

N° d'ordre: 1675

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Option : **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**



par

Ikram EL YAZIDI

**EXPRESSION ET REGULATION DES FACTEURS
DE CROISSANCE FGF1 ET FGF2 DANS LES CELLULES
EPITHELIALES NORMALES ET CANCEREUSES DU SEIN**

Soutenu le 15 Janvier 1996 devant la commission d'examen :

Président :	André VERBERT	Professeur, USTL
Rapporteurs :	Yves COURTOIS Michel CREPIN	Directeur de Recherche INSERM, Paris Professeur, Faculté de Médecine, Paris
Examineurs :	Yolande BOILLY-MARER Geneviève SPIK Bénoni BOILLY	Directeur de Recherche CNRS, USTL Professeur, USTL Professeur, USTL

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame le Directeur de Recherche Yolande BOILLY-MARER au sein du laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité mixte de Recherche du CNRS n° 111: Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires, dirigée par Monsieur le Professeur André VERBERT).

A mes parents,

A ma famille,

A Isabelle,

avec toute mon affection

A Lotfi,

avec tout mon amour

AVANT-PROPOS

Je remercie *Monsieur le Professeur A. VERBERT* de m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse malgré ses nombreuses occupations. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'exprime ma gratitude à mon *Directeur de Recherche Madame Y. BOILLY-MARER* de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance. Je vous remercie pour tout ce que j'ai appris au cours de ma formation doctorale et pour la gentillesse que vous avez su mettre dans nos rapports humains. Je vous remercie également pour votre rigueur scientifique et votre constante disponibilité.

Je remercie très chaleureusement *Monsieur le Docteur Y. COURTOIS* de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie également de m'avoir permis, dans le cadre d'une collaboration fructueuse, de réaliser une part importante du travail de cette thèse dans votre laboratoire INSERM, U118.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à *Monsieur le Professeur M. CREPIN* d'avoir accepté de juger ce travail ; c'est pour moi un honneur. Je vous remercie également de m'avoir aimablement fourni l'une des lignées cellulaires utilisées dans ce travail: la lignée HBL-100.

J'exprime ma gratitude à *Madame le Professeur G. SPIK* d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et pour l'accueil qu'elle m'a accordé au sein de son équipe. Ceci me donne également l'opportunité de la remercier pour l'intérêt qu'elle a manifesté pour ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à *Monsieur le Professeur B. BOILLY* d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et de m'avoir permis de réaliser une partie importante de mes travaux au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour votre confiance et vos précieux conseils qui m'ont été d'un grand soutien.

Je n'oublie pas de remercier tous ceux qui, par leur collaboration, leur aide et leur sympathie, m'ont aidée dans la réalisation de ce travail:

M. MASSON pour son aide précieuse et son soutien moral.

A. PIERCE , *F. RENAUD* et *M. BENAÏSSA* pour leur aide et leurs conseils en biologie moléculaire.

C. MARILLER et *F. ALLAIN* pour leur aide informatique.

Mme M. J. CELEN et *A. ROUSSEAU* pour la préparation des photographies et des diapositives.

Toutes les personnes des bâtiments C9 et SN3 qui, un jour ou l'autre, m'ont apporté leurs conseils. Merci pour la bonne ambiance et les fous rires qui ont accompagné ce travail.

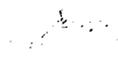
Mon père pour m'avoir permis de partir et m'avoir toujours encouragée. Ton aide, ta confiance, la dimension de ta paternité et ta philosophie de la vie ont été l'un des piliers de cette thèse. Je t'exprime ma reconnaissance avec tout mon amour.

