les PG purifiés ne sont pas de cette nature. L'examen de la taille des protéoglycannes révèle également que les PG de la couche cellulaire sont beaucoup plus petits que ceux libérés dans le milieu de culture. Ainsi, les cellules MCF-7 synthétisent une

population homogène de PG de petite taille dans leur couche cellulaire alors que les cellules MDA-MB-231 présentent spécifiquement une population d'HSPG beaucoup plus grands, caractérisés par leur faible densité de charge. En raison de leur grande taille (masse moléculaire proche de 200 kDa), ces PG pourraient éventuellement correspondre au syndecan (Kiefer et al. 1990). Nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur la nature de l'axe protéique des PG synthétisés par les cellules cancéreuses mammaires. Seule l'utilisation d'anticorps spécifiques nous permettrait de déterminer précisément la nature de la partie protéique des PG. Par contre, notre étude nous montre clairement que les cellules MCF 7 synthétisent deux fois moins de PG que les cellules MDA-MB-231.

Nous avons mis en évidence que les cellules MCF-7, sur lesquelles les sites de fixation de faible affinité pour le FGF-2, n'avaient pu être détectés par radiorécepteurs au niveau des membranes cellulaires (Peyrat et al. 1991, 1992), produisent néanmoins des protéoglycannes de type héparane sulfate, et notamment une population particulièrement importante d'HSPG libérés dans le milieu de culture. Par contre, les cellules MDA-MB-231 se caractérisent par une accumulation d'HSPG au sein de leur couche cellulaire, qui correspondent vraisemblablement à la grande quantité de sites de liaison de basse affinité pour le FGF-2 détectés par Peyrat et al. (1991). Ces HSPG pourraient rendre compte de l'insensibilité de ces cellules au FGF-2. En accord avec cette hypothèse, une étude récente démontre qu'une surexpression de syndecan, capable de lier le FGF-2, peut totalement inhiber l'action mitogène de ce facteur de croissance sur les cellules NIH 3T3 (Mali et al. 1993). Par ailleurs, on notera que les cellules MDA-MB-231 comme les cellules MCF-7, libèrent des HSPG dans leur milieu de culture, également de grande taille mais qui sont plus chargés que ceux de la couche cellulaire. La capacité de fixation du FGF-2 aux PG libérés dans le milieu de culture de ces cellules n'a jusqu'à présent, jamais été décrite. Les caractéristiques biochimiques (charge et taille) que nous avons étudiées, ne nous permettent pas de répondre quant à la capacité des PG à fixer le FGF-2, ou à permettre l'activité mitogène de ce facteur de croissance.

Aussi, afin d'approfondir la relation entre la sensibilité des cellules de cancer du sein au FGF-2 et les HSPG synthétisés, nous avons mis en oeuvre des méthodologies permettant de modifier la structure des PG de ces cellules et conséquemment leur interaction avec ce facteur de croissance. Ces résultats seront présentés au cours du chapitre 4.

CHAPITRE 4

**MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DES
PROTEOGLYCANNES DANS LE CONTRÔLE DE L'ACTIVITE
MITOGENE DU FGF-2.**

CHAPITRE 4

MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DES PROTEOGLYCANNES DANS LE CONTROLE DE L'ACTIVITE MITOGENE DU FGF-2.

I - INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié la nature et la répartition des PG synthétisés par les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Nous avons montré que les cellules MDA-MB-231, insensibles au FGF-2, produisent plus d'HSPG que les cellules MCF-7, notamment au sein de leur couche cellulaire. Dans la suite de notre travail, nous nous sommes attachés d'une part à caractériser les capacités d'interaction des protéoglycannes de ces deux types cellulaires avec le FGF-2, et d'autre part à étudier l'effet de ces mêmes PG sur l'activité mitogène du FGF-2.

La capacité des PG à fixer le FGF-2 a été étudiée à l'aide de ¹²⁵I FGF-2, sur les cellules en culture ainsi que sur les PG purifiés. La spécificité de l'interaction du FGF-2 avec les PG a été étudiée après modification structurale de ces macromolécules. Trois approches différentes ont été entreprises. (1) Tout d'abord, les chaînes de GAG ont été éliminées des cellules en culture, à l'aide d'enzymes spécifiques. (2) La sulfatation des chaînes de glycosaminoglycannes a été inhibée à l'aide du chlorate de sodium. Comme indiqué figure 31-1, le chlorate de sodium (NaClO₃) est un inhibiteur compétitif d'une enzyme, l'ATP-sulfurylase, impliquée dans la formation de 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), la forme active du sulfate (Farley et al. 1978 ; Bauerle et Huttner, 1986 ; Lyle et al. 1994). Consécutivement, il empêche la sulfatation des chaînes de GAG (Humphries et Silbert, 1988 ; Greve et al. 1988 ; Keller et al. 1989). (3) La liaison des chaînes de GAG sur leur axe protéique a été bloquée à l'aide d'un accepteur de sucres, le β-D-xyloside (figure 31-2).

Cytoplasme

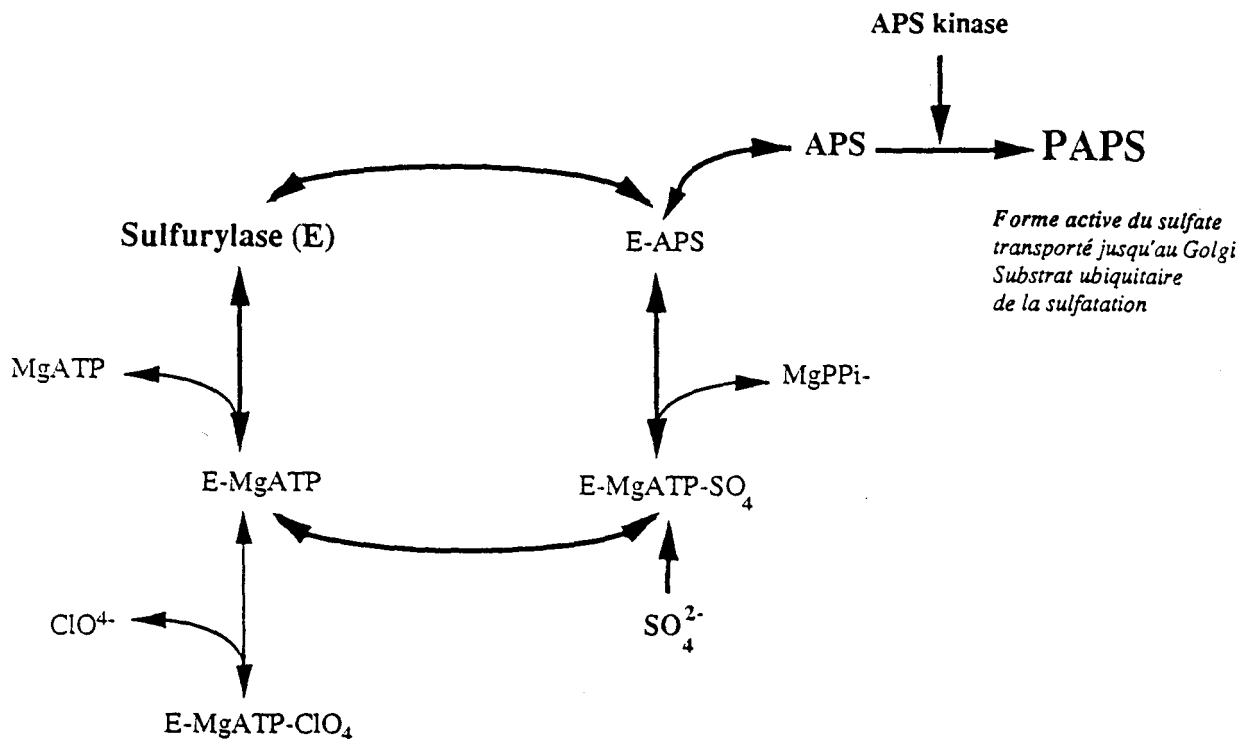


Figure 31-1 : Représentation schématique de l'activation du sulfate et mode d'action de l'ion chlorate.

L'activation du sulfate nécessite l'intervention successive de deux enzymes cytoplasmiques : tout d'abord l'ATP-sulfurylase (ATP-sulfate-adenylyltransferase), puis de l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS) kinase (ATP-adenylylsulfate 3'-phosphotransferase). Le produit formé est l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) qui est transporté jusqu'au Golgi. Le PAPS est le co-substrat ubiquitaire des sulfotransférases, qui permettent le transfert de sulfate au niveau des carbohydrates (chaînes de GAG des protéoglycannes) mais également au niveau des chaînes protéiques (résidus tyrosine).

Dans le cytoplasme des cellules, l'ion chlorate (ClO_4^-) entre en compétition directe avec l'ion sulfate (SO_4^{2-}) pour le complexe enzymatique (enzyme-ATP). Un excès d'ions chlorate empêche ainsi la formation de PAPS et consécutivement la sulfatation des macromolécules.

D'après Lyle et al. 1994.

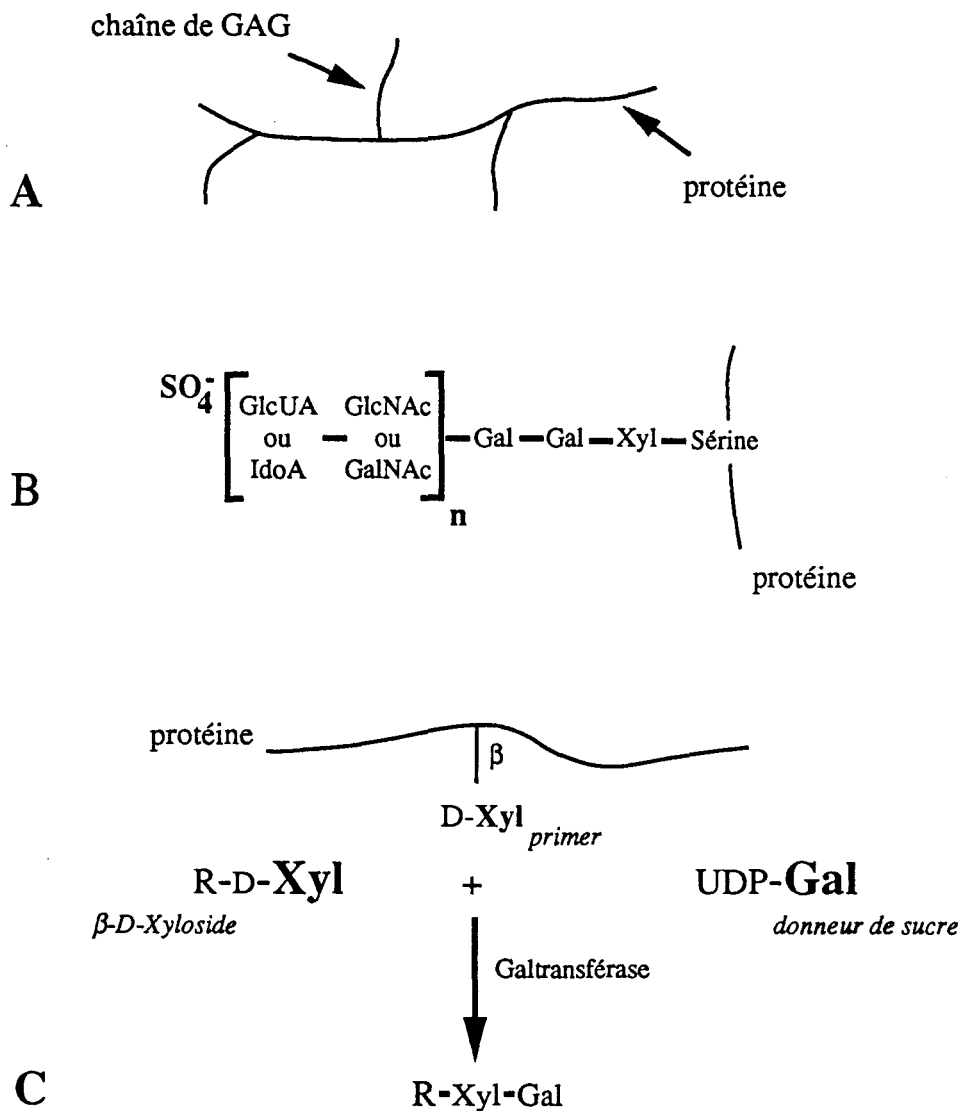


Figure 31-2 : Structure des PG et mécanisme d'action du β -D-Xyloside.
A : Structure générale des PG. Les protéoglycannes sont constitués d'un axe protéique et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG).
B : Région de liaison des chaînes GAG à la protéine. Cette liaison unique aux PG débute par la liaison d'un xylose au résidu sérine (ou thréonine) de l'axe protéique. L'addition successive de sucres donne ensuite naissance à la chaîne de GAG, qui sera plus ou moins sulfatée grâce à l'intervention spécifique des sulfotransférases.
C : Inhibition de l'addition du résidu galactose au xylose de l'axe protéique par compétition des β -D-xylosides exogènes en excès. Le xylose une fois lié à la protéine sert de *primer* (précurseur) sur lequel la synthèse de la chaîne de GAG peut commencer. Les dérivés β -D-xylosides exogènes, en excès, vont entrer en compétition directe avec les précurseurs protéiques pour l'addition du second sucre (i.e le galactose), catalysée par une enzyme spécifique la galactosyltransférase. Après addition du galactose, l'élongation de la chaîne peut avoir lieu sur les xylosides exogènes. Les chaînes de GAG libres synthétisées vont alors s'accumuler dans le milieu de culture des cellules. Les β -D-xylosides perturbent ainsi l'organisation structurale mais également la répartition des PG entre la couche cellulaire et le milieu de culture.
 (D'après Carey 1991).

La biosynthèse des GAG commence normalement par la xylosylation d'un résidu sérine (ou thréonine) de la protéine du futur protéoglycane, qu'on appelle précurseur (ou *primer*). Ajoutés au milieu de culture, les β -D-xylosides en excès entrent en compétition directe avec ces précurseurs et entraînent la formation de GAG libres, qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire (revue dans Carey, 1991).

Finalement, l'activité des PG purifiés du milieu de culture et de la couche cellulaire a été testée sur les cellules en culture, afin de déterminer leur implication dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2.

II - MATERIELS ET METHODES.

II-1 - Etude des interactions entre les PG et le FGF-2.

II-1-1 - Marquage du FGF-2 par l'iode 125.

Le FGF-2 est iodiné selon une méthode utilisant la chloramine T comme décrit dans Hondermarck et al. (1990b). Brièvement, 1 μ g de FGF-2 est dilué dans 50 μ l de tampon phosphate 0.1 M (pH 7.4) contenant 10 % de polyéthylène glycol 1000 (Sigma). La chloramine T (15 μ l d'une solution à 0.5 mg/ml), ajoutée simultanément à l'iode 125 (1 mCi, Amersham), permet la réaction d'oxydation conduisant à la iodination du FGF-2. Cette réaction est poursuivie à température ambiante pendant 90 secondes. Elle est arrêtée par addition d'un excès de N-acétyl tyrosine (100 μ l d'une solution à 100 mM). Le mélange réactionnel est alors déposé sur un gel d'héparine Sepharose CL-6B (Pharmacia) (100 mg) préalablement équilibré dans un tampon phosphate 0.6 M NaCl (pH 7). Par chromatographie d'affinité sur cette résine, le FGF-2 radiomarqué est séparé de l'iode libre. L'éluion du 125 I FGF-2 est réalisée par un tampon phosphate contenant 2 M NaCl. La radioactivité de chaque fraction est estimée par comptage γ (compteur LKB). L'activité mitogène du FGF-2 radiomarqué est contrôlée par mesure de la prolifération des cellules MCF-7. L'activité spécifique du 125 I FGF-2 utilisé dans nos tests, est en moyenne de

80 000 cpm/ng. La pureté de la préparation est vérifiée par autoradiographie, après électrophorèse SDS-PAGE.

II-1-2 - Liaison du ^{125}I FGF-2 sur les cellules en culture.

Les cellules sontensemencées à 6000 cellules/cm² dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon). Les cellules en phase exponentielle de croissance sont rincées deux fois par un milieu dépourvu de sérum, puis lavées rapidement par un tampon 2 M NaCl, 20 mM acétate de sodium (pH 4), afin de détacher le FGF froid lié aux membranes cellulaires. La liaison non spécifique est bloquée par une incubation des cellules pendant 15 mn, dans un tampon de saturation (milieu MEM contenant 1 mg/ml de SAB). Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 heures sous agitation et à température ambiante dans le tampon de saturation contenant 3 ng/ml de ^{125}I FGF-2. Enfin elles sont lavées par un tampon (pH 7.4) contenant 20 mM Hepes, 0.15 M NaCl (3 x 1 ml), puis lysées par 1 ml de soude (0.3 N). La radioactivité associée aux sites de fixation du FGF-2 est mesurée par comptage γ (compteur LKB). Afin de déterminer la fixation spécifique, un excès de 100 fois de FGF-2 froid est appliqué simultanément au ^{125}I FGF-2. Les résultats sont exprimés en fonction du nombre de cellules, estimé par comptage sur des échantillons cultivés en parallèle.

Pour mettre en évidence le rôle des chaînes de GAG dans la liaison du FGF-2, les cellules, après deux rinçages en PBS, sont incubées à 37°C pendant 90 mn en présence de 0.5 UI/ml d'héparinase (isolée de *Flavobacterium heparinum*, EC 4.2.2.7, Sigma) ou 0.5 UI/ml de chondroitinase ABC (isolée de *Proteus vulgaris*, EC 4.2.2.4, ICN) dans un milieu MEM dépourvu de sérum. Les expériences de liaison du FGF-2 iodé sont ensuite poursuivies comme précédemment décrit.

Pour étudier l'importance de la sulfatation dans la liaison du FGF-2, les cellules sont pré-traitées par 30 mM de chlorate de sodium 24 heures avant le test et pendant toute la durée de l'expérimentation. Les expériences de liaison du FGF-2 iodé sont ensuite poursuivies comme précédemment décrit.

Les sites de fixation de haute et de basse affinité du FGF-2 peuvent être étudiés sur les cellules en culture (Moscatelli, 1987). Pour cela, les cellules sont cultivées et incubées

avec le ^{125}I FGF-2 comme indiqué ci-dessus. Après trois rinçages dans un tampon de lavage (20 mM Hepes, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.2 % SAB), le FGF-2 radiomarqué est libéré de ses sites de fixation de basse affinité par lavage (2 x 500 μl) dans un tampon 2 M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7 et de ses sites de haute affinité par lavage (2 x 500 μl) par un tampon 2 M NaCl, 20 mM acétate de sodium, pH 4. La radioactivité associée aux différents sites de fixation du FGF-2 est mesurée par comptage γ (compteur LKB).

II-1-3 - Liaison des protéoglycannes aux membranes cationiques.

Le protocole suivi a été précédemment décrit par Rapraeger et Yeaman (1991). Les fractions issues de chromatographie échangeuse d'ions sont dialysées contre 10 mM Tris/HCl, pH 8, contenant des inhibiteurs de protéases (10 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 0.1 mM PMSF, 50 mM d'acide hexanoïque). Les filtres de Zetaprobe (30 mm de diamètre) sont préhydratés et équilibrés dans un tampon TBS (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl) sous agitation, pendant 30 mn à 20°C. Ces filtres sont déposés sur un appareil de filtration (Dot-Blot, Millipore) et chaque puits est lavé sous vide, par 0.5 ml de TBS. Les échantillons, complétés en urée (8 M) et 0.1 % de Triton X-100, sont filtrés sous vide passif. Chaque puits est rincé 2 fois par 0.5 ml de TUT (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 8 M urée, 0.1 % Triton X-100). Les filtres sont ensuite retirés du système de filtration et lavés par 4 bains de 50 ml de TBS pendant 20 mn à 20 °C et sous agitation. Afin de déterminer le rendement et la qualité de la fixation, les filtres témoins sont lavés par 2 bains de 50 ml d'eau Milli-Q, deshydratés par passage dans l'alcool 95 %, et comptés après ajout de liquide scintillant (compteur β , LKB). Le rendement de fixation des PG est de 85-90 % pour chaque type cellulaire.

II-1-4 - Liaison du ^{125}I FGF-2 aux protéoglycannes fixés sur membranes cationiques.

Les filtres obtenus comme décrit dans le paragraphe ci-dessus, sont tout d'abord équilibrés, pendant 30 mn, dans 10 ml de tampon d'hybridation (20 mM Hepes, 0.15 M NaCl, pH 7.4, 1 % de SAB). Les échantillons sont ensuite incubés, pendant 2 heures, à 20°C, dans le tampon d'hybridation contenant 0.5 ng/ml de ^{125}I FGF-2. Toutes les incubations sont réalisées à température ambiante et sous agitation. Chaque filtre est ensuite

lavé indépendamment dans 6 bains (de 50 ml de tampon d'hybridation) de 30 mn chacun.

Après séchage à 37°C, les filtres sont placés en exposition pour autoradiographie pendant 24 heures. La liaison du ¹²⁵I FGF-2 sur les PG est déterminée par analyse densitométrique des autoradiogrammes (Logiciel Diversity One, LKB, Pharmacia).

II-2 - Etude de l'activité mitogène du FGF-2 après modification structurale des protéoglycannes.

II-2-1 - Dégradation enzymatique des chaînes de glycosaminoglycannes.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont rincées 2 fois, puis placées pendant 24 heures dans un milieu MEM dépourvu de SVF (figure 32). Six heures avant l'addition du FGF-2 (5 ng/ml), les cellules sont incubées en présence de 0.05 UI/ml d'héparinase (isolée de *Flavobacterium heparinum*, EC 4.2.2.7, Sigma), de 0.05 UI/ml de chondroitinase ABC (isolée de *Proteus vulgaris*, EC 4.2.2.4, ICN) ou de 0.1 UI/ml de hyaluronidase (isolée de *Streptomyces hyaluronicus*, EC 4.2.99.1, Calbiochem). Ces concentrations d'enzymes ont ensuite été ajoutées régulièrement toutes les 6 heures.