I. BARON, *C. BARON* et *toute leur famille* pour leur aide et pour avoir su être ma seconde famille.

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	1
<i>Généralités</i>	7
I. LES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES (FGF)	7
A. Structure génique des FGF	7
1. Les gènes FGF1 et FGF2	7
2. Les autres gènes de la famille	11
B. Structure protéique des FGF	15
1. Les protéines FGF1 et FGF2	15
2. Les autres protéines de la famille	17
II. DISTRIBUTION DES FGF	18
A. Localisations tissulaires et cellulaires	18
1. Localisation des FGF1 et FGF2	18
2. Localisation des autres FGF	19
B. Dans la glande mammaire normale	21
C. Dans la tumeur mammaire	22
III. LES RECEPTEURS DES FGF: STRUCTURE PROTEIQUE ET GENIQUE	31
A. Haute affinité	31
B. Basse affinité	36
IV. DEVENIR DU LIGAND ET TRANSDUCTION DU SIGNAL	38
V. ROLES BIOLOGIQUES DES FGF	41
A. Activités <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	41
1. Le développement embryonnaire	42
2. L'angiogenèse	43
3. La réparation et la régénération tissulaires	45
4. La prolifération et la différenciation cellulaires	46
5. La transformation et la croissance tumorale	47
B. Effet de l'héparine sur l'activité des FGF	55

Matériel et méthodes	58
I. MATERIEL	58
A. Cellules épithéliales mammaires	58
1. Lignées cellulaires de cancer de sein	58
2. Lignée cellulaire transformée	58
3. Cellules mammaires normales	59
4. Lignées cellulaires utilisées pour les tests d'activité FGF	59
B. Anticorps	59
1. Immunodétection	59
2. Immunoneutralisation de l'activité FGF	59
C. Séquences oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification PCR	60
D. Sondes oligo- et polynucléotidiques	60
1. "Northern-blot"	60
2. "Southern-blot"	62
E. Produits de culture	62
F. Produits de RT-PCR	63
1. Rétrotranscription	63
2. Amplification PCR	63
II. METHODES	64
A. Extraction des HBGF	64
1. Culture cellulaire	64
2. Extraction des protéines cellulaires	66
3. Purification par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose	68
B. Détection des FGF1 et FGF2	68
1. Test ELISA	68
2. Immunocytochimie	69
3. " Western-Blot"	70
C. Dosage des FGF1 et FGF2 par EIA	72



D. Mesure de l'activité biologique	73
1. Culture des cellules cibles	74
2. Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée	74
3. Les tests biologiques	74
E. Détection des ARNm spécifiant les FGF1 et FGF2	76
1. Purification des ARN totaux et des ARN poly A	76
2. Electrophorèse et transfert des ARN : "Northern-Blot"	77
3. Amplification des ADNc utilisés comme sondes	77
4. Hybridation des sondes ADNc	79
5. RT-PCR	79
Résultats	82
CHAPITRE I : LES FGF1 ET FGF2 DANS LES CELLULES EPITHELIALES NORMALES ET TUMORALES DU SEIN	82
I. INTRODUCTION	82
II. RESULTATS	83
A. Les protéines FGF1 et FGF2	83
1. Immunocytochimie	83
2. Isolement et caractérisation des FGF	83
3. Quantification par EIA	86
4. Les tests biologiques	87
B. Les transcrits spécifiant les FGF1 et FGF2	91
1. Analyse par "Northern-blot"	91
2. Analyse par PCR	92
III. DISCUSSION , CONCLUSIONS	94
CHAPITRE II : REGULATION DU FGF1 ET DU FGF2 PAR LE SERUM	100
I. INTRODUCTION	100
II. RESULTATS	102
A. Les protéines	102
B. Les transcrits	103
III. DISCUSSION, CONCLUSIONS	107

CHAPITRE III : REGULATION DES FGF1 ET FGF2 PAR LES OESTROGENES	112
I. INTRODUCTION	112
II. RESULTATS	115
A. Les protéines	115
B. Les transcrits	117
III. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	123
<i>Discussion générale</i>	130
<i>Annexe technique</i>	136
<i>Bibliographie</i>	140

ABBREVIATIONS

aa :	Acide aminé
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AIGF :	Androgen-Induced Growth Factor
ARN :	Acide RiboNucléique
BGF :	Breast Growth Factor
CICs :	Chlorure de césium
cpm :	Coup par minute
EDTA :	Ethylen Diamine TetraAcetic
EGF :	Epidermal Growth Factor
EIA :	Enzyme Immuno Assay
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FGF R :	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC :	Fluorescein IsoThyoCyanate
HBMF :	Heparin Binding Growth Factor
HGF :	Hepatocyte Growth Factor
hst :	Human stomach tumor
Ig :	Immunoglobuline
IGF :	Insuline-like Growth Factor
IL :	Interleukine
kb :	Kilobase
kDa :	KiloDalton
KGF :	Keratinocyte Growth Factor
KS 3 :	Kaposi Sarcoma 3
MAP kinase :	Mitogen Activating Protein kinase
MDGF-I :	Mammary-Derived Growth Factor I
MDGI :	Mammary-Derived Growth Inhibitor
MEM :	Minimun essential Eagle Medium
MMTV :	Mouse Mammary Tumor Virus
MOPS :	3-[N-MORpholino] Propane-Sulfonic acid
NC :	Non codant
NGF :	Nerve Growth Factor
pb :	Paire de bases
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PMSF :	ParaMethySulfonyl Fluoride
RE :	Récepteur aux oesrogènes
SAB :	Sérum Albumine Bovine
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
TGFα :	Transforming Growth Factor α
TGFβ :	Transforming Growth Factor β
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

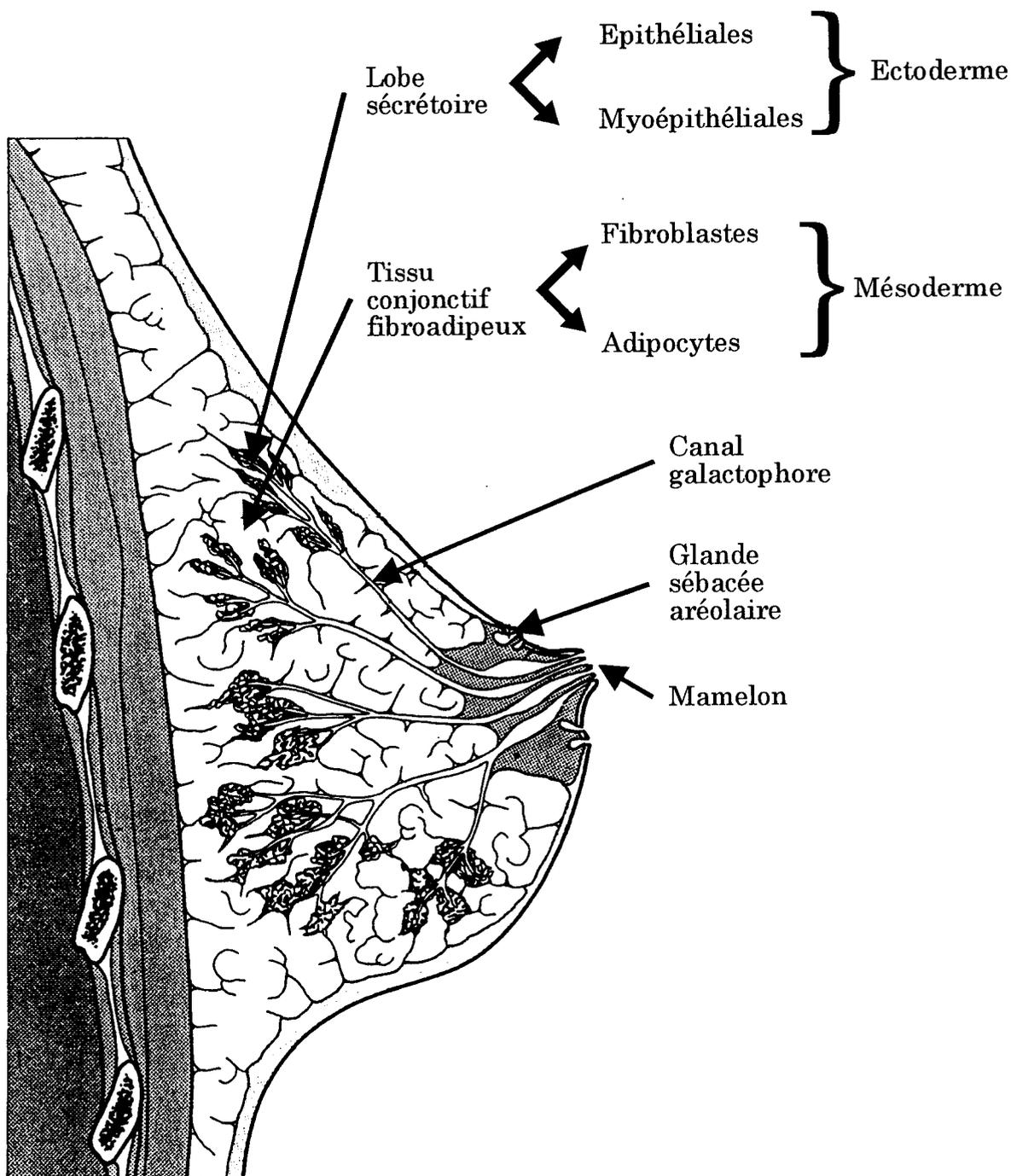


Figure 1. Structure de la glande mammaire.