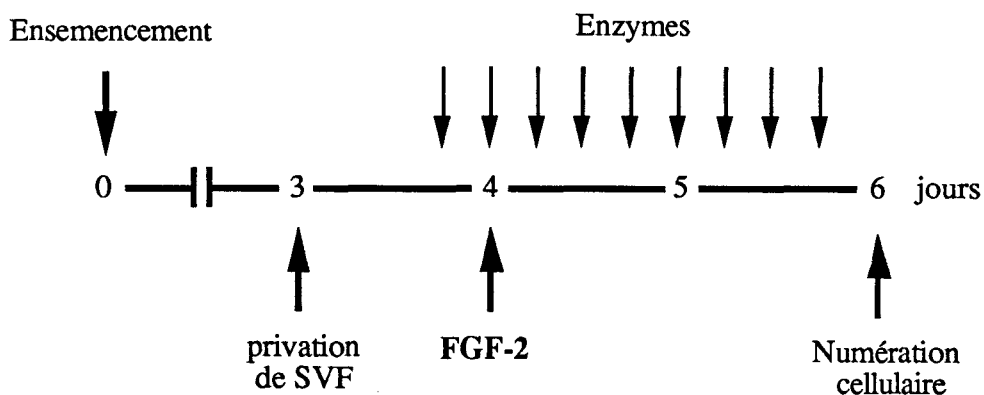


Figure 32 : Protocole du test d'activité biologique du FGF-2 après dégradation enzymatique des chaînes de GAG.

La dégradation effective des GAG est vérifiée après incorporation de [³⁵S] Sulfate. Les conditions d'extraction et de purification des protéoglycannes ont été décrites au cours du chapitre 3.

II-2-2 - Inhibition de la sulfatation des PG par le chlorate de sodium.

Comme indiqué figure 33, les cellules en phase exponentielle de croissance sont placées en présence de 30 mM de chlorate de sodium pendant 24 heures dans un milieu MEM contenant 10 % de SVF. Après 2 rinçages, les cellules sont placées dans un milieu MEM dépourvu de SVF, mais contenant 30 mM de chlorate de sodium, pour une nouvelle période de 24 heures. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 heures en présence de 5 ng/ml de FGF-2 et de 30 mM chlorate de sodium. Le nombre de cellules est estimé par comptage à la cellule de Malassez (hématocytomètre) après décollement des cellules par une solution de trypsine/EDTA.

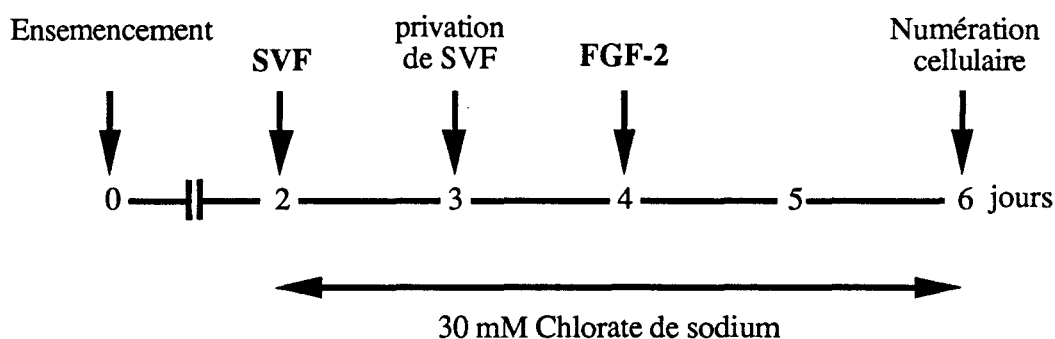


Figure 33 : Protocole du test biologique en présence de 30 mM de chlorate de sodium.

Dans les expériences de compensation de la désulfatation, le sulfate de sodium (15 mM, Merck), le SVF (10 %), l'héparine (10 µg/ml, Sigma), les chondroïtine sulfates (10 µg/ml, Sigma) ou l'acide hyaluronique (10 µg/ml, Sigma), sont ajoutés simultanément au FGF-2, dans le milieu de culture des cellules traitées par 30 mM de chlorate de sodium pour une période de 48 heures (figure 33).

L'inhibition effective de la sulfatation des GAG est déterminée après marquage métabolique par 25 µCi/ml de [³⁵S] Sulfate ou par 0.5 mCi de [¹⁴C] Glucosamine (54 mCi/mM). Les protéoglycannes sont purifiés et caractérisés comme décrit au cours du chapitre précédent.

II-2-3 - Effet du β -xyloside.

Les cellules épithéliales mammaires en phase exponentielle de croissance sont placées en présence de 0.5 mM de β -xyloside (p-nitrophényl β -D-xylo-pyranoside, Sigma) pendant 24 heures dans un milieu MEM contenant 10 % de SVF. Après deux rinçages, les cellules sont placées dans un milieu MEM dépourvu de SVF, mais contenant 0.5 mM de β -xyloside pour une nouvelle période de 24 heures. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 heures en présence de 5 ng/ml de FGF-2 et de 0.5 mM β -xyloside. Le nombre de cellules est estimé par comptage à la cellule de Malassez (hématocytomètre). L'augmentation effective (x 4) de la quantité de GAG sulfatés dans le milieu de culture a été observée par dosage colorimétrique par le bleu Alcian.

II-3 - Etude de l'effet des PG purifiés sur l'activité mitogène du FGF-2.

II-3-1 - Milieux conditionnés.

Cultivées dans des flacons de 75 cm², les cellules en phase exponentielle de croissance sont rincées deux fois, puis incubées dans 8 ml de milieu MEM dépourvu de sérum, pour une période de 24 heures. Le milieu est alors récupéré, centrifugé (1500 tours/mn) et conservé à - 20°C jusqu'à utilisation. Dilué avec du milieu frais dépourvu de SVF (V/V), il est utilisé comme milieu d'incubation dans lequel on ajoute le FGF-2 à 5 ng/ml.

II-3-2 - Protéoglycannes purifiés.

Les protéoglycannes de la couche cellulaire et du milieu de culture sont purifiés par chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Sephacel) comme décrit dans la section matériels et méthodes du chapitre 3. Après dialyse contre un tampon contenant 5 mM de Tris/HCl (pH 7.5), 0.05 M NaCl, des inhibiteurs de protéases (1 mM EDTA, 0.5 mM benzamidine, 5 mM d'acide hexanoïque), les fractions (50 μ l) sont ajoutées simultanément au FGF-2 dans le milieu de culture des cellules épithéliales mammaires. Un aliquot de 50 μ l correspond à environ 10 μ g de molécules sulfatées (mesurées par dosage colorimétrique au bleu Alcian).

III - RESULTATS.

III-1 - Interaction entre le ^{125}I FGF-2 et les PG des cellules épithéliales mammaires.

III-1-1 - Liaison du ^{125}I FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires.

III-1-1-1 - Implication des chaînes d'HS dans la fixation du ^{125}I FGF-2.

La capacité de fixation du FGF-2 aux cellules épithéliales mammaires a été étudiée à l'aide de FGF-2 radiomarqué par l'iode 125. Un traitement par l'héparinase (0.5 UI/ml) réduit la liaison du FGF-2 à ces sites de fixation de 82 % et 85 % respectivement pour les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 (figure 34). Par contre, un traitement par la chondroitinase ABC (0.5 UI/ml) ne modifie pas significativement les capacités de fixation du ^{125}I FGF-2.

Nous avons vérifié, après incorporation métabolique de [^{35}S] Sulfate, que la digestion enzymatique par l'héparinase entraîne la dégradation globale de 76 % et 78 % des HSPG synthétisés respectivement par les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 (tableau 9). La présence des chaînes de type HS est donc indispensable à la liaison du FGF-2 sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires.

III-1-1-2 - Implication de la sulfatation des PG dans la fixation du ^{125}I FGF-2.

La capacité de fixation du FGF-2 aux cellules épithéliales mammaires a été étudiée après traitement par le chlorate de sodium, qui est un inhibiteur compétitif de la sulfatation. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'inhibition effective de la sulfatation des PG synthétisés en présence de chlorate de sodium.

a - Inhibition par le chlorate de sodium de l'incorporation de [^{35}S] Sulfate.

Nos résultats montrent clairement qu'un traitement par 30 mM de chlorate de sodium induit une diminution de 73 % et de 70 % de l'incorporation globale de [^{35}S] Sulfate dans les PG, respectivement dans les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 (tableau 10). De plus, cette inhibition de l'incorporation de [^{35}S] Sulfate est dépendante de la dose de chlorate de sodium utilisée (figure 35).

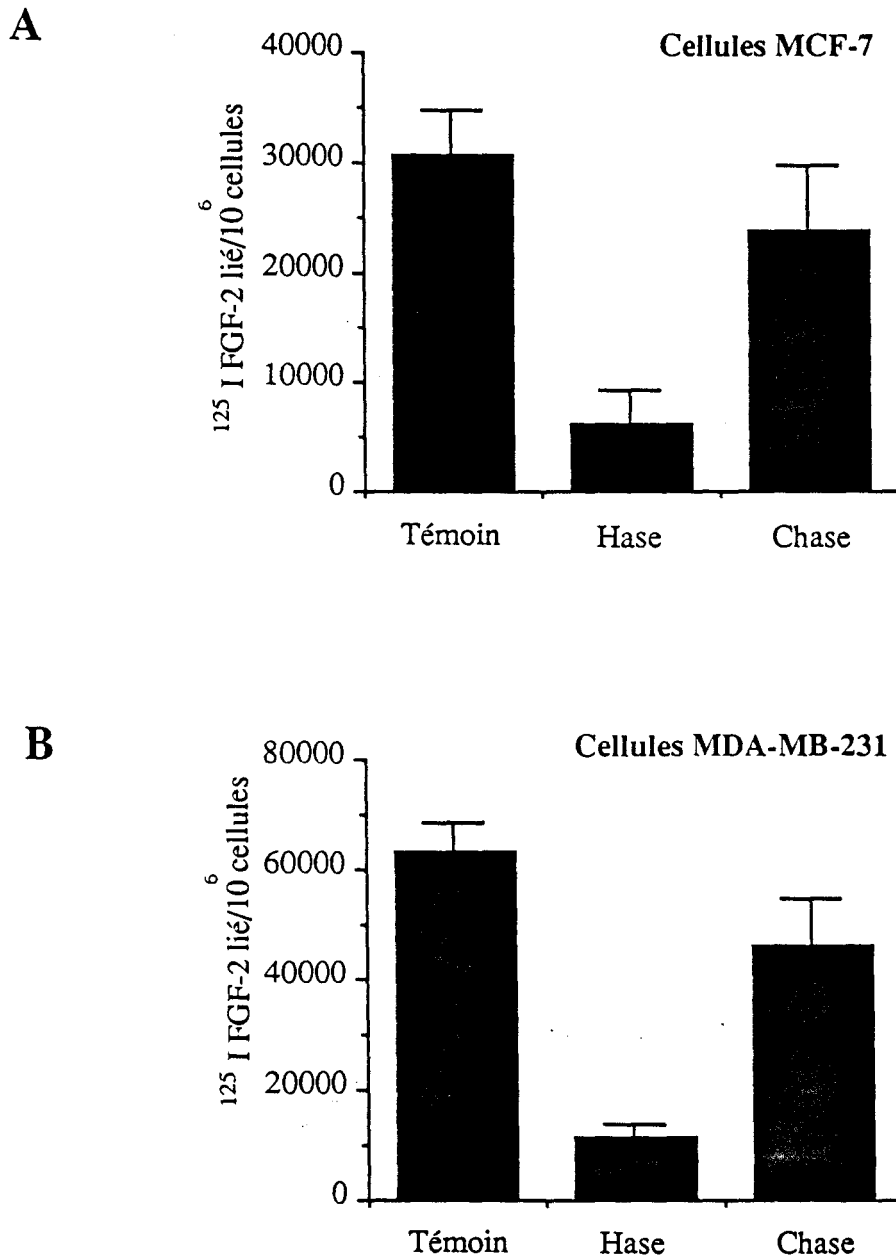


Figure 34 : Fixation du ¹²⁵I FGF-2 sur les cellules après digestion enzymatique des chaînes de glycosaminoglycannes. Les cellules MCF-7 (A) et les cellules MDA-MB-231 (B) sont prétraitées pendant 2 heures, à 37°C, par l'héparitinase (Hase) ou par la chondroitinase (Chase). Puis, elles sont incubées en présence de ¹²⁵I FGF-2 pendant 2 heures à 20 °C. A la fin de la période d'incubation, la liaison du ¹²⁵I FGF-2 est mesurée comme indiqué dans la section matériels et méthodes. La liaison non spécifique est évaluée en présence d'un excès de 100 fois de FGF-2 non radiomarqué. Les valeurs présentées résultent de la moyenne de trois expériences.

	MCF-7		MDA-MB-231	
	³⁵ S HSPG Totaux	³⁵ S HSPG Après Hase	³⁵ S HSPG Totaux	³⁵ S HSPG Après Hase
Couche cellulaire	5016 ± 1250	520 ± 210	14056 ± 2250	3589 ± 980
Milieu de culture	10353 ± 1950	3277 ± 825	7718 ± 3750	1020 ± 462
Total	15359 ± 3200	3797 ± 1035	21774 ± 6000	4609 ± 1442

Tableau 9 : Quantité d'HSPG après action de l'héparinase sur les cellules. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont cultivées en présence de 25 µCi/ml de [³⁵S] Sulfate pendant 24 heures. L'héparinase (Hase) est ajoutée à la concentration de 0.05 UI/ml, directement au milieu de culture 6 heures avant l'extraction des PG. La quantité d'HSPG ayant incorporé le [³⁵S] Sulfate, est déterminée après purification sur une colonne de chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Sephacel) comme décrit dans la rubrique matériels et méthodes du chapitre II. Les résultats sont exprimés en ³⁵S cpm/10⁶ cellules et correspondent à la moyenne statistique de trois extractions.

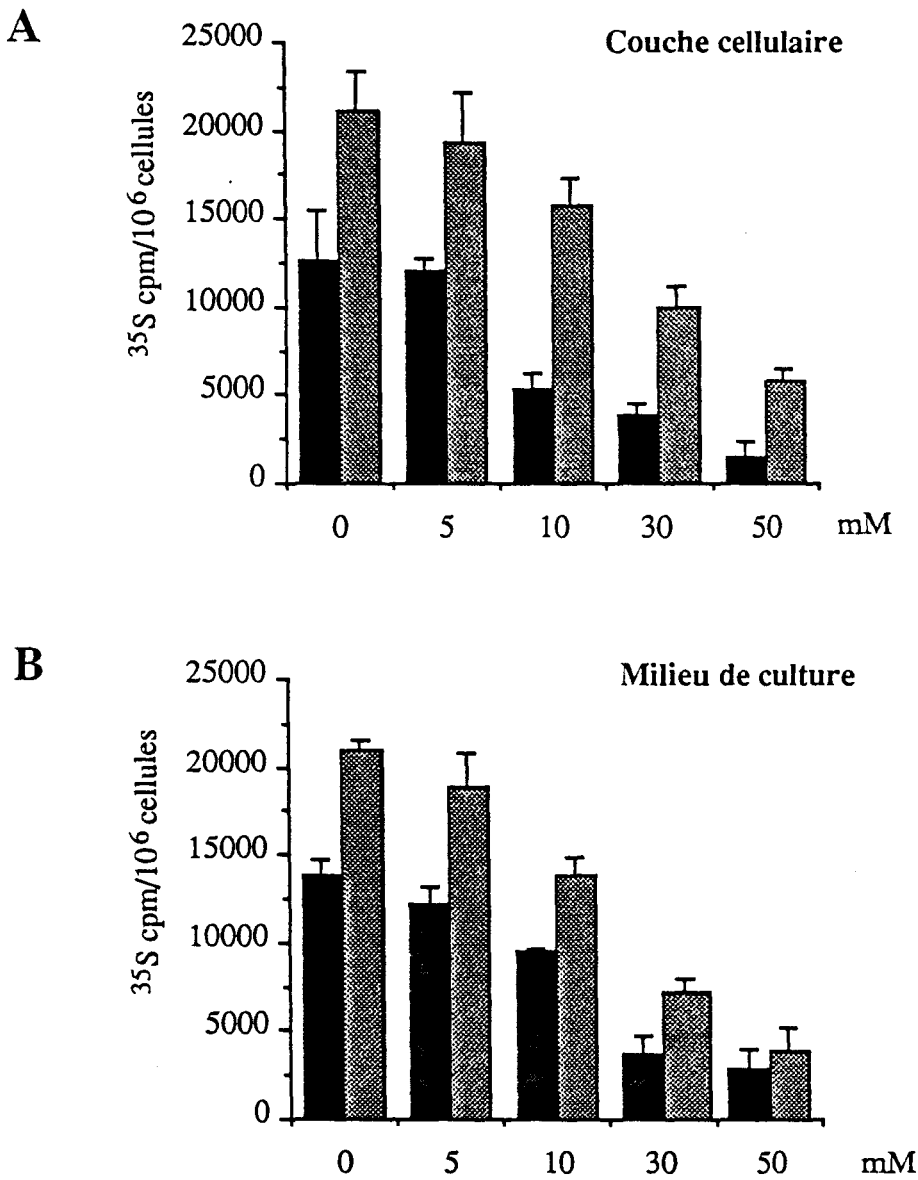


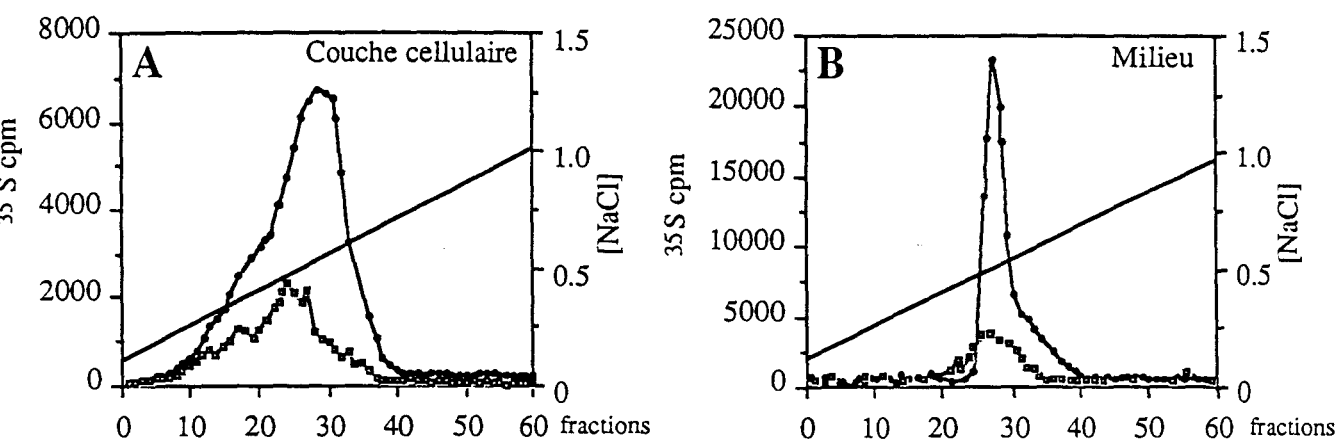
Figure 35 : Inhibition de l'incorporation de [³⁵S] Sulfate en fonction de la dose de chlorate de sodium. Les cellules MCF-7 (■) et les cellules MDA-MB-231 (▣), pré-traitées pendant 24 heures par le chlorate de sodium, sont placées en présence de 25 μCi/ml de [³⁵S] Sulfate et de chlorate de sodium, dans un milieu de culture contenant 10 % de SVF, pour une nouvelle période de 24 heures. Les protéoglycannes sont purifiés de la couche cellulaire (A) et du milieu de culture (B) par chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Sephacel) comme décrit dans la section matériels et méthodes.

Sur les profils d'élution de DEAE-Sephacel, une diminution nette de la densité de charge des PG est observée en présence de chlorate de sodium (figure 36 ; tableau 11). La zone d'élution des PG est ainsi déplacée vers les molarités les plus faibles (de 0.2 à 0.7 M NaCl). Plus précisément, dans la couche des cellules MCF-7 (figure 36 A), un pic de faible amplitude peut être observé sur le profil de DEAE-Sephacel et correspond à une population de PG moins sulfatés (tableau 11). Le pic majoritaire présente également une charge plus réduite en présence de chlorate de sodium. Dans le milieu de culture des cellules MCF-7, nos résultats montrent un pic résiduel également moins chargé (figure 36 B). Dans le cas des cellules MDA-MB-231, plusieurs pics peuvent être observés en présence de chlorate de sodium (figure 36 C). Le premier pic (0.3 M NaCl) correspond donc à des produits faiblement chargés. Les deux pics suivants montrent la même molarité d'élution que ceux observés dans les conditions du témoin. Dans leur milieu de culture, les cellules MDA-MB-231 libèrent deux populations de PG après traitement par 30 mM de chlorate de sodium (figure 36 D). Le premier pic présente une charge réduite par rapport au témoin alors que la densité de charge des produits du second pic ne semble pas globalement modifiée. Ces différents résultats ont été regroupés dans le tableau 11. Nous avons constaté après chromatographie de tamisage moléculaire que la taille des PG ainsi que la proportion globale des différents PG (HSPG et CSPG) ne sont pas modifiées après un traitement par 30 mM chlorate de sodium, pour les cellules MCF-7 comme pour les cellules MDA-MB-231 (résultats non montrés).

b - Le chlorate de sodium n'inhibe pas la synthèse des GAG.

Grâce à l'incorporation de [¹⁴C] Glucosamine, nous avons suivi la synthèse des chaînes polysaccharidiques de GAG dans les PG des cellules épithéliales mammaires. Nos résultats montrent que l'incorporation globale de [¹⁴C] Glucosamine n'est pas modifiée lorsque les cellules sont cultivées en présence de 30 mM de chlorate de sodium (tableau 12). Par contre, la densité de charge des PG est bien diminuée, comme nous l'avons observé après incorporation de [³⁵S] Sulfate. Le chlorate de sodium diminue donc spécifiquement la sulfatation des PG mais n'inhibe pas la synthèse et la polymérisation des chaînes polysaccharidiques.