D'après Wheater, Burkitt et Daniels dans "Histologie fonctionnelle".

La glande mammaire, dont la fonction est de sécréter le lait, présente un développement en plusieurs étapes. Au cours de la vie fœtale a lieu la mise en place des structures mammaires de base. La glande est constituée d'un parenchyme, composante épithéliale dérivée embryologiquement de l'ectoderme et d'un mésenchyme ou stroma dérivé du mésoderme. A la puberté, ces structures s'amplifient sans changements fondamentaux pour former les canaux mammaires sous l'effet d'interactions épithélio-mésenchymateuses. Au cours de la gestation, les signaux hormonaux induisent la prolifération des cellules souches essentiellement canaliculaires et leur organisation en alvéoles et en réseaux de canaux.

La glande mammaire est composée de quatre types cellulaires différents: les cellules épithéliales qui forment les alvéoles et les canaux et qui seules synthétisent et sécrètent le lait, les cellules myoépithéliales qui ont pour fonction en se contractant sous l'influence de l'ocytocine de faire évacuer le lait, les adipocytes et les fibroblastes. Les cellules épithéliales et myoépithéliales constituent le parenchyme, les adipocytes et les fibroblastes sont les composants du mésenchyme (Fig. 1). Les adipocytes confèrent sa spécificité au mésenchyme mammaire, contribuent à la prolifération et à l'organisation des cellules épithéliales et augmentent la vascularisation de la glande mammaire (pour revue: Houdebine 1993 ; Imagawa *et al.*, 1994a). Ces effets sont le résultat d'interactions directes entre l'épithélium et le stroma et de la production de facteurs solubles par les adipocytes. Ces facteurs sont les acides gras poly-insaturés et leurs dérivés, les prostaglandines. Les fibroblastes qui se trouvent à proximité des cellules épithéliales jouent également un rôle essentiel dans la formation et la différenciation du tissu épithélial. Les fibroblastes stimulent la prolifération des cellules épithéliales via la production du facteur de croissance HGF ("Hepatocyte Growth Factor") et synthétisent du collagène I qui permet aux cellules épithéliales de se polariser et de produire une matrice extracellulaire qui favorise leur différenciation. La matrice extracellulaire est un ensemble complexe de molécules, synthétisées par les différentes cellules d'un tissu pour participer à leur assemblage en organe. Les principaux constituants de cet ensemble sont les collagènes, la laminine, la fibronectine, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes. Ces

molécules assemblées en réseau forment un gel directement en contact avec les membranes des cellules qui possèdent par ailleurs des récepteurs spécifiques pour les éléments de la matrice extracellulaire. Dans la glande mammaire la matrice extracellulaire intervient non seulement dans son organisation structurale mais également dans le mécanisme de la transduction du signal prolactine aux gènes des protéines du lait.

Le premier signe de la puberté chez la jeune fille est le développement de la glande mammaire. Ce développement résulte d'une prolifération glandulaire limitée due en grande partie à l'accroissement du stroma et du tissu adipeux. Les cellules épithéliales et myoépithéliales sont elles impliquées dans la formation des canaux mammaires par un processus de prolifération, d'élongation et de branchement latéral et dichotomique. La glande mammaire postpubertaire est alors composée d'un faible nombre de canaux terminés par un nombre limité de lobules. Le développement du tissu mammaire est déclenché par des signaux hormonaux, principalement les œstrogènes. Les récepteurs aux œstrogènes sont présents dans les fibroblastes et les cellules épithéliales mammaires. Le récepteur de la progestérone est par contre décelable surtout dans les cellules épithéliales. La prolifération des cellules épithéliales mammaires est sous le contrôle des œstrogènes et de la progestérone (Bresciani, 1968). Il est clair cependant que les œstrogènes eux-mêmes ne sont pas de véritables agents mitogènes pour les cellules épithéliales mammaires normales (Edery *et al.*, 1984 ; Gabelman et Emerman, 1992). Ils agiraient par l'intermédiaire de mécanismes multiples plus ou moins indirects. Sous l'influence des œstrogènes, la glande pituitaire synthétise davantage de prolactine. La progestérone en synergie avec la prolactine augmente la croissance des cellules épithéliales. Les œstrogènes, en induisant l'accumulation des récepteurs de la progestérone dans ces cellules, pourraient favoriser ainsi leur multiplication (pour revue: Haslam, 1987). La progestérone n'est toutefois pas un agent mitogène très puissant vis-à-vis de la glande mammaire. Une des actions *in vivo* des œstrogènes sur la croissance mammaire pourrait donc s'exercer via la prolactine, puissant mitogène vis-à-vis de la glande mammaire. La prolactine elle-même pourrait stimuler la croissance mammaire en partie par un mécanisme indirect ou en synergie avec des facteurs de croissance. Sous l'influence des

œstrogènes, les cellules épithéliales mammaires produisent davantage de facteurs de croissance et de leurs récepteurs. L'EGF ("Epidermal Growth Factor") et le TGF α ("Transforming Growth Factor α ") sont deux facteurs de croissance de la même famille, utilisant le même récepteur de l'EGF et agissant sur un grand nombre de types cellulaires. Des récepteurs de ces facteurs ont été identifiés sur les cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires. Les œstrogènes augmentent la synthèse de l'EGF, de ses récepteurs (Vonderhaar, 1984), du TGF α et de ses récepteurs (Monahan *et al.*, 1987 ; Gabelman et Emerman, 1992). Des ARNm du facteur de croissance IGF-I ("Insulin-like Growth Factor-I") ont été localisés dans le stroma de la glande mammaire humaine par la technique d'hybridation *in situ* (Yee *et al.*, 1989). Les cellules épithéliales mammaires sont sensibles à l'IGF-I, ce qui invite à considérer un modèle paracrine dans lequel les cellules stromales constituent la source locale d'IGF-I qui pourrait stimuler la prolifération de l'épithélium. L'expression de l'IGF-I est augmentée par l'hormone de croissance et des arguments indirects tendent à montrer qu'elle est également sensible aux œstrogènes. Les cellules épithéliales mammaires produisent un facteur de croissance propre à la glande mammaire: le MDGF1 ("Mammary-Derived Growth Factor 1") (Bano *et al.*, 1985). Ce facteur de croissance, hautement mitogène pour les cellules épithéliales mammaires, agirait selon une boucle de stimulation autocrine. Les œstrogènes augmentent la sensibilité des cellules épithéliales mammaires à ce facteur de croissance.

La croissance du tissu mammaire est limitée par des facteurs inhibiteurs de la prolifération. Le TGF β ("Transforming Growth Factor β "), reconnu initialement comme un facteur de croissance et un facteur transformant des fibroblastes, s'est avéré exercer une action inhibitrice sur la plupart des cellules et, en particulier, sur les cellules de type épithélial. Le TGF β produit et sécrété par les cellules épithéliales mammaires exerce un effet inhibiteur sur la prolifération de ces cellules (Valverius *et al.*, 1989). La mammostatine, isolée de la glande mammaire humaine normale, est un inhibiteur spécifique de ce tissu (Ervin *et al.*, 1989). Le MDGI ("Mammary-Derived Growth Inhibitor") isolé, à l'origine, de la glande mammaire bovine lactante (Böhmer *et al.*, 1987) est un autre inhibiteur de la croissance des cellules épithéliales mammaires. Le TGF β est également un facteur

morphogène pour la glande mammaire; il inhibe fortement et de manière réversible la croissance des canaux et favorise le dépôt de collagène et la formation de matrice extracellulaire. Les œstrogènes inhibent la sécrétion du TGF β dans certaines lignées de cellules épithéliales mammaires (Knabbe *et al.*, 1987). *In vivo* dans le tissu mammaire normal, les œstrogènes pourraient donc contribuer à stimuler le développement de la glande mammaire en inhibant les effets inhibiteurs du TGF β . Le MDGI, qui fait partie de la famille des protéines transporteuses de lipides, est capable de se lier aux lipides et de les transporter dans les cellules mammaires. Le facteur est présent essentiellement dans la glande différenciée, c'est-à-dire pendant la gestation ou la lactation, ce qui suggère une corrélation positive avec l'expression des hormones lactogènes. La croissance normale de la glande mammaire est contrôlée par une balance d'activités biologiques entre facteurs stimulateurs et inhibiteurs de prolifération. Il s'agit de mécanismes complexes comprenant des interactions directes cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire et des interactions indirectes via les hormones, les facteurs stimulateurs et les facteurs inhibiteurs de la croissance. L'homéostasie tissulaire est un phénomène complexe dont les mécanismes sont loin d'être complètement élucidés.