Cellules MCF-7



Cellules MDA-MB-231

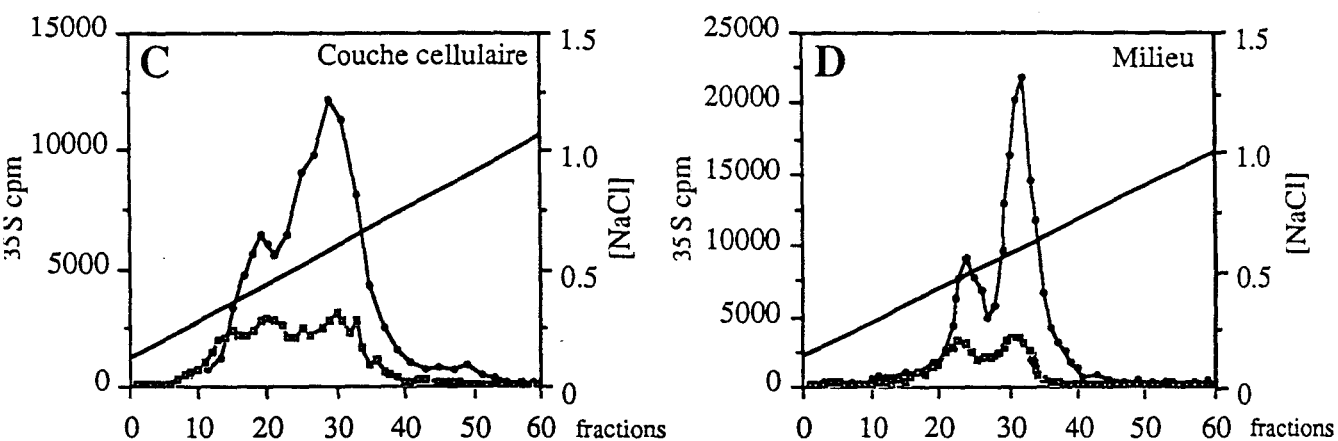


Figure 36 : Un traitement par le chlorate de sodium réduit la densité de charge des PG néosynthétisés par les cellules épithéliales mammaires. Les cellules MCF-7 (A, B) et les cellules MDA-MB-231 (C, D) ont été cultivées dans les conditions du témoin (●) ou en présence de 30 mM de chlorate de sodium (□). Les PG de la couche cellulaire (A, C) et du milieu de culture ont été déposés sur une colonne de DEAE-Sephacel et élués par un gradient de NaCl (matériels et méthodes).

	MCF-7		MDA-MB-231	
	Témoin en ³⁵ S cpm/10 ⁶ cellules	NaClO ₃	Témoin en ³⁵ S cpm/10 ⁶ cellules	NaClO ₃
Couche cellulaire	13201 ± 2410	4234 ± 644	25100 ± 3100	8100 ± 1572
Milieu de culture	15225 ± 1219	3366 ± 1820	22700 ± 1200	6133 ± 1805
Total	28426 ± 3629	7600 ± 2464	47800 ± 4300	14233 ± 3377

Tableau 10 : Effet du chlorate de sodium sur l'incorporation globale de [³⁵S] Sulfate dans les PG. Les cellules pré-traitées 24 heures par 30 mM de chlorate de sodium (NaClO₃), sont placées en présence de 25 µCi/ml de [³⁵S] Sulfate dans un milieu contenant 10 % de SVF et 30 mM de chlorate de sodium, pour une nouvelle période de 24 heures. Les PG sont purifiés de chromatographie échangeuse d'ions comme décrit dans la section matériels et méthodes du chapitre 3.

Charge (DEAE) Molarité d'éluion (NaCl)		MCF-7		MDA-MB-231		
Couche cellulaire	Témoin	0.4	0.62	0.4	0.55	
	Chlorate	0.3	0.4	0.55	0.3	0.4
Milieu de Culture	Témoin	0.5		0.5	0.65	
	Chlorate	0.4		0.45	0.65	

Tableau 11 : Comparaison de la densité de charge des protéoglycannes de la couche cellulaire et du milieu de culture dans les conditions du témoin ou en présence de 30 mM de chlorate de sodium.

	MCF-7 en cpm x 10 ⁶ cellules	MDA-MB-231 en cpm x 10 ⁶ cellules
Témoin	38402 ±2580	73646 ± 1980
Chlorate de sodium (30 mM)	39960 ± 2950	70943 ± 2900

Tableau 12 : Effet du chlorate de sodium sur l'incorporation globale de [¹⁴C] Glucosamine. Les cellules pré-traitées pendant 24 heures par 30 mM de chlorate de sodium, sont placées en présence de 0.5 mCi de [¹⁴C] Glucosamine dans un milieu contenant 10 % de SVF pendant 24 heures. Les PG sont purifiés de DEAE-Sepacel comme décrit dans la section matériels et méthodes du chapitre 3.

c - Inhibition par le chlorate de sodium de la liaison du ¹²⁵I FGF-2 aux cellules.

Un traitement par 30 mM de chlorate de sodium inhibe de 60 % la liaison du ¹²⁵I FGF-2 aux cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (figure 37). L'addition de sulfate de sodium dans le milieu de culture permet de rétablir la liaison du ¹²⁵I FGF-2. Nous avons également observé que cette inhibition de la fixation de ¹²⁵I FGF-2 est dépendante de la dose de chlorate de sodium utilisée (de 0 à 50 mM) et cela pour les deux types cellulaires étudiés (figure 38). La sulfatation des GAG est donc indispensable à la fixation du FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires.

Nous avons alors décidé d'analyser plus précisément la répartition des sites de liaison de haute et de basse affinité du FGF-2, comme décrit par Moscatelli (1987). Ainsi, pour le FGF-2, les sites de basse affinité sont définis comme ceux pour lesquels le FGF-2 est décroché par des lavages dans un tampon 2 M NaCl à pH neutre, tandis que les sites de haute affinité sont ceux pour lesquels le FGF-2 est libéré par des lavages à pH acide (tampon 2 M NaCl, pH 4). Nos résultats montrent que le chlorate de sodium inhibe la fixation du ¹²⁵I FGF-2 sur les sites de basse affinité de 78 % sur les cellules MDA-MB-231, et de 69 % sur les cellules MCF-7. La fixation du ¹²⁵I FGF-2 sur les sites de haute affinité est également diminuée de 60 % sur les cellules MDA-MB-231 comme pour les cellules MCF-7 (figure 39). La présence de PG sulfatés est donc nécessaire à la fixation du FGF-2 sur ces sites de liaison de haute affinité.

II-1-2 - Liaison du ¹²⁵I FGF-2 sur les PG immobilisés sur des membranes cationiques.

Les PG purifiés par chromatographie échangeuse d'ions ont été immobilisés sur des membranes cationiques et incubés en présence de ¹²⁵I FGF-2. Ces membranes sont placées en exposition photographique et les autoradiogrammes sont révélés après 24 heures (figure 40). Nos résultats montrent tout d'abord que les PG totaux synthétisés par les cellules MDA-MB-231 et MCF-7, sont capables de fixer le FGF-2 (figures 40 et 41).

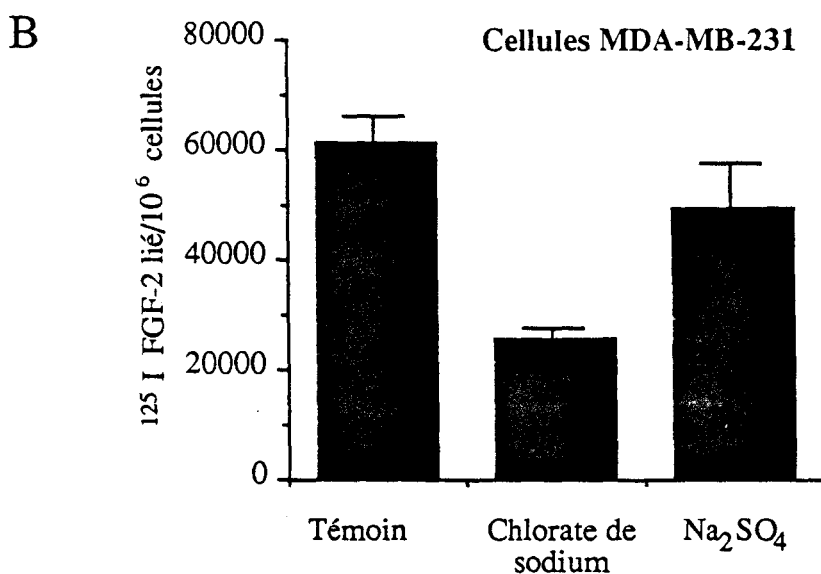
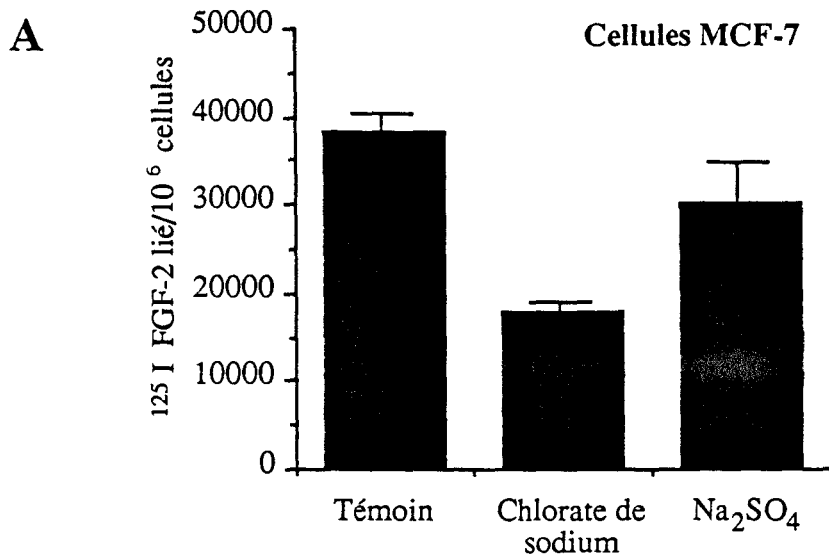


Figure 37 : Inhibition par le chlorate de sodium de la fixation du ¹²⁵I FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires. Les cellules MCF-7 (A) et les cellules MDA-MB-231 (B) sont prétraitées pendant 24 heures par le chlorate de sodium. Puis, elles sont incubées en présence de ¹²⁵I FGF-2 pendant 2 heures à 20°C. Afin de compenser la désulfatation, le Na₂SO₄ (15 mM) est ajouté directement au milieu de culture. A la fin de la période d'incubation, la liaison du ¹²⁵I FGF-2 est mesurée comme indiqué dans la section matériels et méthodes. La liaison non spécifique est évaluée en présence d'un excès de 100 fois de FGF-2 non radiomarqué. Les valeurs présentées résultent de la moyenne de trois expériences.

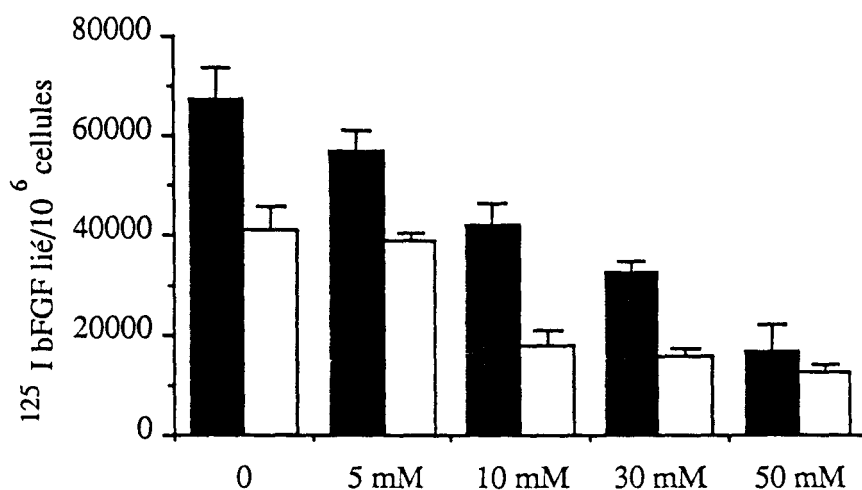


Figure 38 : Inhibition de la fixation du ^{125}I FGF-2 sur les cellules cancéreuses mammaires en fonction de la dose de chlorate de sodium. Les cellules MDA-MB-231 (■) et les cellules MCF-7 (□) sont prétraitées pendant 24 heures, à 37°C , par le chlorate de sodium. Elles sont ensuite incubées en présence de ^{125}I FGF-2 pendant 2 heures à 20°C . A la fin de la période d'incubation, la liaison du ^{125}I FGF-2 aux cellules est mesurée comme indiqué dans la section matériels et méthodes. La liaison non spécifique est évaluée en présence d'un excès de 100 fois de bFGF non radiomarqué. Les valeurs présentées résultent de la moyenne statistique de trois expériences indépendantes.

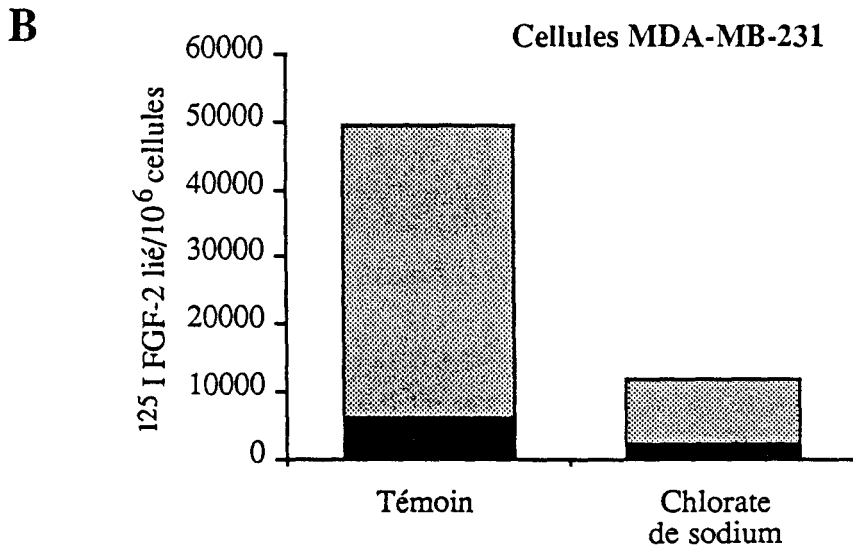
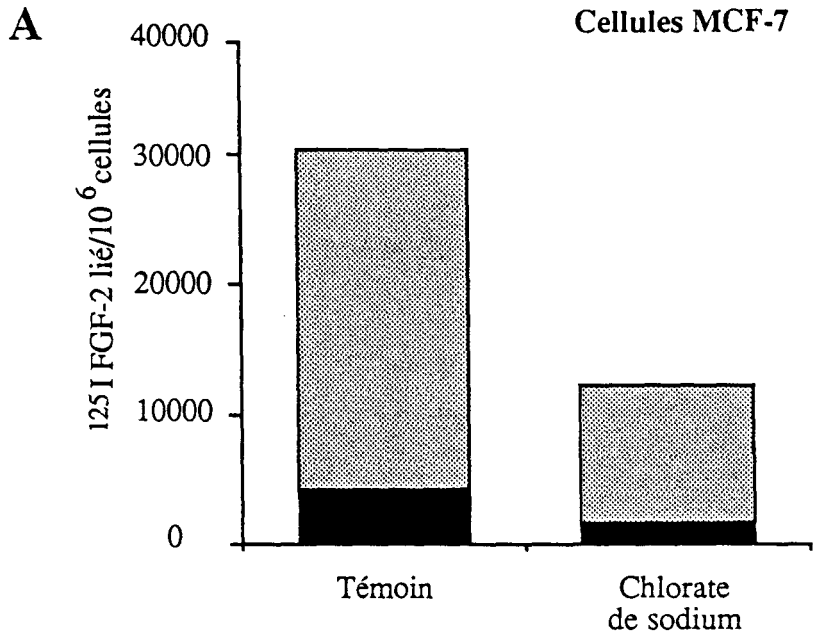


Figure 39 : Inhibition de la fixation du ^{125}I FGF-2 sur ses sites de basse affinité et de haute affinité. Les cellules MCF-7 (A) et les cellules MDA-MB-231 (B), sont incubées pendant 2 heures en présence de ^{125}I FGF-2. Les sites de basse affinité (■) sont définis comme ceux pour lesquels le FGF-2 est décroché par des lavages dans un tampon 2 M NaCl à pH neutre, tandis que les sites de haute affinité (■) sont ceux pour lesquels le FGF-2 est libéré par des lavages à pH acide (tampon 2 M NaCl, pH 4). La radioactivité associée aux sites de fixation est déterminée par comptage γ comme indiqué dans la section matériels et méthodes.

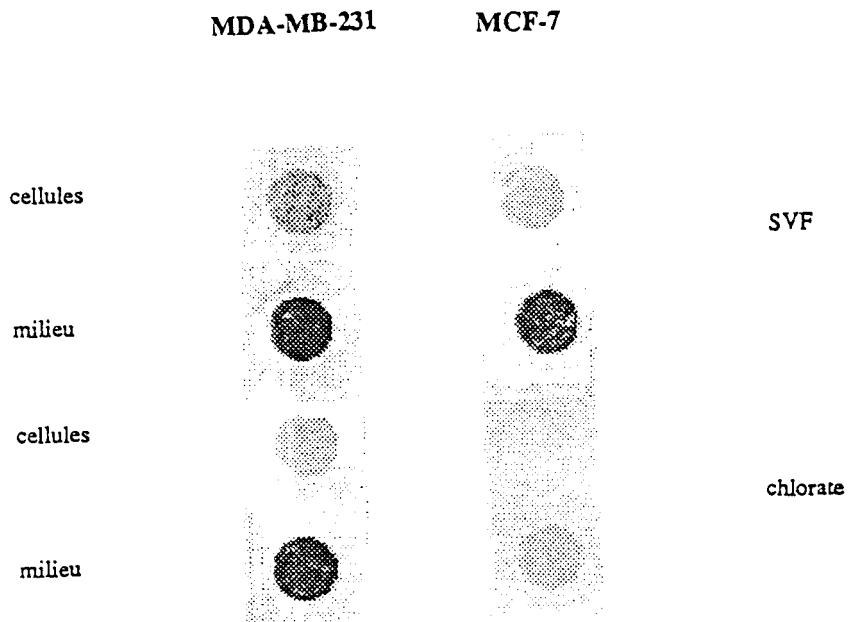


Figure 40 : Fixation du ^{125}I FGF-2 sur les protéoglycannes immobilisés sur des membranes cationiques. Après incubation des PG immobilisés avec le FGF-2 iodé, les filtres sont placés en exposition pour autoradiographie pendant 24 heures. La liaison du ^{125}I FGF-2 sur les PG purifiés est déterminée par analyse densitométrique, réalisée après digitalisation de l'image (scanner) grâce au logiciel Diversity One (LKB, Pharmacia) installé sur station Sun (Sparc Classic).

Pour une même quantité de PG déposés (rapportée en cpm de ^{35}S), les protéoglycannes libérés dans le milieu de culture par les cellules cancéreuses présentent une plus grande capacité de fixation du FGF-2 que les PG de la couche cellulaire. Par ailleurs, on notera que ce sont les protéoglycannes issus de la couche cellulaire des cellules MCF-7, qui présentent la capacité de fixation la plus réduite pour le FGF-2.

Après digestion enzymatique par l'héparinase, les capacités de liaison du FGF-2 des PG purifiés sont totalement abolies (figure 41). Les chaînes de type HS sont donc indispensables à la fixation du FGF-2.

Après un traitement par le chlorate de sodium, la fixation du FGF-2 est quasiment abolie pour les PG de la couche cellulaire des MCF-7. Par contre, la fixation du FGF-2 est inhibée de 56 % sur les PG isolés du milieu de culture des cellules MCF-7 (figure 41). La fixation du FGF-2 diminue de 40 % pour les protéoglycannes purifiés de la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231, et seulement de 15 % pour les PG libérés dans le milieu de culture.

III-2 - Effet d'une modification des PG sur l'activité mitogène du FGF-2.

III-2-1 - Dégradation enzymatique des chaînes de glycosaminoglycannes.

Après traitement par l'héparinase, les cellules MCF-7 deviennent insensibles au FGF-2 (figure 42 A). Une digestion par la chondroitinase ou par la hyaluronidase est sans effet sur la réponse des cellules MCF-7 au FGF-2. Par contre, la prolifération des cellules MDA-MB-231 n'est pas modifiée par un traitement enzymatique *in situ* des cellules par l'héparinase, par la chondroitinase ABC ou par la hyaluronidase (figure 42 B). On notera que la digestion enzymatique par l'héparinase des chaînes d'HS n'empêche cependant pas les cellules MCF-7, comme les cellules MDA-MB-231, d'être toujours sensibles au SVF.

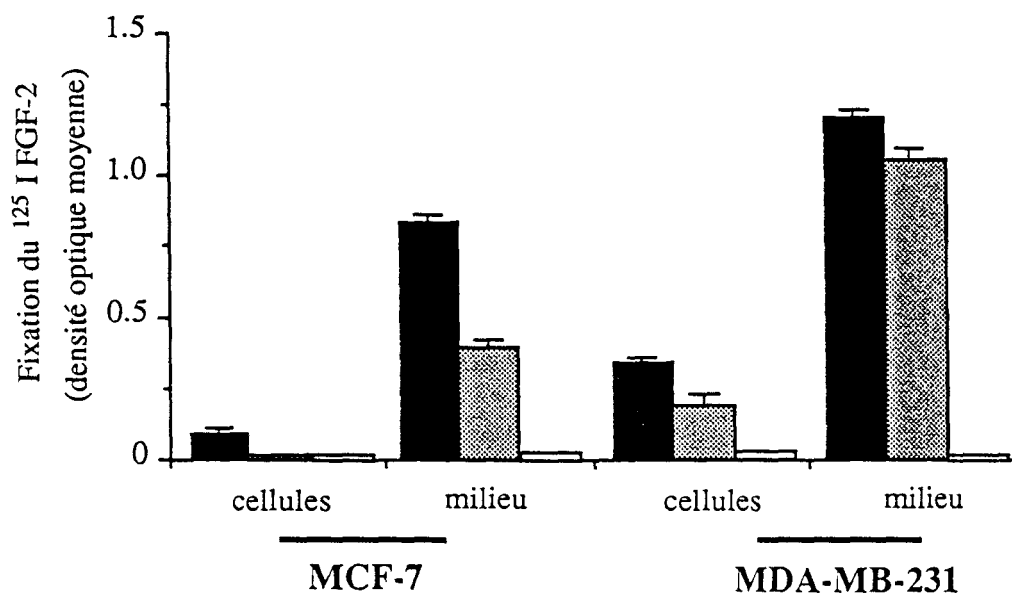


Figure 41 : Fixation du ^{125}I FGF-2 aux protéoglycannes immobilisés sur membrane cationiques. La densité optique moyenne, mesurée après digitalisation de l'image grâce au logiciel diversity one, permet d'estimer la capacité de fixation du FGF-2 des PG purifiés. Pour cela, les PG des cellules cultivées dans les conditions de contrôle (■), en présence de 30 mM de chlorate de sodium (▨) ou après digestion par l'héparinase (□) sont immobilisés sur des membranes cationiques et incubés en présence de ^{125}I FGF-2 comme décrit dans la section matériels et méthodes.

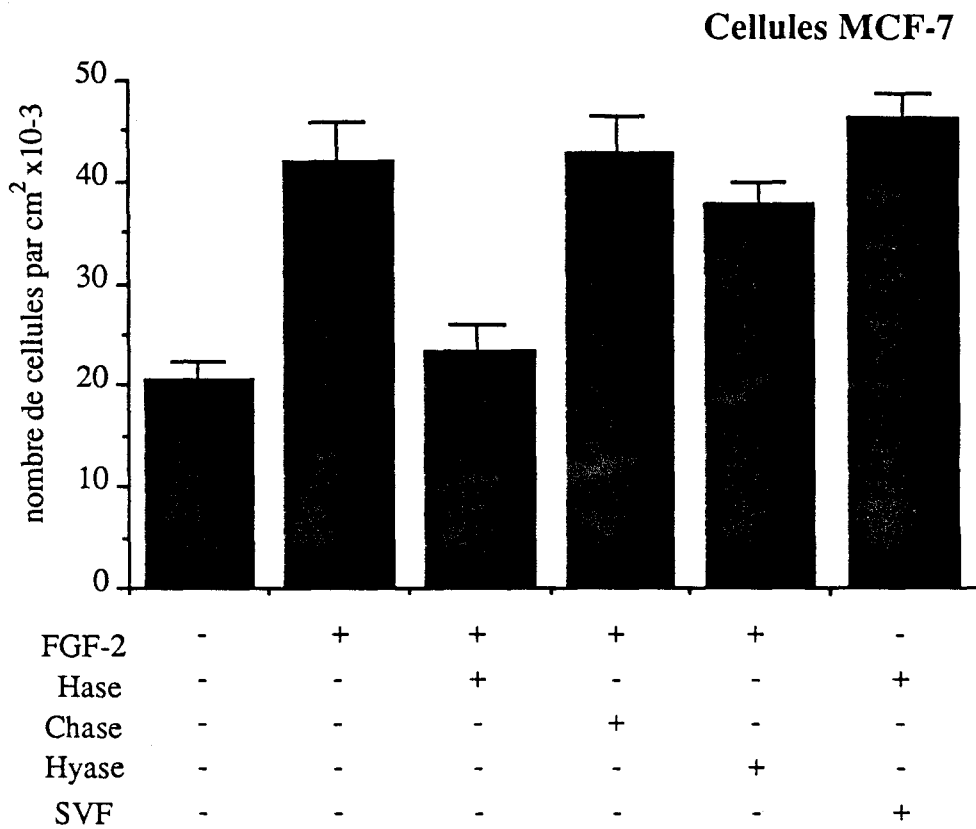
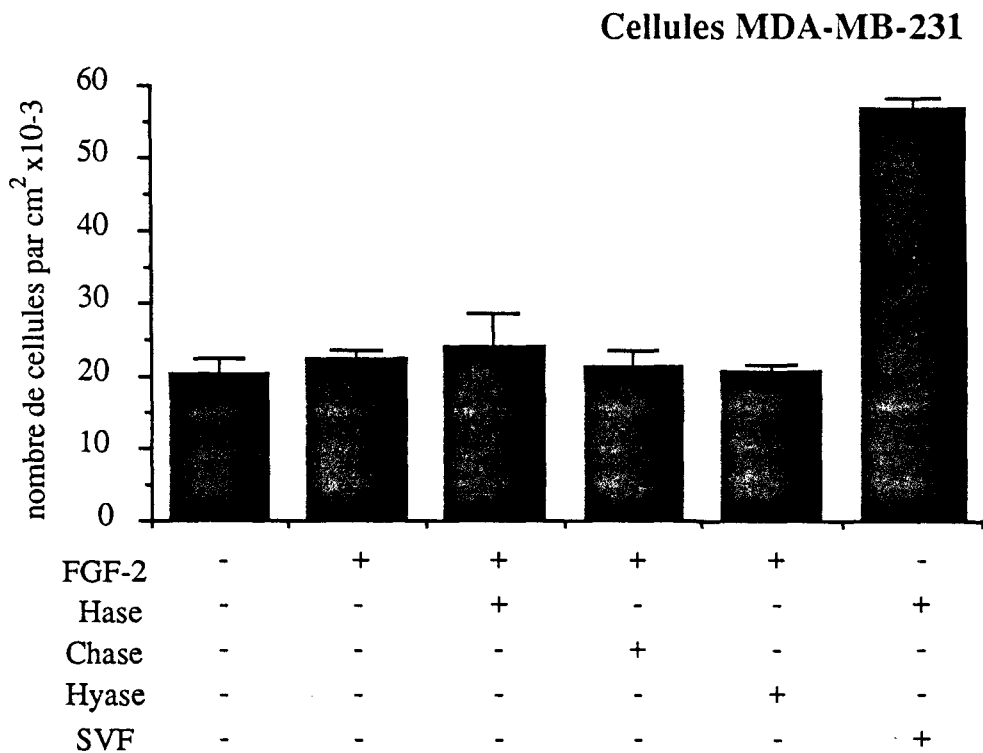
A**B**

Figure 42 : Effet de la dégradation enzymatique des chaînes de GAG sur la prolifération cellulaire. Les cellules MCF-7 (A) et les cellules MDA-MB-231 (B) sont cultivées comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les traitements enzymatiques par l'héparitinase (Hase), la chondroitinase (Chase) ou la hyaluronidase (Hyase) sont réalisés 6 heures avant l'addition du FGF-2 (5 ng/ml) et renouvelés toutes les 6 heures pendant les 48 heures de traitement. Les cellules sont décollées en présence de trypsine/EDTA et comptées à l'aide d'un hématocytomètre.

III-2-2 - Inhibition de la sulfatation des PG.

Cellules MCF-7.

Un traitement par 30 mM de chlorate de sodium inhibe totalement l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules MCF-7 (figure 43 A). Les cellules MCF-7 sont toujours capables de proliférer puisqu'elles restent stimulables par le SVF. L'effet mitogène du FGF-2 est partiellement restauré lorsque l'on ajoute 15 mM de Na₂SO₄ dans le milieu de culture de cellules MCF-7 traitées au chlorate de sodium (figure 43 A). Par un mécanisme de compétition, les ions sulfates en excès permettent d'assurer le fonctionnement normal de l'ATP-sulfurylase et consécutivement la sulfatation des GAG.

L'addition d'héparine à la concentration de 10 µg/ml permet de restaurer l'effet mitogène du FGF-2 sur les cellules MCF-7 (figure 43 A). Par contre, l'addition d'autres GAG, comme les chondroïtine sulfates ou l'acide hyaluronique, est sans effet. Il faut également noter que l'effet du chlorate de sodium est réversible, puisque lorsque les cellules MCF-7 sont rincées et placées dans un milieu dépourvu de chlorate de sodium, elles peuvent de nouveau être stimulées par le FGF-2 (résultats non montrés).

Cellules MDA-MB-231.

Comme nous l'avons précédemment montré, les cellules MDA-MB-231 sont insensibles au FGF-2 dans des conditions normales de culture. Par contre, lorsque les cellules MDA-MB-231 sont cultivées en présence de 30 mM de chlorate de sodium, le nombre de cellules est significativement augmenté en présence de FGF-2 (figure 43 B). Cet effet stimulateur du FGF-2 sur ces cellules traitées au chlorate de sodium peut être inhibé lorsque celles-ci sont cultivées en présence simultanée de Na₂SO₄, mais également d'héparine (figure 43 B). Par contre, l'addition d'acide hyaluronique ou de chondroïtine sulfates ne modifie pas l'effet du FGF-2 observé sur des cellules MDA-MB-231 traitées par 30 mM de chlorate de sodium (figure 43 B).

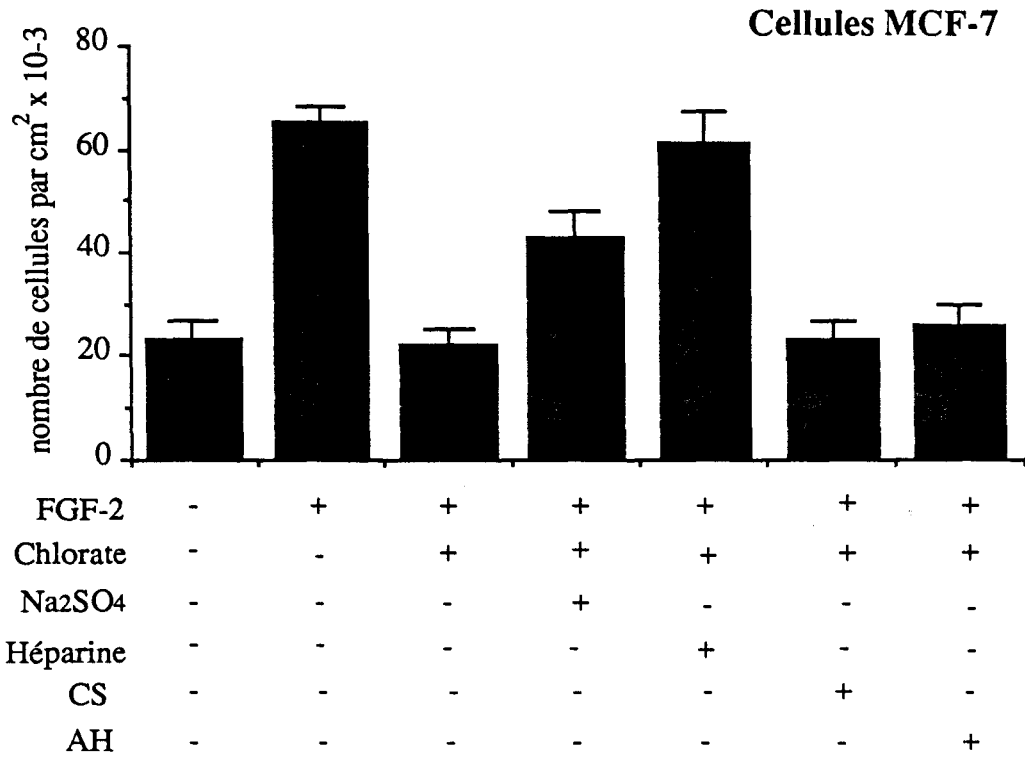
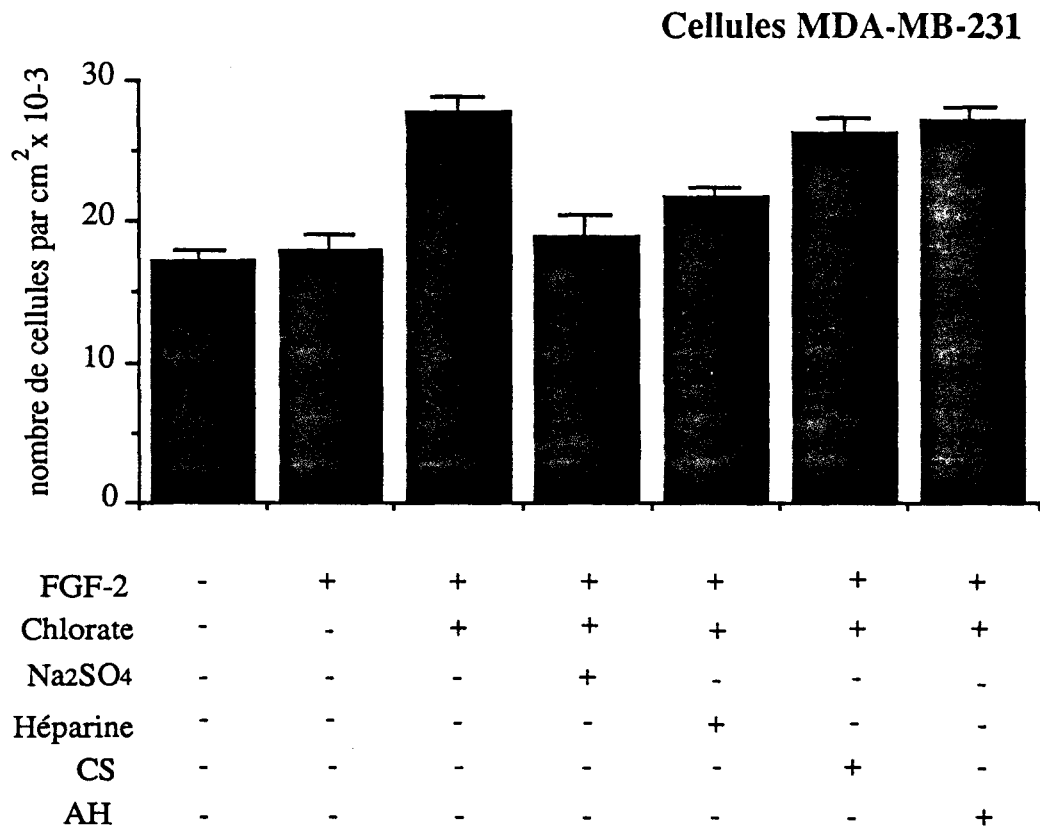
A**B**

Figure 43 : Effet du chlorate de sodium sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) sont cultivées en présence de 30 mM de chlorate de sodium comme décrit dans la section matériels et méthodes. Le sulfate de sodium (15 mM), 10 % de SVF, l'héparine (10 µg/ml), les chondroïtine sulfates (10 µg/ml) et l'acide hyaluronique (10 µg/ml) sont ajoutés simultanément au facteur de croissance.

D'une manière particulièrement intéressante, nous avons observé que l'effet du chlorate de sodium est fortement dépendant de la dose (figure 44). Ainsi, pour les cellules MCF-7 (figure 44 A), l'effet mitogène du FGF-2 est déjà nettement diminué pour une dose de 10 mM de chlorate de sodium. A partir de 30 mM, cette inhibition est totale. Pour les cellules MDA-MB-231, en présence de FGF-2, le nombre de cellules est significativement augmenté à partir de 10 mM de chlorate de sodium (figure 44 B). Par contre, pour des doses allant au-delà de 30 mM, les cellules MDA-MB-231 ne sont plus stimulées par le FGF-2.

III-2-3 - Effet du β -D-Xyloside.

Le β -D-Xyloside inhibe la liaison des chaînes polysaccharides sur l'axe protéique et entraîne l'accumulation de GAG libres dans le milieu de culture des cellules. Nos résultats montrent que les cellules MCF-7 restent sensibles au FGF-2 lorsqu'elles sont cultivées en présence de 0.5 mM de β -D-Xyloside (figure 45). De même, il ne modifie pas la prolifération des cellules MDA-MB-231, cultivées en présence ou non de FGF-2.

III-3 - Effet des PG purifiés sur la prolifération des cellules.

III-3-1 - Milieux conditionnés.

La prolifération des cellules MCF-7 induite par le FGF-2 n'est pas modifiée par l'addition de milieu conditionné par les cellules MCF-7 ou les cellules MDA-MB-231 (figure 46 A). On remarquera également que l'héparine n'a également aucun effet significatif sur cette prolifération. Par contre, nos résultats montrent que le milieu conditionné des cellules MCF-7 est capable de restaurer l'effet mitogène du FGF-2 sur des cellules préalablement traitées par 30 mM de chlorate de sodium de la même façon qu'après addition de 10 μ g/ml d'héparine (figure 46 B). Le milieu conditionné des cellules MDA-MB-231 permet également de restaurer mais de manière partielle la prolifération induite par le FGF-2 des cellules MCF-7.

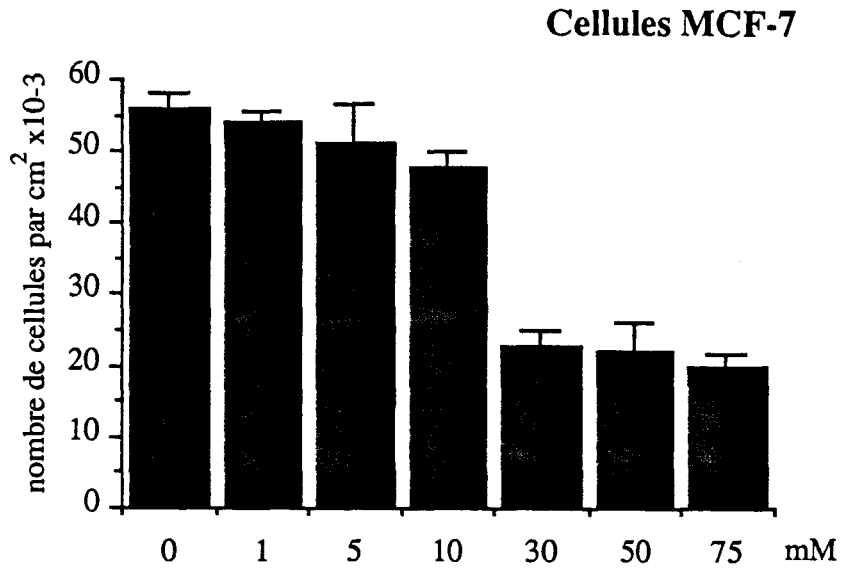
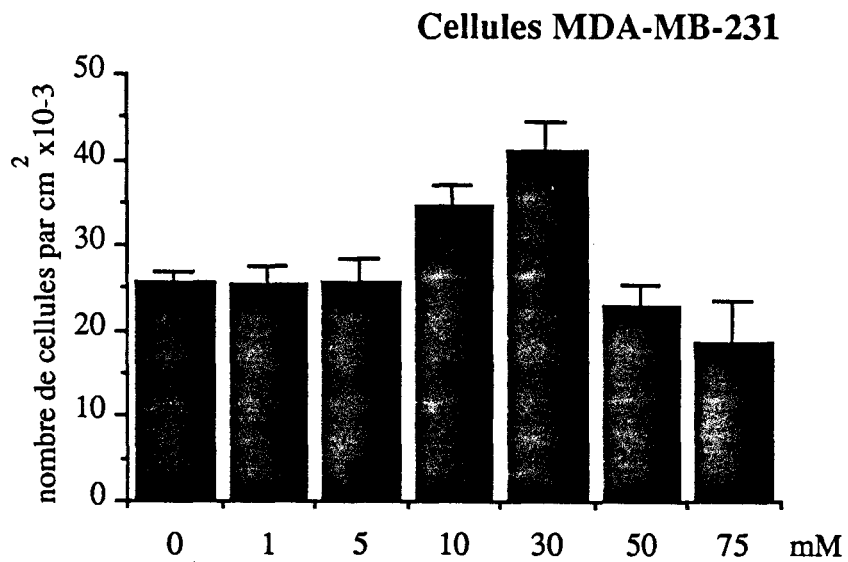
A**B**

Figure 44 : Effet de la dose du chlorate de sodium sur l'activité mitogène du FGF-2. Les cellules MCF-7 (A) et les cellules MDA-MB-231 (B) ont été traitées par le chlorate de sodium comme décrit dans la section matériels et méthodes.

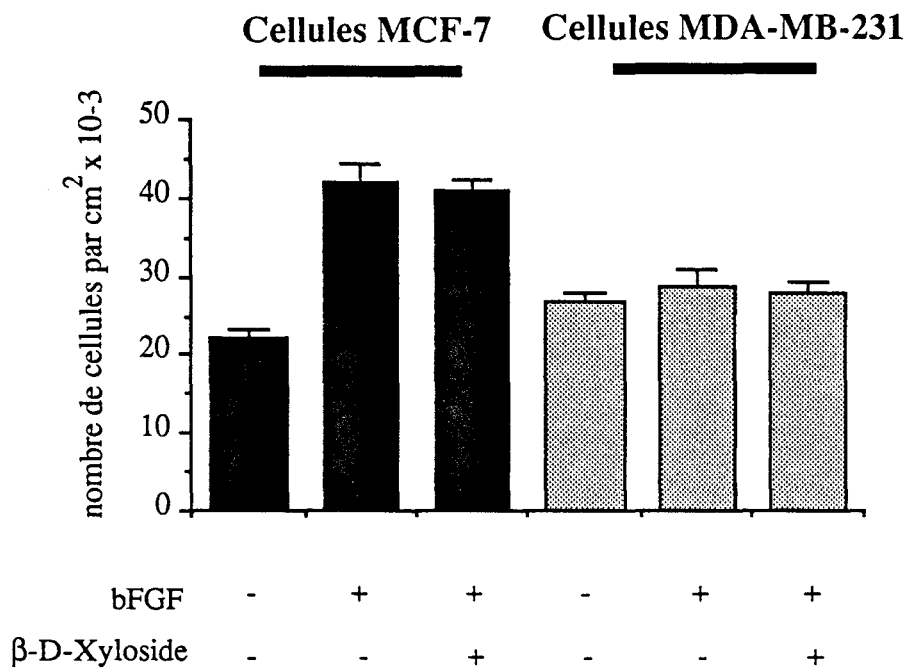


Figure 45 : Effet du β -D-Xyloside sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires.

Les cellules MCF-7 (■) et les cellules MDA-MB-231 (▨), pré-traitées par 0.5 mM de β -D-Xyloside pendant 24 heures, sont ensuite placées en présence de FGF-2 à 0.5 ng/ml et de 0.5 mM de β -D-Xyloside pendant 48 heures. Les cellules sont alors décollées par une solution de trypsine/EDTA et comptées à l'aide d'un hématocytomètre.

Sur les cellules MDA-MB-231 cultivées en présence de chlorate de sodium, le milieu de culture des cellules MCF-7 empêche totalement la prolifération induite par le FGF-2. De même, le milieu conditionné des cellules MDA-MB-231 inhibe la réponse des cellules MDA-MB-231 au FGF-2 (figure 47 B). Il faut noter que la prolifération des cellules MDA-MB-231 n'est pas modifiée par l'addition seule de milieux conditionnés (figure 47 A et B).

III-3-2 - Fractions purifiées.

Les protéoglycannes purifiés après chromatographie échangeuse d'ions, sont testés sur les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 traitées au chlorate de sodium. Tout d'abord, sur les cellules MCF-7 cultivées en présence de chlorate de sodium, nos résultats mettent en évidence que les PG purifiés du milieu de culture de ces cellules sont capables de restaurer totalement l'effet biologique du FGF-2 (figure 48 A). Les PG purifiés de la couche cellulaire des cellules MCF-7 ne permettent de restaurer que partiellement cet effet (figure 48 A). Les PG purifiés ne modifient pas la prolifération des cellules en absence de FGF-2 (résultats non montrés).

Sur les cellules MDA-MB-231 traitées par le chlorate de sodium, l'effet mitogène du FGF-2 est inhibé lorsqu'on ajoute simultanément au facteur de croissance les protéoglycannes purifiés des cellules MDA-MB-231 (figure 48 B). Une inhibition partielle de l'action du FGF-2 est également obtenue avec les PG du milieu de culture des cellules MDA-MB-231 (figure 48 B).