L'évolution des cellules normales vers le cancer résulte d'un processus multi-étapes dont les causes sont de natures diverses. Dans le cas du cancer du sein, le facteur hormonal est l'élément majeur souvent impliqué. Plusieurs travaux ont montré que les œstrogènes stimulent de façon indirecte la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales. La prolifération induite par les œstrogènes serait le résultat d'une surproduction de facteurs de croissance tels que l'EGF (Dickson *et al.*, 1986), le TGF α (Bates *et al.*, 1988) et l'IGF-II (Osborne *et al.*, 1989). A l'opposé, le TGF β est inhibé par les œstrogènes (Knabbe *et al.*, 1987). Les œstrogènes contrôlent aussi l'expression des récepteurs de ces facteurs: EGF R (Mukku et Stancel, 1985), IGF R (Stewart *et al.*, 1992 ; Mathieu *et al.*, 1991). Ces données suggèrent que les facteurs de croissance et leurs récepteurs sont impliqués dans la prolifération induite par les œstrogènes selon un mécanisme de stimulation de type autocrine.

Dans le contexte de cette thèse, nous nous intéresserons à la production et à la régulation des facteurs de croissance des fibroblastes FGF1 (FGF acide) et FGF2

(FGF basique) dans les cellules épithéliales normales ou cancéreuses de la glande mammaire humaine.

Des études immunohistochimiques ont permis de localiser le FGF1 (Smith *et al.*, 1994) et le FGF2 (Gomm *et al.*, 1991) dans la glande mammaire humaine. *In vitro*, le FGF1 (Imagawa *et al.*, 1994b) et le FGF2 (Levay-Young *et al.*, 1989) stimulent la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales. *In vivo*, le FGF2 serait impliqué dans la croissance de l'épithélium mammaire. En effet, bien qu'il soit associé aux basales des canaux mammaires quiescents, il existe également sur les cellules épithéliales des canaux en croissance (Rudland *et al.*, 1993). Cinq membres de la famille FGF, originellement isolés de tumeurs, sont considérés comme des oncogènes. Le FGF1 et le FGF2 ne sont pas des oncogènes mais ont été localisés dans différentes tumeurs dont les carcinomes mammaires (Luqmani *et al.*, 1992 ; Smith *et al.*, 1994 ; Anandappa *et al.*, 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Penaut-Llorca *et al.*, 1995). Les lignées cellulaires dérivées de carcinomes mammaires expriment les récepteurs du FGF et sont, pour la plupart, stimulées par ce facteur (Peyrat *et al.*, 1991 ; Briozzo *et al.*, 1991). Compte tenu de certaines observations concernant la lignée cancéreuse mammaire hautement invasive MDA-MB-231: prolifération en absence de sérum et production de FGF (El Yazidi et Boilly-Marer, 1995), nous avons émis l'hypothèse que les cellules cancéreuses mammaires produisaient des facteurs FGF qui leur permettraient de croître en absence de sérum. La comparaison de la production du FGF1 et du FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires normales, transformées ou cancéreuses permettrait de définir le rôle du FGF dans la tumorigenèse mammaire. La comparaison de cette production en présence ou en absence de sérum pourrait permettre d'observer des régulations différentielles dépendant de l'état physiologique de la cellule (normal ou transformé) et/ou du milieu environnant. Par ailleurs, la régulation hormonale des facteurs de croissance FGF est encore peu connue. Le FGF8 est un facteur dont la synthèse est induite par les androgènes dans des cellules androgéno-dépendantes de tumeur mammaire de souris (Tanaka *et al.*, 1992). L'expression du FGF1 est augmentée par la testostérone dans des cellules tumorales de muscle lisse de canaux déférents de hamster (Hall *et al.*, 1990). Comme nous l'avons vu précédemment, les œstrogènes contrôlent la

production de nombreux facteurs de croissance dans les cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses. Il importait donc de savoir si le FGF1 et le FGF2 sont également régulés par les œstrogènes dans les cellules mammaires humaines. L'étude comparative de l'influence des œstrogènes sur la production du FGF1 et du FGF2 dans les cellules mammaires normales et dans les cellules cancéreuses permettrait de savoir si les FGF jouent un rôle dans le cancer mammaire hormono-dépendant.