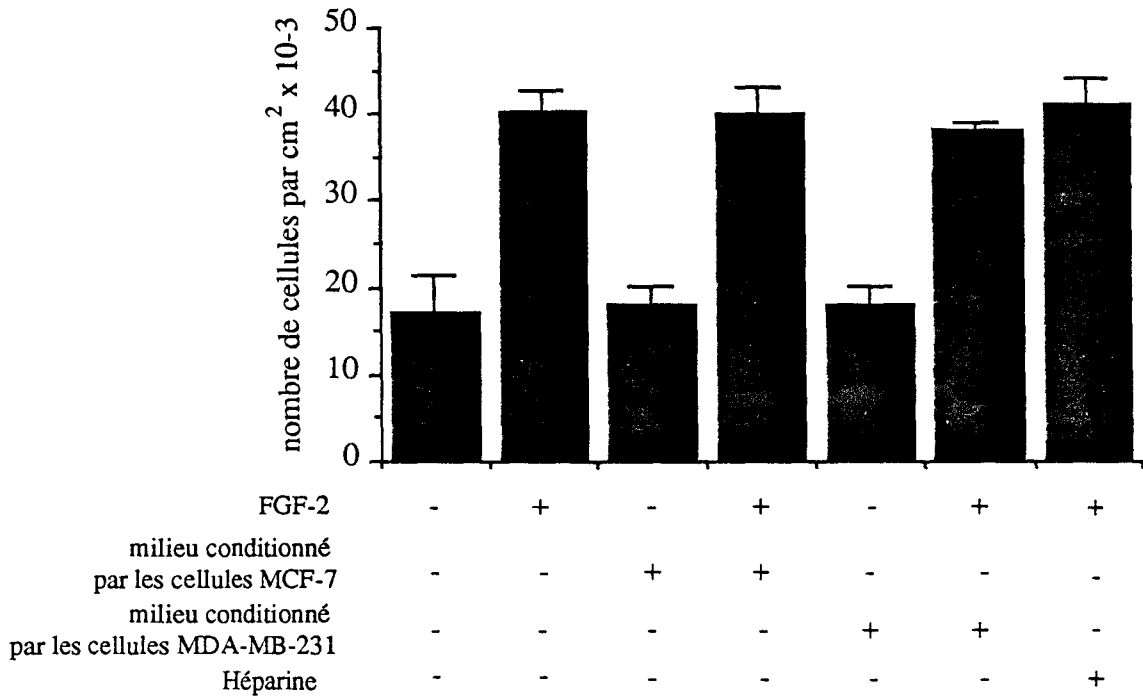
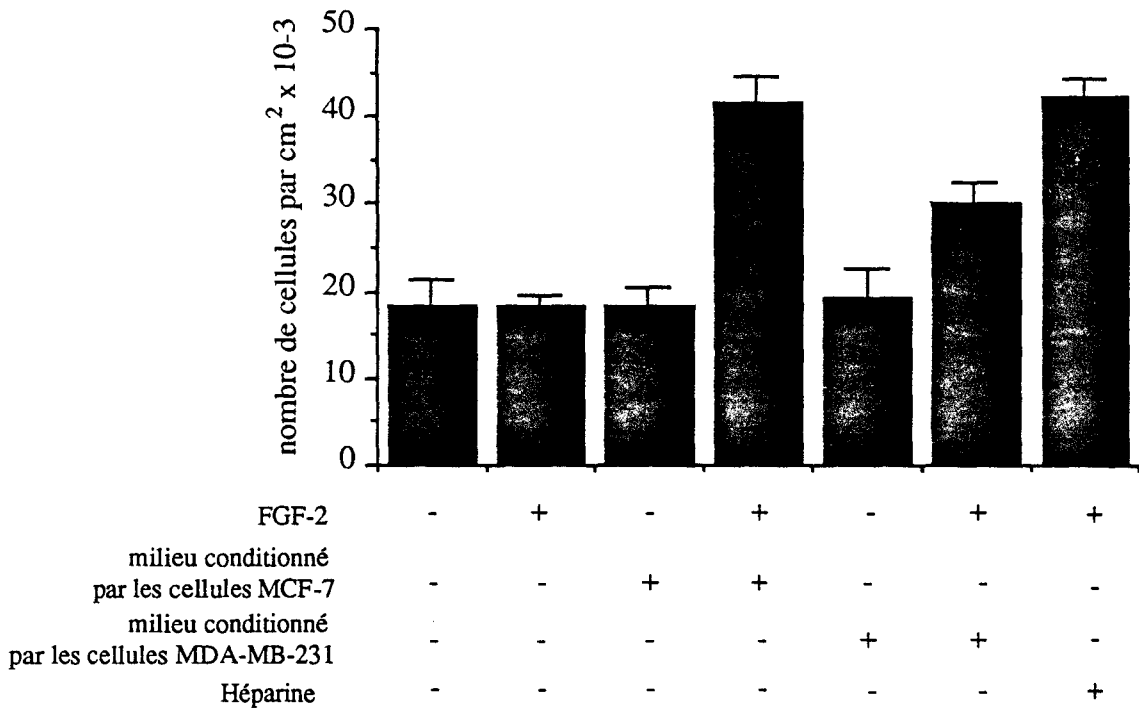
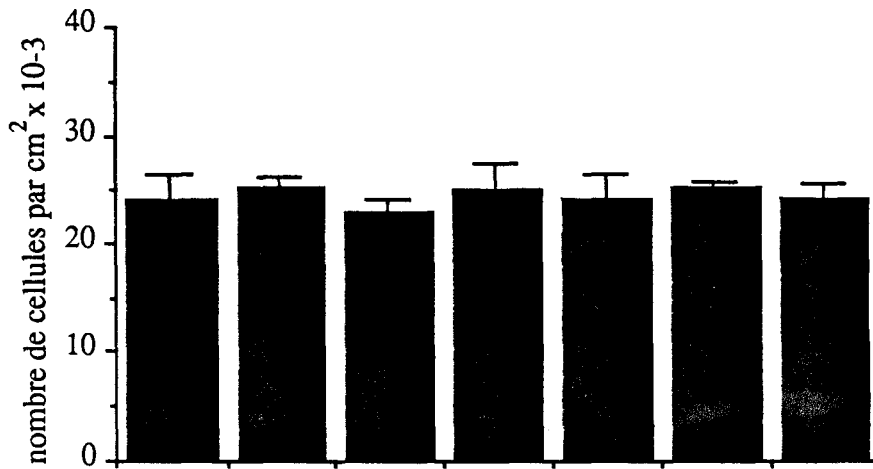
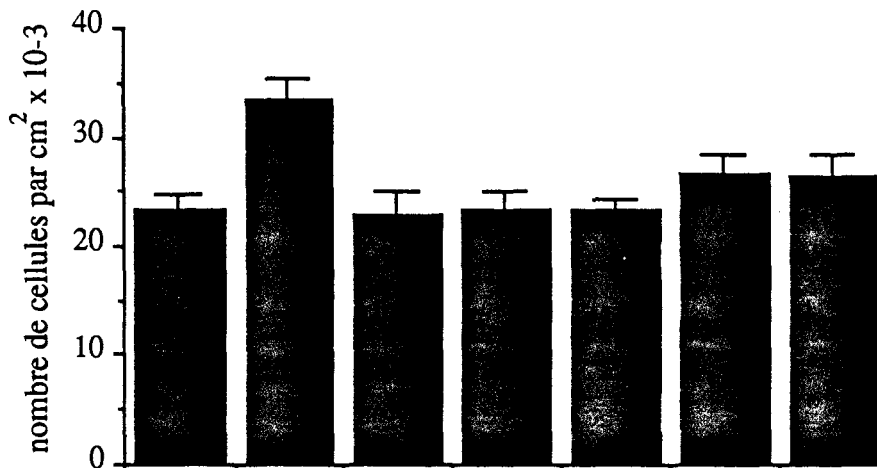
A**Cellules MCF-7 non traitées par le chlorate de sodium.****B****Cellules MCF-7 traitées au chlorate de sodium.**

Figure 46 : Effet de milieu conditionné sur la prolifération des cellules MCF-7. Les cellules MCF-7 non traitées (A) ou traitées par 30 mM de chlorate de sodium (B) sont placées en présence de milieu conditionné pendant une période de 48 heures. La prolifération cellulaire est estimée par comptage comme indiqué dans la rubrique matériels et méthodes.

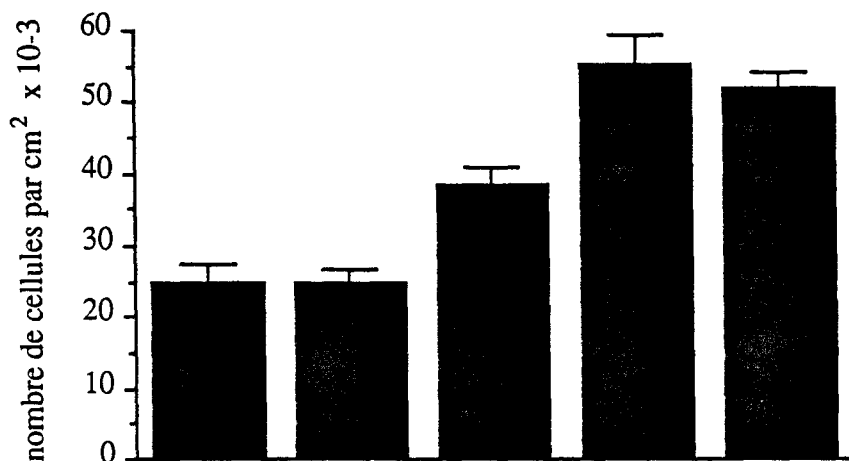
A**Cellules MDA-MB-231 non traitées par le chlorate de sodium.**

FGF-2	-	+	-	+	-	+	+
milieu conditionné par les cellules MCF-7	-	-	+	+	-	-	-
milieu conditionné par les cellules MDA-MB-231	-	-	-	-	+	+	-
Héparine	-	-	-	-	-	-	+

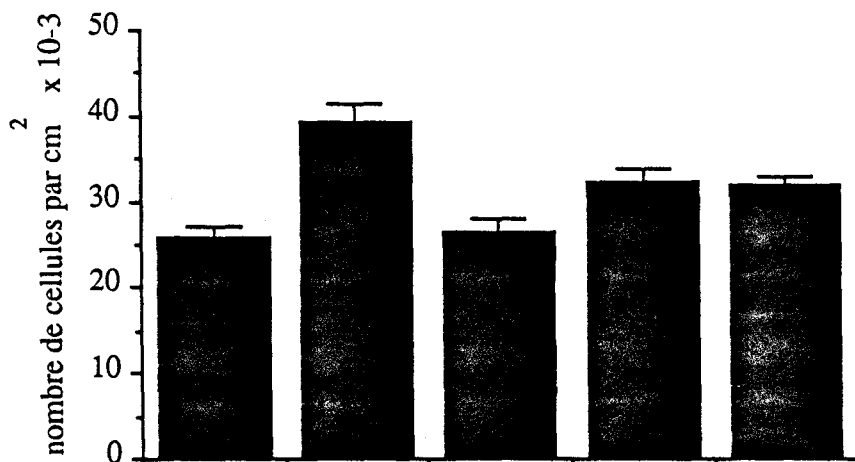
B**Cellules MDA-MB-231 traitées au chlorate de sodium.**

FGF-2	-	+	-	+	-	+	+
milieu conditionné par les cellules MCF-7	-	-	+	+	-	-	-
milieu conditionné par les cellules MDA-MB-231	-	-	-	-	+	+	-
Héparine	-	-	-	-	-	-	+

Figure 47 : Effet de milieu conditionné sur la prolifération des cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 non traitées (A) ou traitées par 30 mM de chlorate de sodium (B) sont placées en présence de milieu conditionné pendant une période de 48 heures. La prolifération cellulaire est estimée par comptage comme indiqué dans la rubrique matériels et méthodes.

A**Cellules MCF-7**

FGF-2	-	+	+	+	+
PG de la couche cellulaire	-	-	+	-	-
PG libérés dans le milieu	-	-	-	+	-
Héparine	-	-	-	-	+

B**Cellules MDA-MB-231**

FGF-2	-	+	+	+	+
PG de la couche cellulaire	-	-	+	-	-
PG libérés dans le milieu	-	-	-	+	-
Héparine	-	-	-	-	+

Figure 48 : Effet des PG purifiés sur le contrôle de l'activité biologique du FGF-2. Les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) sont traitées par 30 mM de chlorate de sodium comme indiqué dans la section matériel et méthodes. Les PG purifiés de DEAE-Sephacel sont ajoutés simultanément au FGF-2.

IV - DISCUSSION.

Les HSPG sont décrits comme les sites de liaison de basse affinité du FGF-2, qui protègent ce facteur de croissance de la dégradation protéolytique (Saksela et al. 1988 ; Bashkin et al. 1989 ; revue dans Vlodavsky et al. 1991), mais également comme des structures capables d'activer le FGF-2, en permettant l'interaction de ce facteur de croissance avec son récepteur à activité tyrosine kinase (FGFR) et consécutivement la transduction du signal (Rapraeger et al. 1991 ; Yayon et al. 1991 ; revue dans Gallagher, 1994). Nous avons précédemment montré que les cellules MDA-MB-231, insensibles au FGF-2, synthétisent beaucoup plus d'HSPG au sein de leur couche cellulaire que les cellules MCF-7. Dans ce chapitre, nous avons entrepris de caractériser, d'une part les capacités d'interaction avec le FGF-2 des protéoglycannes purifiés des deux types cellulaires, et d'autre part de tester l'effet de ces mêmes PG sur l'activité mitogène du FGF-2.

Dans un premier temps, les capacités d'interaction du FGF-2 avec les PG des cellules épithéliales mammaires ont été étudiées après digestion enzymatique des GAG. La destruction spécifique des chaînes d'HS par l'héparinase inhibe la fixation du FGF-2 sur les cellules MCF-7 comme sur les cellules MDA-MB-231. Par contre, une digestion par la chondroitinase ABC ne modifie absolument pas la fixation du FGF-2 sur les cellules. Nous avons également montré que la liaison du FGF-2 sur les PG purifiés requiert spécifiquement la présence des chaînes d'HS. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus sur d'autres modèles (Moscatelli, 1987 ; Rapraeger et al. 1991 ; Yayon et al. 1991). L'utilisation d'un inhibiteur de la sulfatation nous a ensuite permis d'étudier le rôle de la sulfatation des GAG dans les interactions du FGF-2 aux PG des cellules de cancer du sein. Les séquences d'HS actuellement connues pour interagir avec le FGF-2 sont caractérisées par leur haut degré de sulfatation (Turnbull et al. 1992 ; Habuchi et al. 1992 ; Maccarana et al. 1993 ; Ishihara et al. 1993a, 1994 ; Walker et al. 1994).

L'utilisation d'un inhibiteur de la sulfatation pour étudier les capacités d'interaction du FGF-2 avec les PG a été initialement utilisée sur les fibroblastes 3T3, par Rapraeger et al. (1991). Sur les cellules épithéliales mammaires, nous avons montré que le chlorate de sodium inhibe la sulfatation des PG de manière dépendante de la dose. Par contre, la taille des PG synthétisés ainsi que le degré de polymérisation des chaînes de GAG ne sont pas modifiés. Comme décrit sur d'autres modèles, la quantité de PG synthétisés est la même au sein de la couche cellulaire et du milieu de culture, seule la sulfatation de ces macromolécules est diminuée (Keller et al. 1989 ; Greve et al. 1988 ; Bame et al. 1994). La diminution de densité de charge que nous avons observée en présence de chlorate de sodium, dans le cas des PG des cellules mammaires est conforme à celle décrite dans la littérature (Keller et al. 1988 ; Greve et al. 1988 ; Brauer et al. 1990 ; Olwin et Rapraeger, 1992).

Nos résultats montrent que cette diminution spécifique de la sulfatation des PG entraîne consécutivement une inhibition de la liaison du ^{125}I FGF-2 aux cellules MCF-7 comme aux cellules MDA-MB-231. Cette fixation du FGF-2 aux cellules est de plus, dépendante de la dose de chlorate de sodium utilisée, donc en fait du nombre de groupements sulfates portés par les GAG des cellules épithéliales mammaires. Par ailleurs, nous avons observé que les cellules MDA-MB-231 fixent quantitativement plus de ^{125}I FGF-2 que les cellules MCF-7. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Peyrat et al. (1991), qui avaient mis en évidence, par des techniques de radiorécepteurs, une plus grande quantité de sites de fixation membranaires du FGF-2 pour les cellules MDA-MB-231 que pour les cellules MCF-7. De plus, nous avons montré qu'un traitement par le chlorate de sodium inhibe la fixation du FGF-2 sur les sites de fixation de basse affinité mais également sur les sites de fixation de haute affinité, mettant en évidence la nécessité de HSPG sulfatés dans la fixation du FGF-2 à ces récepteurs.

Dans notre étude, nous avons également immobilisé les PG purifiés par chromatographie échangeuse d'ions, sur des membranes cationiques afin d'étudier leur capacité à fixer le ^{125}I FGF-2. Ce travail nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'existence de PG capables de fixer le FGF-2 dans la couche cellulaire mais également dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231 et MCF-7.

En fait, dans le cas des cellules MCF-7, les PG présentant la plus grande capacité de fixation du FGF-2 sont majoritairement présents dans le milieu de culture. Les PG de la couche cellulaire présentent par contre, une plus faible capacité de fixation du FGF-2. Ce résultat pourrait expliquer que les sites de liaison de basse affinité pour le FGF-2 n'aient pas été détectés par dosage radiorécepteur sur les cellules MCF-7 (Peyrat et al. 1991). De plus, et d'une manière particulièrement intéressante, ce sont les PG des cellules MDA-MB-231 qui présentent la plus grande capacité de fixation du FGF-2. Peyrat et ses collaborateurs (1991) avaient également mis en évidence une très grande quantité de sites de liaison au niveau des membranes des cellules MDA-MB-231. Cette étude, cependant, ne nous renseignait pas sur la capacité de fixation des PG du milieu de culture des cellules MDA-MB-231, pourtant supérieure encore à celle des PG de la couche membranaire.

Ces différents résultats mettent clairement en évidence le rôle des chaînes de GAG de type HS et plus précisément de leur sulfatation spécifique dans la fixation du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein. Nous avons alors essayé de comprendre le rôle des HSPG dans l'activité biologique du FGF-2. Un traitement par l'héparinase abolit totalement la prolifération induite par le FGF-2 sur les cellules MCF-7, confirmant bien le caractère indispensable des HSPG dans l'activité biologique de ce facteur de croissance (Rapraeger et al. 1991 ; Yayon et al. 1991). De la même manière, nous avons étudié la prolifération des cellules après désulfatation des PG par le chlorate de sodium. Il faut tout d'abord noter que, comme décrit dans d'autres modèles cellulaires (Humphries et Silbert, 1988 ; Greve et al. 1988 ; Keller et al. 1989), le chlorate de sodium ne modifie ni la prolifération ni la synthèse protéique des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en présence ou en absence de sérum de veau foetal (résultats non montrés).

Sur les cellules MCF-7, nous avons montré qu'une diminution de la sulfatation des PG inhibe totalement l'effet mitogène du FGF-2. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Rapraeger et al. (1991), qui avaient mis en évidence la nécessité de la présence des HS ou d'héparine, dans la prolifération induite par le FGF-2, sur des fibroblastes NIH 3T3. La levée d'inhibition par l'héparine souligne en outre le fait que les HS ne doivent pas être nécessairement liés à un axe protéique pour permettre l'activité biologique du FGF-2.

Nous avons confirmé cette idée en montrant que les GAG libres, non liés à un axe protéique permettent également l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules MCF-7. Ces résultats sont en accord avec ceux récemment publiés par l'équipe de Vlodavsky (1995), qui ont mis en évidence que les chaînes d'HS libres synthétisés en présence de xylosides permettent la fixation du FGF-2 aux cellules comme le font les molécules d'HS endogènes (Miao et al. 1995 ; Vlodavsky et al. 1995). Les chaînes d'HS n'ont donc pas à être liées à un axe protéique ou ancrées dans la membrane cellulaire pour permettre l'action mitogène du FGF-2, mais peuvent être libres et solubles dans le milieu de culture. En accord avec ces résultats, nous avons montré que les PG purifiés du milieu de culture des cellules MCF-7 permettent, comme l'héparine, de restaurer complètement l'effet mitogène du FGF-2 sur des cellules MCF-7 traitées au chlorate de sodium. Il nous apparaît donc que les HSPG libérés dans le milieu de culture sont les PG les plus actifs pour permettre l'activité biologique du FGF-2 sur les cellules MCF-7.

Sur les cellules MDA-MB-231, normalement insensibles au FGF-2 (Peyrat et al. 1991 ; Delehedde et al. 1995), nous avons montré qu'une diminution partielle de la sulfatation des PG (30 mM de chlorate de sodium) permet au FGF-2 de stimuler la prolifération de ces cellules. Cet effet est fortement dépendant de la dose de chlorate de sodium. Si la désulfatation des PG est plus importante (50 mM de chlorate de sodium), l'effet mitogène du FGF-2 est totalement aboli. Comme nous l'avons décrit pour les cellules MCF-7, les groupements sulfates au sein des HS, sont donc impliqués dans la liaison mais également dans le contrôle de l'activité du FGF-2. De plus, nous avons montré que cet effet mitogène du FGF-2 sur les cellules MDA-MB-231, peut être totalement aboli après ajout de PG normalement sulfatés purifiés de ces cellules.

L'existence de PG inhibiteurs de l'activité du FGF-2 a déjà été décrite dans d'autres modèles (Schmidt et al. 1990 ; 1992a, b ; Hondermarck et al. 1992b ; Nugent et al. 1993 ; Aviezer et al. 1994b). Les PG inhibiteurs de la prolifération, isolés des cellules musculaires lisses de l'aorte (Fritze et al. 1985 ; Schmidt et al. 1990, 1992a, b, 1995) ou des fibroblastes de poumon (Aviezer et al. 1994b) inhibent en fait la liaison du FGF-2 à son récepteur. Un effet similaire a également été décrit pour des composés polyanioniques de synthèse tels que le RG 13577 (Benezra et al. 1994 ; Vlodavsky et al. 1995) ou encore le

sucralfate (Spivak-Kroizman et al. 1994b) qui, en fixant le FGF-2, empêchent la liaison de ce facteur de croissance aux sites de basse et de haute affinité.

Dans le cerveau d'embryon de poulet, sur la base de techniques identiques à celles que nous avons utilisées ici, Hondermarck et al. (1992b) ont montré que certaines fractions d'HS sont capables d'inhiber l'effet mitogène et neurotrophique du FGF-2. De plus, au cours du développement du cerveau (Hondermarck et al. 1992a) et du placenta (Hondermarck et al. 1990b), ces auteurs ont observé que la quantité d'HSPG augmente de façon concomitante à l'arrêt des activités de prolifération cellulaire.

L'ensemble de ces travaux nous amène à penser que l'insensibilité au FGF-2 des cellules MDA-MB-231 pourrait s'expliquer par une très grande quantité d'HSPG capables de fixer le FGF-2. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que la surexpression d'HSPG membranaires capables de fixer le FGF-2 (syndecan-1) est capable d'inhiber totalement l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules NIH 3T3 (Mali et al. 1993). Par ailleurs, Aviezer et al. (1994b) ont mis en évidence que certains PG peuvent entrer en compétition directe avec l'héparine et empêcher la liaison du FGF-2 à son récepteur et cela de manière dépendante de la dose. De la même manière, les HSPG présents en grande quantité dans les cellules MDA-MB-231 pourraient entrer en compétition avec les structures présentes capables d'activer le FGF-2 et empêcher une réponse de ces cellules. Après traitement par le chlorate de sodium, une diminution partielle de la sulfatation des HSPG diminuerait l'activité inhibitrice de ces molécules et permettrait alors l'effet mitogène du FGF-2. Par ailleurs, il apparaît que la présence d'HSPG sulfatés est nécessaire à l'activité du FGF-2 puisqu'une désulfatation plus importante des PG ne permet plus la réponse des cellules MDA-MB-231. Différentes populations d'HSPG ont été observées dans la couche cellulaire comme dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231 et se caractérisent notamment par une densité de charge différente. La modification de la sulfatation, c'est-à-dire de l'équilibre de charges en présence dans les HSPG synthétisés par les cellules MDA-MB-231, pourraient ainsi rendre compte de la réponse de ces cellules au FGF-2 après traitement par le chlorate de sodium.

En conclusion de cette étude, il apparaît que les HSPG du milieu de culture sont indispensables à l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules MCF-7. Par contre, dans le cas des cellules MDA-MB-231 qui produisent beaucoup d'HSPG dans leur couche cellulaire comme dans leur milieu de culture, la réponse au FGF-2 semble inhibée par la quantité mais aussi par le degré de sulfatation des HSPG en présence. Ces résultats pris dans leur ensemble, placent les HSPG au centre du mécanisme de contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires.

* * *

*

**CONCLUSION
GENERALE.**

CONCLUSION GENERALE.

Le but de notre étude était de déterminer le rôle des HSPG dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires.

Dans un premier temps, il convenait de définir précisément l'effet du FGF-2 sur les paramètres du cycle de ces cellules. Nous avons ainsi mis en évidence par une étude cinétique approfondie que le FGF-2 agit sur les cellules MCF-7, d'une part en recrutant les cellules quiescentes (phase G0) et d'autre part, en diminuant la durée totale du cycle cellulaire. Par contre, il n'induit aucune modification des paramètres du cycle cellulaire sur les cellules métastatiques MDA-MB-231. L'insensibilité au FGF-2 des cellules MDA-MB-231 ne semblait pas être due à une absence de récepteurs de haute affinité puisque de précédents travaux avaient démontré que ces deux types de cellules expriment des récepteurs de haute affinité pour le FGF-2 (Luqmani et al. 1992 ; Lehtola et al. 1992 ; Pennault-Llorca et al. 1995) en nombre et en affinité comparables (Peyrat et al. 1991, 1992). Par contre, les cellules MDA-MB-231 se caractérisent par la présence de sites de basse affinité en très grande quantité par rapport aux cellules MCF-7 (Peyrat et al. 1991). Sur la base de précédents travaux réalisés au cours du développement embryonnaire (Hondermarck et al. 1990b, 1992a, 1992b), nous avons émis l'hypothèse que ces sites de basse affinité pourraient contrôler l'activité du FGF-2 sur les cellules de cancer du sein.

Aussi, au cours du chapitre 3, nous avons entrepris de purifier et de caractériser les HSPG synthétisés, puisqu'ils représentent les sites de basse affinité du FGF-2. Nous avons démontré que les cellules MDA-MB-231 synthétisent deux fois plus d'HSPG que les cellules MCF-7. Une différence intrigante entre ces deux types cellulaires tient dans la répartition des HSPG entre la couche cellulaire et le milieu de culture. Ainsi, pour les cellules MDA-MB-231, la plus grande proportion d'HSPG est trouvée dans la couche cellulaire alors que pour les cellules MCF-7, les HSPG sont principalement libérés dans le milieu de culture. Les caractéristiques de charge et de taille des différents HSPG ont été

étudiées. Cependant, cette étude ne nous renseignait pas sur les capacités des différentes catégories d'HSPG purifiés, à fixer le FGF-2 et/ou à moduler l'activité biologique de ce facteur de croissance.

C'est pourquoi nous avons ensuite étudié les capacités d'interaction et d'activation du FGF-2 par les PG des cellules épithéliales mammaires. Dans les cellules MCF-7, nous avons montré que ce sont les HSPG libérés dans le milieu de culture qui fixent majoritairement le FGF-2. La dégradation de ces HSPG ou leur désulfatation empêche le FGF-2 de stimuler la prolifération. A l'inverse, dans les cellules MDA-MB-231, une désulfatation limitée permet d'obtenir une stimulation de la prolifération par le FGF-2. Cependant, si la désulfatation est plus importante, le FGF-2, comme dans le cas des cellules MCF-7, n'entraîne plus aucun effet mitogène.

L'ensemble de nos résultats démontre clairement l'implication des HSPG dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules de cancer du sein. Ainsi les HSPG sont indispensables à l'activité du FGF-2 mais peuvent également en fonction de leur degré de sulfatation et/ou de leur quantité, réguler négativement l'activité de ce facteur de croissance.

Plusieurs questions restent cependant en suspens. Notamment quels peuvent être les mécanismes qui contrôlent la répartition et la nature des HSPG synthétisés dans la couche cellulaire ou dans la matrice extracellulaire des cellules de cancer du sein. Une sous-sulfatation de ces macromolécules peut empêcher l'organisation de la matrice extracellulaire, le maintien du phénotype différencié et encore diminuer l'adhésion des cellules (Robinson et al. 1984 ; Parry et al. 1985 ; Brauer et al. 1990). Ainsi, les cellules de cancer du sein pourraient modifier très finement la structure et/ou la sulfatation de leurs chaînes d'HS afin de modifier leur capacités de liaison avec les différentes molécules de la matrice ou les facteurs de croissance afin de favoriser la prolifération, la différenciation ou la migration des cellules (Kinsella et Wight, 1986 ; Kato et al. 1994 ; Schmidt et al. 1995). Certains facteurs de croissance dont le FGF-2 lui-même, sont capables de moduler la synthèse des HSPG

(Elenius et al. 1992 ; Tzanakakis et al. 1995). Sachant que les cellules de cancer du sein sont capables de produire leurs propres facteurs de croissance (Dickson et al. 1991 ; Pennault-Llorca et al. 1995), il est tentant d'envisager que les cellules cancéreuses mammaires puissent modifier leurs capacités de prolifération et d'invasion en modifiant la structure de leurs HS.

Il apparaît maintenant nécessaire de déterminer les caractéristiques structurales et moléculaires des HSPG synthétisés par les cellules de cancer du sein. L'étude de l'axe protéique ainsi que des séquences oligosaccharidiques impliquées dans le contrôle de l'activité biologique du FGF-2 devront être entreprises. Les chaînes d'HS des cellules MDA-MB-231 capables d'inhiber l'activité du FGF-2 devront faire l'objet d'un intérêt particulier.

Une telle étude devrait permettre de mieux définir au niveau moléculaire les caractéristiques structurales des HS impliqués dans le mécanisme de contrôle de l'activité des FGF. Dans un second temps, ces éléments structuraux clairement déterminés devraient permettre :

(1) - d'aborder la distribution des différentes catégories d'HS dans les biopsies tumorales mammaires et d'envisager leur éventuel intérêt pour le pronostic.

(2) - de développer des stratégies antiprolifératives basées sur l'utilisation d'antagonistes spécifiques qui inhibent la croissance des cellules de cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIE.

BIBLIOGRAPHIE.

- Abraham J, Mergia JL, Whang A, Tumoto J, Frieman KA, Hjerrild D, Gospodarovitz D, Fiddes JC. (1986) Nucleoside sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233:545-548.
- Adnane J, Gaudray P, Dionne CA, Crumley G, Jaye M, Schlessinger J, Jeanteur P, Birnbaum D, Theillet C. (1991) BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancer. *Oncogene* 6:659-663.
- Ali J, Mansukhani A, Basilico C. (1995) Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 are differentially regulated in murine embryonal carcinoma cells and in response to fibroblast growth factor-4. *J. Cell. Physiol.* 165:438-448.
- Alini M, Losa G. (1991) Partial characterization of proteoglycans isolated from neoplastic and nonneoplastic human breast tissues. *Cancer Res.* 51:1443-1447.
- Almaric F, Bouche G, Bonnet H, Brethenou P, Roman AM, Truchet I, Quarto N. (1994) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochem. Pharmacol.* 47:111-115.
- Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW. (1991) Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66:257-270.
- Anandappa SY, Winstanley JHR, Leinster S, Green B, Rudland PS, Barraclough R. (1994) Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant disease. *Br. J. Cancer* 69:772-776.
- Andres JL, De Falcis D, Noda M, Massague J. (1992) Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J. Biol. Chem.* 267:5927-5930.
- Angello JC, Danielson KG, Anderson LW, Hosik HL. (1982) Glycosaminoglycan synthesis by subpopulations of epithelial cells from a mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 42:2207-2210.
- Arakawa T, Wen J, Philo JS. (1994) Stoichiometry of heparin binding to basic fibroblast growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 308:267-273.
- Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A. (1994a) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis and angiogenesis. *Cell* 79:1005-1013.
- Aviezer D, Levy E, Safran M, Svahn C, Buddeke E, Schmidt E, David G, Vlodavsky I, Yayon A. (1994b) Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of bFGF to its receptor. *J. Biol. Chem.* 269:114-121.

- Avivi A, Yayon A, Givol D. (1993) A novel form of FGF receptor-3 using an alternative exon in the immunoglobulin domain III. *FEBS Lett.* 330:249-252.
- Baird A, Esch F, Mormede P, Ueno N, Ling N, Bohlen P, Ying SY, Wehrenberg WB, Guillemin R. (1986) Molecular characterization of fibroblast growth factor: Distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog. Horm. Res.* 42:143-205.
- Baird A, Shubert 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, Bose-Bierne I, Almaric F, Bouche G. (1990) Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J.* 9:1511-1517.
- Bame KJ. (1993) Release of heparan sulfate glycosaminoglycans from proteoglycans in chinese hamster ovary cells does not require proteolysis of the core protein. *J. Biol. Chem.* 268:19956-19964.
- Bame KJ, Zhang L, David G, Esko JD. (1994) Sulphated and undersulfated heparan sulphate proteoglycans in a chinese hamster ovary cell mutant defective in N-sulphotransferase. *Biochem. J.* 303:81-87.
- Barraclough R, Fernig DG, Rudland PS, Smith JA. (1990) Synthesis of basic fibroblast growth factor upon differentiation of rat mammary epithelial to myoepithelial-like cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 144:333-344.
- Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I. (1989) Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28:1737-1743.
- Basilico C, Moscatelli D. (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* 59:115-165.
- Bauerle PA, Huttner WB. (1986) Chlorate-a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14:870-877.
- Beck JC, Lekutis C, Couchman J, Parry G. (1993) Stage-specific remodeling of the mammary gland basement membrane during lactogenic development. *190:616-623.*
- Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA. (1991) Ligand induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J.* 10:2849-2854.
- Bellot F. (1994) A family of tyrosine kinase receptors for fibroblast growth factors. *Path. Biol.* 42:561-565.
- Benezra M, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G, Bar-Shavit R. (1993) Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 81:3324-3331.
- Benezra M, Ben-Sasson S, Regan J, Chang M, Bar-Shavit R, Vlodavsky I. (1994) Antiproliferative activity towards vascular smooth muscle cells and receptor binding of

- heparin-mimicking anionic aromatic compounds. *Arteriosclerosis and Throm.* 14:1989-1992.
- Bernfield M, Kokennyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo R, Lose EJ. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulphate proteoglycans. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 8:365-398.
- Besser D, Presta M, Nagamine Y. (1995) Elucidation of a signaling pathways induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth Diff.* 6:1009-1017.
- Blenis J. (1993) Signal transduction via MAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5889-5892.
- Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber JP, Teissie J, Amalric F. (1987) Basic fibroblast growth factor 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.
- Bouche G, Baldin V, Belenger P, Prats H, Amalric F. (1994) Activation of rDNA transcription by FGF-2: key role of protein kinase CKII. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:547-554.
- Boulle N, Jones EM, Auguste P, Baird A. (1995) Adenosine diphosphate ribosylation of fibroblast growth factor-2. *Mol. Endocrinol.* 9:767-775.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brauer PR, Keller KM, Keller JM. (1990) Concurrent reduction in the sulfation of heparan sulfate and basement membrane assembly in a cell model system. *Development* 110:805-813.
- Bravo R, Franck R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. (1987) Cyclin-PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature* 326:515-517.
- Briozzo P, Badet J, Capony F, Pieri I, Montcourrier P, Barritault D, Rochefort H. (1991) MCF-7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. *Exp. Cell Res.* 194:252-259.
- Brown KJ, Hendry IA, Parish CR. (1995) Acidic and basic fibroblast growth factor bind with differing affinity to the same heparan sulfate proteoglycan on BALB/c3T3 cells: implications for potentiation of growth factor action by heparin. *J. Cell. Biochem.* 58:6-14.
- Brugal G. (1984) Image analysis of microscopic preparations. In: *Methods and achievements in experimental pathology*. Jasmin G, Proschek L. (eds). Karger Basel, pp 1-33.
- Brugal G. (1989). Place de la microscopie quantitative. In: *Marqueurs tumoraux*. Masson (eds). Paris, pp 111-128.

- Brunner G, Gabrilove J, Rifkin DB, Wilson ET. (1991) Phospholipase C release of basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biologically active complex with a phosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell Biol.* 114:1275-1283.
- Brunner G, Metz C, Nguyen H, Gabrilove J, Patel S, Davitz MA, Rifkin DB, Wilson ET. (1994) An endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D releases basic fibroblast growth factor-heparan sulfate proteoglycan complexes from human bone marrow cultures. *Blood* 83:2115-2125.
- Buee L, Boyle NJ, Zhang L, Delacourte A, Filit HM. (1991) Optimization of an Alcian blue dot-blot assay for the detection of glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal. Biochem.* 195:238-242.
- Burgess WH, Maciag T. (1989) The heparin-binding fibroblast growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:575-606.
- Burgess WH, Shaheen AM, Ravera M, Jaye M, Donohue PJ, Winkles JA. (1990) Possible dissociation of the heparin binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 from its receptor binding activities by site directed mutagenesis of a single lysine residues. *J. Cell Biol.* 111:2129-2138.
- Burus LW, Zubzer E, Lueddecke BA, Olwin BB. (1992) Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 12:5600-5609.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ. (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 53:661-674.
- Campbell JS, Wenderoth MP, Hauschka SD, Krebs EG. (1995) Differential activation of mitogen-activated protein kinase in response to basic fibroblast growth factor in skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:870-874.
- Carey DJ. (1991) Biological functions of proteoglycans: use of specific inhibitors of proteoglycans synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* 104:21-28.
- Caron de Fromentel C, Nardeux PC, Soussi T, Lavielle C, Estrade S, Carloni G, Chandrasekaran K, Cassingena R. (1985) Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp. Cell. Res.* 160:83-94.
- Caux F, Timar J, Vigny M, Moczar M. (1992) Heparan sulfate synthesized by human melanoma cell variants. *Cancer J.* 5:111-117.
- Celis JE, Madsen P, Celis A. (1987) Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase α) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett.* 220:1-7.
- Chandrasekaran EV, Davidson EA. (1979) Glycosaminoglycans of normal and malignant cultured human mammary cells. *Cancer Res.* 39:870-880.
- Chellaiah A, McEwen DG, Werner S, Xu J, Ornitz DM. (1994) Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3. Alternative splicing in Ig-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J. Biol. Chem.* 269:11620-11627.

- Cheon HG, LaRochelle WJ, Bottaro DP, Burgess WH, Aaronson SA. (1994) High affinity binding sites for related fibroblast growth factor ligands reside within different receptor Ig-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:989-993.
- Chernousov MA, Carey DJ. (1993) N-syndecan (syndecan-3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 268:16810-16814.
- Chintala SK, Miller RR, McDevitt CA. (1995) Role of heparan sulfate in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:227-234.
- Coleman-Kmacik S, Rosen JM. (1994) Differential temporal and spatial gene expression of fibroblast growth factor family members during mouse mammary gland development. *Mol. Endocrinol.* 8:218-229.
- Coltrini D, Rusnati M, Zoppetti G, Oreste P, Isacchi A, Caccia P, Bergonzoni L, Presta M. (1993) Biochemical bases of the interaction of human basic fibroblast growth factor with glycosaminoglycans. New insights from trypsin digestion studies. *Eur. J. Biochem.* 214:51-58.
- Costantino A, Milazzo G, Giorgino F, Russo P, Goldfine ID, Vigneri R, Belfiore A. (1993) Insulin-resistant MDA-MB-231 human breast cancer cells contain a tyrosine kinase inhibiting activity. *Mol. Endocrinol.* 7:1667-1676.
- Cooper DNW, Barondes SH. (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* 110:1681-1691.
- Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. (1990) Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab. Investigation* 63:832-840.
- Crabb JW, Armes LG, Carr SA, Johnson CM, Roberts GD, Bordoli RS, Mc Keenan WL. (1985) Complete primary structure of prostatropin, a prostate epithelial cell growth factor. *Biochem.* 25:4988-4993.
- Daly RJ, King RJB, Darbre PD. (1988) Interaction of growth factors during progression toward steroid independence in T47D human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 43:199-211.
- D'Amore PA. (1990) Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer Metas. Rev.* 9:227-238.
- David G, Bernfield M. (1982) Defective basal lamina formation by transformed mammary epithelial cells: a reduced effect of collagen on basal lamina (heparan sulfate-rich) proteoglycan degradation. *J. Cell. Physiol.* 110:56-62.
- David G, Van Den Berghe H. (1983) Transformed mouse mammary epithelial cells synthesize undersulfated basement membrane proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 258:7338-7344.
- David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Casiman JJ, Van Den Berghe H. (1990) Molecular cloning of a phosphatidyl inositol-anchored membrane heparan sulphate proteoglycan from human lung fibroblasts. *J. Cell Biol.* 111:3165-3176.

- Delehedde M. (1992) Etude quantitative du comportement prolifératif des cellules épithéliales en culture *in vitro*. Mémoire de DEA, Lille.
- Delehedde M, Boilly B, Hondermarck H. (1995) Differential responsiveness of human breast cancer cells to basic fibroblast growth factor. A cell kinetics study. *Oncology Res.* 7:399-405.
- 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.
- Descamps S. (1995) Mise en évidence de l'effet du NGF et détection de ses récepteurs sur les cellules épithéliales mammaires humaines normales et cancéreuses. Mémoire de DEA, Lille.
- Dickson RB, Johnson MD, Bano M, Shi E, Kurebayashi J, Ziff B, Martinez-Lacaci I, Amundadottir L, Lippman ME. (1992) Growth factors in breast cancer: mitogenesis to transformation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43:69-78.
- Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J. (1990) Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J.* 9:2685-2692.
- Doctrow SR, Folkman J. (1987) Protein kinase C activators suppress stimulation of capillary endothelial cell growth by angiogenic endothelial mitogens. *J. Cell Biol.* 104:679-687.
- Dolbeare F. (1995) Bromodeoxyuridine (BrdU): a diagnostic tool in biology and medicine. Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem. J.* 27:239-369.
- Dono R, Zeller R. (1994) Cell-type specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. *Dev. Biol.* 163:316-330.
- Duan DSR, Werner S, Williams LT. (1992) A naturally occurring secreted form of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 binds basic FGF in preference over acidic FGF. *J. Biol. Chem.* 267:16076-16080.
- Durchrow M, Gerdes J, Schlüter C. (1994) The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell. Prolif.* 27:235-242.
- El Yazidi I, Boilly-Marer Y. (1995) Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res.* 15:1-8.
- Elenius K, Maatta A, Salmivirta M, Jalkanen M. (1992) Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan. *J. Biol. Chem.* 267:6435-6441.
- Elenius K, Jalkanen M. (1994) Functions of the syndecans-a family of cell surface proteoglycans. *J. Cell Science* 107:2975-2982.

- Emerman JT, Jones N, Fiedler EE. (1988) Glycosaminoglycan accumulation by normal and malignant human mammary epithelial cells in primary culture. *Biochem. Cell Biol.* 66:309-318.
- Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy R, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R. (1985) Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6507-6511.
- Esko JD, Rostand KS, Weinke JL. (1988) Tumor formation dependent on proteoglycan biosynthesis. *Science* 241:1092-1096.
- Esko JD. (1991) Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr. Opinion Cell Biol.* 3:805-816.
- Faassen AE, Mooradian DL, Tranquillo RT, Dickinson RB, Letourneau PC, Oegema TR, McCarthy JB. (1993) Cell surface CD-44 related chondroitin sulfate proteoglycan is required for transforming growth factorb stimulated mouse melanoma cell motility and invasive behavior on type I collagen. *J. Cell Science* 105:501-511.
- Fang W, Hartman N, Chow DT, Riegel AT, Wellstein A. (1992) Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J. Biol. Chem.* 267:25889-25897.
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. (1993) Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62:453-481.
- Farley JR, Nakayama G, Cryns D, Segel IH. (1978) Adenosine triphosphate sulfurylase from *penicillin chryogenum equilibrium* binding, substrate hydrolysis, and isotope exchange studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 185:376-390.
- Fedarko NS, Conrad HE. (1986) A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cell. *J. Cell Biol.* 102:587-599.
- Feige JJ, Baird A. (1989) Basic fibroblast growth factor is a substrat 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. (1989) 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.
- Fernig DG, Smith JA, Rudland PS. (1990) Appearance of basic fibroblast growth factor receptors upon differentiation of rat mammary epithelial to myoepithelial-like cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 142:108-116.
- Fernig DG, Rudland PS, Smith JA. (1992) Rat mammary myoepithelial-like cells in culture possess kinetically distinct low-affinity receptors for fibroblast growth factor that modulate growth stimulatory responses. *Growth factors* 7:27-39.
- Fernig DG, Barraclough R, Ke Y, Wilkinson MC, Rudland PS, Smith JA. (1993) Ectopic production of heparin-binding growth factors and receptors for basic fibroblast growth

- factor by rat mammary epithelial cell lines derived from malignant metastatic tumours. *Int. J. Cancer* 54:629-635.
- Fernig DG, Gallagher JT. (1994) Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.* 5: 353-377.
- Fernandez-Borja M, Bellido D, Makiya R, David G, Olivecrona G, Reina M, Vilaro S. (1995) Actin cytoskeleton of fibroblasts organizes surface proteoglycans that bind basic fibroblast growth factor and lipoprotein lipase. *Cell Motility Cytoskel.* 30:89-107.
- Feulgen R, Rosenbeck H. (1924) Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Physiol. Chem.* 135:203-248.
- Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron T, Aaronson SA. (1989) Human KGF is FGF related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 241:752-755.
- Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O, Rifkin DB. (1989) Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* 140:75-81.
- Flaumenhaft R, Moscatelli D, Rifkin DB. (1990) Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 111:1651-1659.
- Florkiewicz RZ, Sommer A. (1989) The human bFGF gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non ATG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3978-3981.
- Folkman J, Klagsbrun M. (1987) Angiogenic factors. *Science* 235:442-447.
- Fox GM, Schiffer SG, Rohde MF, Tsai LB, Banks AR, Arakawa T. (1988) Production, biological activity and structure of recombinant basic fibroblast growth factor and an analog with cysteine replaced by serine. *J. Biol. Chem.* 263:18452-18458.
- Fransson LA, Sjöberg I. (1981) Copolymeric glycosaminoglycans in transformed cells. *J. Biol. Chem.* 256:13044-13047.
- Fransson LA, Carlstedt I, Coster L, Malmstrom A. (1983) Proteoheparan sulfate from human skin fibroblasts. Evidence for self-interaction via the heparan sulfate side chains. *J. Biol. Chem.* 258:14342-14345.
- Fritze L, Reilly CF, Rosenberg RD. (1985) An antiproliferative heparan sulfate species produced by postconfluent smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 100:1041-1049.
- Gallagher JT, Walker A, Lyon M, Evans WH. (1988) Heparan sulphate degrading endoglycosidase in liver plasma membranes. *Biochem. J.* 250:719-726.
- Gallagher JT, Turnbull JE, Lyon M. (1990) Heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. Soc. Trans.* 18:207-209.

- Gallagher JT, Turnbull JE, Lyon M. (1992) Patterns of sulphation in heparan sulphate: polymorphism based on a common structural theme. *Int. J. Biochem.* 24:553-560.
- Gallagher JT. (1994) Heparan sulphates as membrane receptors for fibroblast growth factors. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32:239-247.
- Gannoun-Zaki L, Pieri I, Badet J, Moenner M, Barritault D. (1991) Internalisation of basic fibroblast growth factor by chinese hamster lung fibroblast cells: involvement of several pathways. *Exp. Cell Res.* 197:272-279.
- Gannoun-Zaki L, Pieri I, Badet J, Barritault D. (1994) Interaction of basic fibroblast growth factor with nonresponsive HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 213:375-382.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31:13-20.
- Giroud F. (1982) Cell nucleus pattern analysis: geometric and densitometric featuring, automatic cell phase identification. *Biol. Cell* 44:177-188.
- Giroud F. (1987) Approches cytométriques de la prolifération et de la différenciation: notion de faciès chromatinien. Thèse de Doctorat.
- Gomm JJ, Smith J, Ryall GK, Baillie R, Turnbull L, Coombes RC. (1991) Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β 1 in the human mammary gland. *Cancer Res.* 51:4685-4692.
- Gospodarowicz D. (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effects alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249:123-127.
- Gospodarowicz D, Cheng J. (1986) Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell. Physiol.* 128:475-484.
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Rev.* 8:95-114.
- Gratzner HG. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474-475.
- Greve H, Cully Z, Blumberg P, Kresse H. (1988) Influence of chlorate on proteoglycan biosynthesis by cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263:12886-12892.
- Gualandris A, Urbinati C, Rusnati M, Ziche M, Presta M. (1994) Interaction of high molecular-weight basic fibroblast growth factor with endothelium: biological activity and intracellular fate of human recombinant Mr 24.000 bFGF. *J. Cell. Physiol.* 161:149-159.
- Guelstein VI, Tchypysheva TA, Ermilova VD, Ljubimov AV. (1993) Myoepithelial and basement membrane antigens in benign and malignant human breast tumors. *Int. J. Cancer* 53:267-277.
- Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC. (1993) Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. *J. Biol. Chem.* 268:23906-23914.

- Habuchi H, Suzuki S, Saito T, Harada T, Yoshida K, Kimata K. (1992) Structure of heparan oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor. *Biochem. J.* 285:805-813.
- Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O, Yoshida T, Sugimura T, Terada M. (1990) K-sam, an amplified gene in stomach cancer is a member of the heparin binding growth factor receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5983-5987.
- Hawker JR, Granger HJ. (1994) Tyrosine kinase inhibitors impair fibroblast growth factor signaling in coronary endothelial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 266:H107-H120.
- Heath WF, Cantrell AS, Mayne NG, Jaskunas SR. (1991) Mutations in the heparin binding domains of human basic fibroblast growth factor alter its biological activity. *Biochemistry* 30:5608-5615.
- 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, Ledoux D, Blanckaert V, Barritault D, Boilly B. (1990b) Evidence of high and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor in mouse placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:272-281.
- Hondermarck H, Courty J, Dauchel MC, Barritault D, Boilly B. (1992a) High and low affinity membrane binding sites for fibroblast growth factors in the developing chick brain. *Neuroscience Lett.* 134:247-248.
- Hondermarck H, Deudon E, Boilly B. (1992b) Embryonic brain-derived heparan sulfate inhibits cellular membrane binding and biological activity of basic fibroblast growth factor. *Dev. Brain Res.* 68:247-253.
- Hondermarck H, McLaughlin CS, Patterson SD, Bradshaw RA. (1994) Early changes in protein synthesis induced by basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, and epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9377-9381.
- Hou J, McKeehan K, Kan M, Carr SA, Huddleston MJ, Crabb JW, McKeehan WL. (1993) Identification of tyrosines 154 and 307 in the extracellular domain and 653 and 766 in the intracellular domain as phosphorylation sites in the heparin-binding fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase (*flg*). *Protein Science* 2:86-92.
- Hovingh P, Piepkorn M, Linker A. (1993) Differentially expressed patterns of glycosaminoglycan structure in heparan sulfate proteoglycans and free chains. *Eur. J. Biochem.* 211:771-779.
- Humphries DE, Silbert JE. (1988) Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154:365-371.
- Imagawa W, Cunha GR, Young P, Nandi S. (1994) Keratinocyte growth factor and acidic fibroblast growth factor are mitogens for primary cultures of mammary epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:1165-1169.

- Imai Y, Yanagishita M, Hascall VC. (1994) Measurement of contribution from intracellular cysteine to sulfate in phosphoadenosine phosphate in rat ovarian granulosa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 312:392-400.
- Iozzo RV. (1987) Turnover of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. A quantitative biochemical and autoradiographic study. *J. Biol. Chem.* 262:1888-1900.
- Iozzo RV. (1988) Proteoglycans and neoplasia. *Cancer Metastasis Rev.* 7:39-50.
- Iozzo RV, Cohen IR, Grässel S, Murdoch AD. (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.* 302:625-639.
- Ishai-Michaeli R, Eldor A, Vlodaysky I. (1990) Heparanase activity expressed by platelet, neutrophils and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell. Regul.* 1:833-842.
- Ishai-Michaeli R, Svahn CM, Weber M, Chajek-Shaul T, Korner G, Ekre HP, Vlodaysky I. (1992) Importance of size and sulfation of heparin in release of basic fibroblast growth factor from the vascular endothelium and extracellular matrix. *Biochemistry* 31:2080-2088.
- Ishihara M, Tyrrell DJ, Stauber GB, Brown S, Cousens LS, Stack RJ. (1993a) Preparation of affinity-fractionated, heparin-derived oligosaccharides and their effects on selected biological activities mediated by basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 268:4675-4683.
- Ishihara M, Guo Y, Swiedler SJ. (1993b) Selective impairment of basic fibroblast growth factor binding domains of heparan sulphate in a COS cell mutant defective in N-sulphotransferase. *Glycobiology* 3:83-88.
- Ishihara M, Shaklee PN, Yang Z, Liang W, Wei Z, Stack RJ, Holme K. (1994a) Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor. *Glycobiology* 4:451-458.
- Ishihara M. (1994b) Structural requirements in heparin for binding and activation of FGF-1 and FGF-4 are different from that FGF-2. *Glycobiology* 4:817-824.
- Itoh H, Hattorei Y, Sakamoto H, Kishi T, Sasaki H, Yoshida T, Koono M, Sugugimura T, Terada M. (1994) Preferential alternative splicing in cancer generates a K-sam messenger RNA with higher transforming activity. *Cancer Res.* 54:3237-3241.
- Iwamoto M, Shimazu A, Nakashima K, Suzuki F, Kato Y. (1991) Reduction in basic fibroblast growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 266:461-467.
- Jackson RL, Bush ST, Cardin AD. (1991) Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and roles in physiological processes. *Physiol. Rev.* 71:481-539.

- Jacquemier J, Adelaide J, Parc P, Penault-Llorca F, Planche J, DeLapeyriere O, Birnbaum D. (1994) Expression of the FGFR1 gene in human breast-cancer cells. *Int. J. Cancer* 59:373-378.
- Jalkanen M, Nguyen H, Rapraeger A, Kurn N, Bernfield M. (1985) Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells: localisation on the cell surface with a monoclonal antibody. *J. Cell Biol.* 101:976-984.
- Jandik KA, Gu K, Linhardt RJ. (1994) Action pattern of polysaccharide lyases on glycosaminoglycans. *Glycobiology* 4:289-296.
- Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera M, 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.
- Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. (1992) Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: Molecular analysis and signal transduction. *Biochem. Biophys. Acta.* 1135:185-199.
- Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT. (1990) Diverse forms of receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 10:4728-4736.
- Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, Williams LT. (1991) The human fibroblast growth factor receptor genes. A common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* 11:4627-4634.
- Johnson DE, Williams LT. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60:1-41.
- Johnson GR, Wong L. (1994) Heparan sulfate is essential to amphiregulin-induced mitogenic signaling by the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 269:27149-27154.
- Kaibuchi KT, Tsuda A, Kibuchi A, Tanimoto T, Yamashita T, Yakai Y. (1986) Possible involvement of protein kinase C and calcium ion in growth factor induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261:1187-1192.
- Kan M, Wang F, Crabb JW, Hou J, McKeehan WL. (1993) An essential heparin binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* 259:1918-1921.
- Karey KP, Sirbasku DA. (1988) Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 β -estradiol. *Cancer Res.* 48:4083-4092.
- Kato M, Wang H, Berfield M, Gallagher JT, Turnbull JE. (1994) Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains. *J. Biol. Chem.* 269:1881-1890.
- Ke YQ, Fernig DG, Wilkinson MC, Winstanley JHR, Smith JA, Rudland PS, Barraclough R. (1993) The expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in cell lines

- derived from normal human mammary gland and a benign mammary lesion. *J. Cell Sci.* 106:135-143.
- Keller KM, Brauer PR, Keller JM. (1989) Modulation of cell surface heparan sulfate structure by growth of cells in the presence of chlorate. *Biochemistry* 28:8100-8107.
- Kiefer MC, Stephans JC, Crawford K, Okino K, Barr PJ. (1990) Ligand affinity cloning structure of a cell surface heparan sulfate proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6985-6989.
- Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell, tissue, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell* 5:797-805.
- Kinsella MG, Wight TN. (1986) Modulation of sulfate proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration. *J. Cell. Biol.* 102:679-687.
- Kjellen L, Lindahl U. (1991) Proteoglycans: Structure and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 60:443-475.
- Klagsbrun M, Baird A. (1991) A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67:229-231.
- Kobrin MS, Yamanaka Y, Friess H, Lopez M, Korc M. (1993) Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res.* 53:4741-4744.
- Kokenyesi R, Bernfield M. (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J. Biol. Chem.* 267:4870-4877.
- Koos RD, Banks PK, Inkster SE, Yue W, Brodie AMH. (1993) Detection of aromatase and keratinocyte growth factor expression in breast tumors using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 45:217-225.
- Kubbutat MHG, Gerdes J, Key G. (1994) New antibodies for the detection of the Ki-67 protein. In: *Prospect in diagnosis and treatment of breast cancer*. Schmidt M. (eds). pp 39-45.
- Kudla AJ, John ML, Bowen-Pope DF, Rainish B, Olwin BB. (1995) A requirement for fibroblast growth factor in regulation of skeletal muscle growth and differentiation cannot be replaced by activation of platelet-derived growth factor signalling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 15:3238-3246.
- Küng W, David F, Langen H, Weyer KA, Schlaeger EJ, Lahm HW, Silber E, Mueller H, Eppenberger U. (1994) Isolation of a heregulin-like growth factor secreted by estrogen receptor negative MDA-MB-231 human breast cancer cells that stimulates estrogen receptor-positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:1357-1365.
- Kurebayashi J, McLesley SW, Johnson MD, Lippman ME, Dickson RB, Kern FG. (1993) Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer

- cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and *LacZ*. *Cancer Res.* 53: 2178-2187.
- Kurobe M, Takei Y, Ezawa H, Hayashi K. (1993) Increased level of basic fibroblast growth factor (bFGF) in sera of patients with malignant tumors. *Horm. Metab. Res.* 25:395-396.
- Lallemain G. (1994) Deciphering the MAP kinase pathways. *Prog. Growth Factor Res.* 5:291-334.
- Lapis K, Timar J, Jeney A. (1992) Proteoglycans as target in the therapy of metastasis. In: *Metastasis: Basic research and its clinical applications*. Rabes H, Peters PE, Munk K. (eds). pp 176-184.
- Lee EH, Lee WH, Kaetzel CS, Parry G, Bissell MJ. (1985) Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1419-1423.
- Lehtola L, Partanen J, Sistonen L, Korhonen J, Warri A, Harkonen P, Clarke R, Alitalo K. (1992) Analysis of tyrosine kinase mRNAs including four FGF receptor mRNAs expressed in MCF7 breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 50:598-603.
- Leppa S, Mali M, Miettinen HM, Jalkanen M. (1992) Syndecan expression regulates cell morphology and growth of mouse mammary epithelial tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:932-936.
- Levy-Young BK, Imagawa DR, Wallace DR, Nandi S. (1989) Basic fibroblast growth factor stimulates the growth and inhibits casein accumulation in mouse mammary epithelial cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 62:327-336.
- Li LY, Safran M, Aviezer D, Böhlen P, Seddon AP, Yayon A. (1994a) Diminished heparin binding of a basic fibroblast growth factor mutant is associated with reduced receptor binding, mitogenesis, plasminogen activator induction and in vitro angiogenesis. *Biochemistry* 33:10999-11007.
- Li Y, Basilico C, Mansukhani A. (1994b) Cell transformation by fibroblast growth factors can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.* 14:7660-7669.
- Lidereau R, Callahan R, Dickson C, Peters G, Escot C, Ali IU. (1988) Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res.* 2:285-291.
- Lindahl U. (1989) Biosynthesis of heparin and related polysaccharides. In: *Heparin, chemical and biological properties, clinical applications*. Lane D.A, Lindahl, U. (eds). London. pp 159-189.
- Lindahl U, Kjellen L. (1991) Heparin or heparan-What is the difference ? *Thromb. Haemostasis* 66:44-48.
- Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. (1992) Clinical applications of morphologic and immunocytological assessments of cell proliferation. *Am. J. Clin. Path.* 97:S4-S13.

- Lippman ME, Dickson RB. (1989) Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Rec. Progr. Horm. Res.* 45:383-440.
- Liu L, Pasumarthi KBS, Padua RR, Massaelli H, Fandrich RR, Pierce GN, Cattini PA, Kardami E. (1995) Adult cardiomyocytes express functional high affinity receptors for basic fibroblast growth factor. *Am. J. Physiol.* 268:H1927-H1938.
- Lobb RR. (1988) Clinical applications of heparin binding growth factors. *Eur. J. Clin. Invest.* 18:321-336.
- Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan a component of the TGF β receptor system. *Cell* 67:785-795.
- Losa GA, Alini M. (1993) Sulfated proteoglycans in the extracellular matrix of human breast tissues with infiltrating carcinoma. *Int. J. Cancer* 54:552-557.
- Luqmani YA, Graham M, Coombes RC. (1992) Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR-1 and FGFR-2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer* 66:273-280.
- Lyle S, Geller DH, Ng K, Westley J, Schwartz NB. (1994) Kinetic mechanism of ATP-sulphurylase from rat chondrosarcoma. *Biochem. J.* 301:349-354.
- Maccarana M, Casu B, Lindahl U. (1993) Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of bFGF. *J. Biol. Chem.* 268:23898-23905.
- Mach H, Volkin DB, Burke CJ, Middaugh CR, Lindhardt RJ, Fromm JR, Loganathan D, Mattsson L. (1993) Nature of interaction with aFGF. *Biochemistry* 32:5480-5489.
- McKeehan WL, Kan M. (1994) Heparan sulfate fibroblast growth factor receptor complex: structure-function relationships. *Mol. Rep. Dev.* 39:69-82.
- McLesley SW, Kurebayashi J, Honig SF, Zwiebel J, Lippman ME, Dickson RB, Kern FG. (1993) Fibroblast growth factor 4 transfection of MCF-7 cells produces cell lines that are tumorigenic and metastatic in ovariectomized or tamoxifen-treated athymic nude mice. *Cancer Res.* 53: 2168-2177.
- McLesley SW, Dingivan YF, Lippman ME, Kern FG. (1994) MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res.* 54:523-530.
- McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder D, D'Amore PA. (1989) Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J. Cell Biol.* 109:811-822.
- McNicol AM, Muslin AJ, Williams LT. (1993) Raf-1 kinase is essential for early *Xenopus* development and mediates the induction of mesoderm by FGF. *Cell* 73:571-583.
- Mali M, Elenius K, Miettinen HM, Jalkanen M. (1993) Inhibition of basic FGF-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1. *J. Biol. Chem.* 268:24215-24222.
- Mali M, Andtfolk H, Miettinen HM, Jalkanen M. (1994) Suppression of tumor cell growth by syndecan-1 ectodomain. *J. Biol. Chem.* 269:27795-27798.

- Mangakis N, Serht B, Mangakis P, Bowe E, Kleemann I. (1990) Determining the degree of malignancy of individual cases of mammary carcinoma on the basis of clinical, morphological and biochemical parameters. *Bull. Cancer* 77:235-242.
- Mansukhani A, Dellera P, Moscatelli D, Kornbluth S, Hanafusa H, Basilico C. (1992) Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor-activation by 3 members of the FGF family and requirement for heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3305-3309.
- Marics I, Adelaide J, Raybaud F, Mattei MG, Coulier F, Planche J, DeLapeyriere O, Birnbaum D. (1989) Characterization of the HST-related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene* 4:335-340.
- Mason IJ. (1994) The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell* 78: 547-552.
- Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, Shows TB. (1986) The genes for basic and acidic fibroblast growth factor are on different human chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:644-651.
- Meyers SL, Dudley JP. (1992) Sequence analysis of the int-2/fgf-3 gene in aggressive human breast carcinomas. *Mol. Carcinog.* 6:243-251.
- Miao HQ, Esko JD, Fritz TA, Yayon A, Vlodaysky I. (1995) Heparan sulfate primed on β -D-xylosides restores binding of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biochem.* 57:173-184.
- Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence is released by cells via a pathways independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J. Cell. Physiol.* 151:81-93.
- Miki T, Flemming TP, Bottaro DP, Rubin JS, Ron D, Aaronson SA. (1991) Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science* 251:72-75.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121:2228-2234.
- Miyamoto M, Naruo K, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T. (1993) Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family which has a unique secretion property. *Mol. Cell. Biol.* 13:4251-4259.
- Moczar M, Caux F, Bailly M, Berthier O, Doré JF. (1993) Accumulation of heparan sulfate in the culture of human melanoma cells with different metastatic ability. *Clin. Exp. Metastasis* 11:462-471.
- Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, Fisher R, Bellot F, Li W, Dionne CA, Jaye M, Rubinstein M, Schlessinger J. (1991) A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phosphorylase C γ . *Mol. Cell. Biol.* 11:5068-5078.
- Mohammadi M, Dionne CA, Li W, Honegger AM, Jaye M, Schlessinger J. (1992) Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature* 358:681-684.

- Moore R, Casey G, Brookes S, Dixon M, Peters G, Dickson C. (1986) Sequence, topography and protein coding potential of mouse int-2: a putative oncogene activated by mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* 5:919-924.
- Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB. (1986) Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell proteases production, DNA synthesis and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2091-2095.
- Moscatelli D. (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 131:123-130.
- Moscatelli D. (1992) Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. *J. Biol. Chem.* 267:25803-25809.
- Mueller H, Loop P, Liu R, Wosikowski K, Kueng W, Eppenberger U. (1994) Differential signal transduction of epidermal growth factor receptors in hormone dependent and hormone-independent human breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 221:631-637.
- Musgrove EA, Sutherland RL. (1993) Acute effects on growth factors on T-47D breast cancer cell cycle progression. *Eur. J. Cancer* 29:2273-2279.
- Nakajima M, Irimura T, Nicolson GL. (1988) Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.* 36:157-167.
- Nakanishi Y, Kihara K, Mizuno K, Masmume Y, Yoshitake Y, Nishikawa K. (1992) Direct effect of basic fibroblast growth factor on gene transcription in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5216-5220.
- Nanberg E, Morris C, Higgins T, Vara F, Ronsengurt E. (1990) Fibroblast growth factor stimulates protein kinase C in quiescent 3T3 cells without calcium mobilization or inositol phosphate accumulation. *J. Cell. Physiol.* 143:232-242.
- New BA, Yeoman LC. (1992) Identification of basic fibroblast growth factor sensitivity and receptor and ligand expression in human colon tumors cells. *J. Cell. Physiol.* 150:320-326.
- Nugent MA, Edelman ER. (1992) Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 31:8876-8883.
- Nugent MA, Karnovsky MJ, Edelman ER. (1993) Vascular cell-derived heparan sulfate shows coupled inhibition of basic fibroblast growth factor binding and mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation Res.* 73:1051-1060.
- Nurcombe V, Ford MD, Wildshut J, Bartlett PF. (1993) Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* 230:103-106.
- Olsen EB, Trier K, Eldov K, Ammitzboll T. (1988) Glycosaminoglycans in human breast cancer. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 67:539-542.

- 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. (1989) Fibroblast growth factor receptor levels decrease during chick embryogenesis. *J. Cell Biol.* 110:503-509.
- Olwin BB, Rapraeger A. (1992) Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. *J. Cell Biol.* 118:631-639.
- Olwin BB, Arthur K, Hannon K, Hein P, McFall A, Riley B, Szebenyl G, Zhou Z, Zuber ME, Rapraeger AC, Fallon JF, Kudla AJ. (1994) Role of FGFs in skeletal muscle and limb development. *Mol. Rep. Dev.* 39:90-101.
- Ornitz D, Yayon A, Flanagan J, Scahn C, Levi E, Leder P. (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell Biol.* 12:240-247.
- Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, Givol D, Lonai P. (1993) Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2). *Dev. Biol.* 158:475-486.
- Pages G, Lenormand P, Lallemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8319-8322.
- Pantaliano MW, Horlick RA, Springer BA, Van Dick DE, Tobery T, Wetmore DR, Lear JD, Nahapetian AT, Bradley JD, Sisk WP. (1994) Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry* 33:10229-10248.
- Parry G, Lee EYH, Farson D, Koval M, Bissel MJ. (1985) Collagenous substrata regulate the nature and distribution of glycosaminoglycans produced by differentiated cultures of mouse mammary epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 156:487-499.
- Partanen J, Vainikka S, Alitalo K. (1993) Structural and functional specificity of FGF receptors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 340:297-303.
- Patry V, Arnaud E, Amalric F, Prats H. (1994) Involvement of basic fibroblast growth factor NH₂ terminus in nuclear accumulation. *Growth Factors* 11:163-174.
- Patstone G, Pasquale EB, Maher PA. (1993) Different members of the fibroblast growth factor receptor family are specific to distinct cell types in the developing chicken embryo. *Dev. Biol.* 155:107-123.
- Pejler G, David G. (1987) Basement membrane heparan sulfate with high affinity for antithrombin synthesized by normal and transformed mouse mammary epithelial cells. *Biochem. J.* 248:69-77.
- Penault-Llorca F, Bertucci F, Adelaide J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D, DeLapeyriere O. (1995) Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 61:170-176.

- Peters KG, Marie J, Wilson E, Ives HE, Escobedo J, Del Rosario M, Mirda D, Williams LT. (1992) Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca₂⁺ flux but not mitogenesis. *Nature* 358:678-681.
- Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissel MJ. (1992) Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9064-9068.
- Peyrat JP, Hondermarck H, Louchez MM, Boilly B. (1991) Demonstration of basic fibroblast growth factor binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer Commun.* 3:323-329.
- Peyrat JP, Bonnetterre J, Hondermarck H, Hecquet B, Adenis A, Louchez MM, Lefebvre J, Boilly B, Demaille A. (1992) Basic fibroblast growth factor: mitogenic activity and binding sites in human breast cancer. *J. Steroid Biochem. Biol.* 43:87-94.
- Piedagnel R, Prie D, Cassingena R, Ronco PM, Lelongt B. (1994) SV40 Large-T oncogene inhibits transcription of perlecan-related proteoglycans but stimulates hyaluronan synthesis in a temperature-sensitive renal tubule principal cell line. *J. Biol. Chem.* 269:17469-17476.
- Piepkorn M, Hovingh P, Linker A. (1991) Proteoglycan and glycosaminoglycan free chain expression in keratinocytes, endothelium and mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:1281-1288.
- Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalou P, Tauber JP, Almaric F, Smith JA, Caput D. (1989) High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1836-1840.
- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* 326:517-520.
- Presta M, Maier JM, Ragnotti GM. (1989) The mitogenic signalling pathways but not the plasminogen activator inducing pathways 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, Statuto M, Isacchi A, Caccia P, Pozzi A, Gualandris A, Rusnati M, Bergonzoni L, Sarmientos P. (1992) Structure-function relationship of basic fibroblast growth factor: site-directed mutagenesis of a putative heparin-binding and receptor-binding region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:1098-1107.
- Pretrelski SJ, Fox G, Arakawa T. (1992) Binding of heparin to basic fibroblast growth factor induces a conformational change. *Arch. Biochem. Biophys.* 293:314-319.
- Quarto N, Bouche G, Bugler B, Chailleux C, Prats H, Prats AC, Roman AM, Truchet I, Amalric F. (1993) The basic fibroblast growth factor isoforms: endogenous and

- exogenous behavior. In: Growth factors, peptide and receptors. Moody TW. (eds). New York, pp 147-158.
- Quarto N, Amalric F. (1994) Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signalling. *J. Cell Science* 107:3201-3212.
- Rapraeger A, Bernfield M. (1985) Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. Protease release of heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane anchored domain. *J. Biol. Chem.* 260:4103-4109.
- Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E, Koda J, Bernfield M. (1985) The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan glycosinoglycans. *J. Biol. Chem.* 260:11046-11052.
- Rapraeger A, Jalkanen M, Bernfield M. (1986) Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 103:2683-2696.
- Rapraeger A, Yeoman C. (1989) A quantitative solid-phase assay for identifying radiolabeled glycosaminoglycans in crude cell extracts. *Anal. Biochem.* 179:361-365.
- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF mediated fibroblast growth and myogenic differentiation. *Science* 252:1705-1708.
- Reich-Slotky R, Bonneh-Barkay D, Shaoul E, Bluma B, Svahn CM, Ron D. (1994) Differential effect of cell-associated heparan sulfates on the binding of keratinocyte growth factor (KGF) and acidic fibroblast growth factor to the KGF receptor. *J. Biol. Chem.* 269:32279-32285.
- Reiland J, Rapraeger AC. (1993) Heparan sulfate proteoglycan and FGF receptor target basic FGF to different intracellular destinations. *J. Cell Science* 105:1085-1093.
- Revillion F, Vandewalle B, Hornez L, Lefebvre J. (1993) Influence on e-cadherin expression and cell surface heparan sulfate proteoglycan synthesis in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 13:1625-1630.
- Riegel AT, Wellstein A. (1994) The potential role of the heparin-binding growth factor pleiotrophin in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 31:309-314.
- Robinson J, Viti M, Höök M. (1984) Structure and properties of an undersulfated heparan sulfate proteoglycan synthesized by a rat hepatoma cell line. *J. Cell Biol.* 98:946-953.
- Rogelj S, Klagsbrun M, Atzmon R, Kurokawa M, Haimoviz A, Fuks Z, Vlodavsky I. (1989) Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *J. Cell Biol.* 109:823-831.
- Roghani M, Moscatelli D. (1992) Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267:22156-22162.

- Roghani M, Mansukhani A, Dell'Era P, Bellosta P, Basilico C, Moscatelli D. (1994) Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J. Biol. Chem.* 269:3976-3984.
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 9:1503-1510.
- Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson 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, Platt-Higgins AM, Wilkinson MC, Fernig DG. (1993a) Immunocytochemical identification of basic fibroblast growth factor in the developing rat mammary gland: variations in location are dependent on glandular structure and differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* 41:887-898.
- Rudland PS, Platt-Higgins AM, Wilkinson MC, Fernig DG. (1993b) Immunocytochemical identification of cell types in benign and malignant breast diseases: variations in cell markers accompany the malignant state. *J. Histochem. Cytochem.* 41:543-553.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. (1991) Proteoglycans as modulators of growth activities. *Cell* 64:867-869.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y, Hildebrand A, Border WA. (1992) Extracellular matrix/growth factor interactions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 57:309-315.
- Rusnati M, Urbinati C, Presta M. (1993) Internalization of basic fibroblast growth factor in cultured endothelial cells: role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J. Cell. Physiol.* 154:152-161.
- Rusnati M, Coltrini D, Caccia P, Dell'Era P, Zoppetti G, Oreste P, Valsasina B, Presta M. (1994) Distinct role of 2-O-, N-, and 6-O-Sulfate groups of heparin in the formation of the ternary complex with basic fibroblast growth factor and soluble FGF-receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:450-458.
- 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-heparan complexes from endothelial cells by plasminogen activator mediated proteolytic activity. *J. Cell. Biol.* 110:767-775.
- Sakthivel R, Hamdam M, Yang J, Guzman RC, Nandi S. (1993) Effect of TGF alpha on growth of normal human breast epithelial cells in serum free primary culture using 3-dimensional collagen gels. *Cell Biol. Int.* 17:387-397.
- Salmivirta M, Jalkanen M. (1995) Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experientia* 51:863871.

- Sanderson RD, Bernfield M. (1988) Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: Distinct structures on simple and stratified epithelia. *J. Biol. Chem.* 85:9562-9566.
- Sanderson RD, Turnbull JE, Gallagher JT, Lander AD. (1994) Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behaviour. *J. Biol. Chem.* 269:13100-13106.
- Sasaki K, Murakami T, Takahaschi M. (1987) A rapid and simple estimation of cell cycle parameters by continuous labeling with BrdUrd. *Cytometry* 8:526-529.
- Sato Y, Rifkin DB. (1988) Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis and DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 107:1199-1205.
- Sato Y, Murphy PR, Sato R, Friesen HG. (1989) Fibroblast growth factor release by bovine endothelial cells and human astrocytoma cells in culture is density dependent. *Mol. Endocrinol.* 3:744-748.
- Sato B, Kouhara H, Koga M, Kasayama S, Saito H, Sumitani S, Hashimoto K, Kishimoto T, Tanaka A, Matsumoto K. (1993) Androgen-induced growth factor and its receptor: demonstration of the androgen-induced autocrine loop in mouse mammary carcinoma cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 47:91-98.
- Saunders S, Jalkanen M, O'Farrel S, Bernfield M. (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J. Cell Biol.* 108:1547-1565.
- Schmidt A, Buddecke E. (1990) Changes in heparan sulfate structure during transition from the proliferating to the non-dividing state of cultured arterial smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.* 52:229-235.
- Schmidt A, Yoshida K, Buddecke E. (1992a) The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O-sulfated uronic acid residues. *J. Biol. Chem.* 267:19242-19247.
- Schmidt A, Lemming G, Yoshida K, Buddecke E. (1992b) Molecular organisation and proliferative domains of arterial tissue heparan sulfate. *Eur. J. Cell Biol.* 59:322-328.
- Schmidt A, Skaletz-Rorowski A, Breithardt G, Buddecke E. (1995) Growth status-dependent changes of bFGF compartmentalization and heparan sulfate structure in arterial smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.* 67:130-134.
- Schmidtchen A, Fransson LA. (1994) Analysis of heparan-sulphate chains and oligosaccharides from proliferating and quiescent fibroblasts. A proposed model for endoheparanase activity. *Eur. J. Biochem.* 223:211-221.
- Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham J, Fiddes JC, Gospodarowicz D. (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325:257-259.
- Seddon AP, Aviezer D, Li LY, Böhlen P, Yayon A. (1995) Engineering of fibroblast growth factor: alteration of receptor binding specificity. *Biochemistry* 34:731-736.

- Sensenbrenner M. (1993) The neurotrophic activity of fibroblast growth factors. *Prog. Neurol.* 41:683-704.
- Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, Clemmons DR, Chen JC, Roberts CT, LeRoith D, Fontana JA. (1993) Regulation of insulin-like growth factor binding protein 1, 2, 3, 4, 5, and 6: synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* 155:556-567.
- Shi E, Kan M, Xu J, Wang F, Hou J, McKeehan WL. (1993) Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.* 13:3907-3918.
- Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. (1992) Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69:367-374.
- Shiwei L, Plowman GD, Buckley SD, Shipley GD. (1992) Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153:103-111.
- Silberstein GB, Daniel CW. (1982) Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of the developing mouse mammary duct. *Dev. Biol.* 90:215-222.
- Silberstein GB, Strickland P, Coleman S, Daniel CW. (1990) Epithelium-dependent extracellular matrix synthesis in transforming factor- β 1-growth-inhibited mouse mammary gland. *J. Cell Biol.* 110:2209-2219.
- Slack JMW, Darlington BG, Heath JK, Godsave SF. (1987) Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326:197-200.
- Smith J, Yelland A, Baillie R, Coombes RC. (1994) Acidic and basic fibroblast growth factors in human breast tissue. *Eur. J. Cancer* 30:496-503.
- Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. (1994) Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 31:325-335.
- Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan MJ. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* 51:1409-1416.
- Souttou B, Hamelin R, Crepin M. (1994) FGF2 as an autocrine growth factor for immortal human breast epithelial cells. *Cell Growth Diff.* 5:615-623.
- Spivak-Kroizman T, Mohammadi M, Hu P, Jaye M, Schlessinger J, Lax I. (1994a) Point mutation in the fibroblast growth factor receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 269:14419-14423.
- Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. (1994b) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation and cell proliferation. *Cell* 79:1015-1024.

- Springer BA, Pantoliano MW, Barbera FA, Gunyuzlu PL, Thompson LD, Herblin WF, Rosefeld SA, Book GW. (1994) Identification and concerted function of two receptor binding surfaces on basic fibroblast growth factor required for mitogenesis. *J. Biol. Chem.* 269:26879-26884.
- Stewart AJ, Westley BR, May F. (1992) Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br. J. Cancer* 66:640-648.
- Sumitani S, Kasayama S, Sato B. (1993) A role for heparan sulfate in androgen-induced deoxyribonucleic acid synthesis of mouse mammary carcinoma: Shionogi carcinoma 115-derived SC-3 cells. *Endocrinology* 132:1199-1206.
- Sutherland RL, Lee CL, Felman RS, Musgrove EA. (1992) Regulation of breast cancer cell cycle progression by growth factors, steroids and steroids antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41:315-321.
- Takahashi K, Suzuki K, Kawahara S, Ono T. (1989) Growth stimulation of human breast epithelial cells by basic fibroblast growth factor in serum-free medium. *Int. J. Cancer* 43:870-874.
- Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. (1990) Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5710-5714.
- Takei Y, Kurobe M, Uchida A, Hayashi K. (1994) Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in breast cancer. *Clinical Chem.* 40:1980-1981.
- Takeuchi J, Sobue M, Sato E, Shamoto M, Miura K, Nakagaki S. (1976) Variation in glycosaminoglycan components of breast tumors. *Cancer Res.* 36:2133-2139.
- Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, Matsumoto K. (1992) Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependant growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8928-8932.
- Theillet C, Le Roy X, DeLapieyriere O, Grosgeorges J, Adnane J, Raynaud SD, Simony-Lafontaine J, Goldfab M, Escot C, Birnbaum D, Gaudray P. (1989) Amplification of FGF related genes in human tumors : possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene* 4:915-922.
- Theillet C, Adelaide J, Louason G, Bonnet-Dorion F, Jacquemier J, Adnane J, Longy M, Katsaros D, Sismondi P, Gaudray P, Birnbaum D. (1993) FGFR-1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chrom. Cancer* 7:219-226.
- Thompson LD, Pantoliano MW, Springer BA. (1994) Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry* 33:3831-3840.
- Timar J, Moczar E, Timar F, Pal K, Kopper L, Lapis K, Jeney A. (1987) Comparative study on Lewis lung tumor cell lines with low and high metastatic capacity. II:

- Cytochemical and biochemical evidence for differences in glycosaminoglycans. *Clin. Exp. Metastasis* 5:79-87.
- Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB. (1990) Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 110:511-517.
- Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, Gallagher JT. (1992) Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 267:10337-10341.
- Tyrrell DJ, Ishihara M, Rao N, Horne A, Kiefer MC, Stauber GB, Lam LH, Stack RJ. (1993) Structure and biological activities of a heparin-derived hexasaccharide with high affinity for basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 268:4684-4689.
- Tzanakakis GN, Karamamos NK, Hjerpe A. (1995) Effects of glycosaminoglycan synthesis in cultured human mesothelia cells of transforming, epidermal and fibroblast growth factors and their combinations with platelet-derived growth factor. *Exp. Cell Res.* 220:130-137.
- Ueno H, Gunn M, Dell K, Tseng A, William L. (1992) A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 267:1470-1476.
- Ulich TR, Yi E, Cardiff R, Yin S, Bikhazi N, Biltz R, Morris CF, Pierce GF. (1994) Keratinocyte growth factor is a growth factor for mammary epithelium *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 144:862-868.
- Ullrich A, Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212.
- Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Basilico C, Jaye M, Alitalo K. (1992) Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J.* 11:4273-4280.
- Van der Kraan PM, Vitters EL, DeVries BJ, Van den Berg WB, Van de Putte LBA. (1988) Synthesis of aberrant glycosaminoglycans during cartilage culture in sulfate free medium. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 15:273-278.
- Vilgrain I, Baird A. (1991) Phosphorylation of basic fibroblast growth factor by a protein kinase associated with the outer surface of a target cell. *Mol. Endocrinol.* 5:1003-1012.
- Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman 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.
- Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bar-Shavit R, Fuks Z. (1990) Extracellular matrix resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metas. Rev.* 9:203-226.

- Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Levi A, Korner G, Bar-Shavit R, Klagsbrun M. (1991) Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* 45:167-176.
- Vlodavsky I, Miao HQ, Atzmon R, Levi E, Zimmermann J, Bar-Shavit R, Peretz T, Ben-Sasson SA. (1995) Control of cell proliferation by heparan sulfate and heparin-binding growth factors. *Thromb. Haemostasis.* 74:534-540.
- Walker A, Turnbull JE, Gallagher JT. (1994) Specific heparan sulfate saccharides mediate the activity of basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 269:931-935.
- Wang G, Thomas KA. (1994) Purification and characterization of a functional soluble fibroblast growth factor receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:1781-1788.
- Wang JK, Gao G, Goldfarb M. (1994) Fibroblast growth factor receptors have different signalling and mitogenic potentials. *Mol. Cell. Biol.* 14:181-188.
- Waseem NH, Lane DP. (1990) Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell Sci.* 96:121-129.
- Wellstein A, Fang W, Khatri A, Lu Y, Swain SS, Dickson R, Sasse J, Riegel AT, Lippman ME. (1992) A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. *J. Biol. Chem.* 267:2582-2587.
- Wight TN, Kinsella MG, Quarnström EE. (1992) The role in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:793-801.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. (1994) Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development* 120:1685-1693.
- Witte L, Fuks Z, Haimovitz FA, Vlodavsky I, Goodman DS, Eldor A. (1989) Effects of irradiation on the release of growth factor from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Res.* 49:5066-5072.
- Xin X, Johnson AD, Scott-Burden T, Engler D, Casscells W. (1994) The predominant form of fibroblast growth factor receptor expressed by proliferating human arterial smooth muscle cells in culture is type I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:557-564.
- Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Morrison RS. (1994) Differential expression of two fibroblast growth factor receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:484-488.
- Yamayata T, Saita H, Habuchi O, Suzuki H. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitin and chondro-sulfate. *J. Biol. Chem.* 243:1523-1535.
- Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropoulos S, McKeenan W. (1993) Exon switching and activation of stromal and embryonic FGF-FGFR receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell. Biol.* 13:4513-4522.

- Yanagashita M, Midura RJ, Hascall VC. (1987) Proteoglycans: isolation and purification from tissue cultures. *Meth. Enzymol.* 138:279-287.
- Yanagishita M, Hascall VC. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267:9451-9454.
- Yanagishita M. (1993) Functions of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol. Jap.* 43:283-293.
- Yayon A, Klagsbrun M. (1990) Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer Metas. Rev.* 9:191-192.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. (1991) Cell surface, heparin like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841-848.
- Yayon A, Zimmer Y, Guo-Hong S, Avivi A, Yarden Y, Givol D. (1992) A confined variable region confers ligand specificity on FGF receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J.* 11:1885-1890.
- Yeaman C, Rapraeger AC. (1993) Membrane anchored proteoglycans of mouse macrophages: P388D1 cells express a syndecan-4-like heparan sulfate proteoglycan and a distinct chondroitin sulfate form. *J. Cell. Physiol.* 157:413-425.
- Yeoman LC. (1993) An autocrine model for cell and matrix associated fibroblast growth factor. *Oncology Res.* 5:489-499.
- Zhan X, Bates B, Hu X, Goldfarb M. (1988) The human FGF-5 gene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 8:3487-3495.
- Zhang J, Cousens LS, Barr PJ, Sprang SR. (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3446-3450.
- Zhang L, Esko JD. (1994) Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 269:19295-19299.
- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC. (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251:90-93.
- Zhu X, Hsu BT, Rees DC. (1993) Structural studies of the anti-ulcer drug sucrose octasulfate to acidic fibroblast growth factor receptor. *Structure* 1:27-34.
- Zimmer Y, Givol D, Yayon A. (1993) Multiple structural elements determine ligand binding of fibroblast growth factor receptors. Evidence that both Ig domain 2 and 3 define receptor specificity. *J. Biol. Chem.* 268:7899-7903.

Abréviations.

ADNc : ADN complémentaire
AH : acide hyaluronique
ATP : adenosine triphosphate
BrdU : bromodeoxyuridine
CFR : Cystein-Rich FGF Receptor
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate)
CHO : Chinese Hamster Ovary
CS : chondroïtine sulfate
CSPG : protéoglycane de type chondroïtine sulfate
DAB : 3,3'-diaminobenzidine
DEAE : Diéthylaminoéthyl
dp : degré de polymérisation
DS : dermatane sulfate
EDTA : EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : récepteur de l'EGF
ERK : Extracellular signal Regulated Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : récepteur des FGF
GAG : glycosaminoglycane
GlcA : acide glucuronique (glucuronate)
GlcNAc : N-acétyl glucosamine
GlcNSO₃ : glucosamine N-sulfatée
GPI : glycoposphatidylinositol
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HS : héparane sulfate
HSPG : protéoglycane de type héparane sulfate
IdoA : acide iduronique (iduronate)
IGF : Insuline-like Growth factor
KGF : Keratinocyte Growth Factor
KS : kératine Sulfate
MAP : mitogen-activated protein
MEC : matrice extracellulaire
MEM : Milieu Essentiel Minimum
NGF : Nerve Growth Factor
PAPS : 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate

PBS : Phosphate Buffer Saline
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PG : protéoglycane
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PLD : phospholipase D
PMSF : phenylmethylsulfonylfluoride
RTK : récepteur à tyrosine kinase
RT-PCR : reverse transcriptase - polymerase chain reaction
SAB : sérum albumine bovine
SAMBA : Système d'Analyse Microscopique à Balayage Automatique
SH2 : Src Homology 2
SVF : sérum de veau foetal
TBS : tampon Tris/HCl
TGF : Transforming Growth Factor
TUT : Tampon Urée Triton