Le gène du FGF1 subit un mécanisme d'épissage alternatif à l'origine de plusieurs transcrits. Ces transcrits diffèrent dans leur région 5' non codante par la présence d'un exon non codant différent. Ils codent cependant tous la même protéine FGF1. A la lumière des résultats montrant le rôle de l'épissage alternatif dans la régulation de la production protéique, il était intéressant d'analyser l'épissage alternatif du FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires humaines. La comparaison de l'expression et de la régulation des transcrits épissés FGF1 entre cellules normales et cellules cancéreuses mammaires pourrait donner quelques indications supplémentaires sur la signification biologique de l'épissage alternatif du FGF1. Les transcrits alternatifs du FGF1 semblent contribuer à leur spécificité tissulaire et une distribution spatio-temporelle complexe au facteur de croissance FGF1.

Généralités

I. LES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES

A. Structure génique des FGF

1. Les gènes FGF1 et FGF2

Le FGF1 (FGF acide). Le clonage des ARN messagers fut long et difficile à cause, en partie, de leur faible représentativité. Une séquence nucléotidique de 250 pb issue d'un clone génomique fut en premier lieu isolée chez le bovin (Abraham *et al.*, 1986a). Un clone d'ADN complémentaire contenant la totalité de la séquence codante fut ensuite isolé chez l'homme et le gène localisé sur le chromosome 5 (q31.3 à 33.2) (Jaye *et al.*, 1986). La région codante du gène FGF1 humain est formée de 3 exons de longueurs respectives 169,104 et 192 pb. Ces exons sont séparés par deux séquences introniques particulièrement longues (5,3 kb pour l'intron séparant les deuxième et troisième exons). La région 3' non codante (NC), en aval de l'exon 3, s'étend sur près de 3 kb et contient plusieurs sites de polyadénylation (Wang *et al.*, 1989 ; Crumley *et al.*, 1989). Ces sites de terminaisons multiples génèrent des régions 3' NC de taille variable (1,7, 1,8, 2 et 3,1 kb). L'étude de la région 5' NC de ce gène a permis de localiser le site d'initiation de la transcription et de mettre en évidence un intron à la position -34 de l'ATG (Wang *et al.*, 1989 ; Mergia *et al.*, 1989). La comparaison des séquences 5' NC, issues de plusieurs clones d'ADNc humain, a révélé l'existence de 3 types de séquences 5' NC divergeant toutes en amont de la position -34 par rapport à l'ATG (Chiu *et al.*, 1990 ; Crumley *et al.*, 1990). De même, la comparaison dans cette région 5' NC de clones humains et bovins a mis en évidence un point de rupture dans l'homologie de séquence à la position -34 de l'ATG. Ces résultats ont suggéré l'existence d'un mécanisme d'épissage alternatif à cette position. Ce mécanisme a été effectivement mis en évidence dans la région 5' NC du gène FGF1 humain (Chiu *et al.*, 1990 ; Crumley *et al.*, 1990) et bovin (Philippe *et al.*, 1992).

La comparaison des séquences nucléotidiques des ADNc de différentes espèces montre une forte homologie dans les régions codantes et non codantes du gène du FGF1. Chez les mammifères, le taux de conservation est de 90% dans la région codante et de 70% dans la région non codante. D'autres caractéristiques telles que la présence d'un codon stop en phase et d'un site d'initiation de la

traduction unique sont communes à toutes les espèces étudiées. L'expression du gène du FGF1 permet d'obtenir des ARNm multiples dont les tailles varient de 4,5 à 0,8 kb. Des distributions différentielles spécifiques de tissus et de cellules, ont été mises en évidence et font apparaître cependant un messager majoritaire de 4,2 kb dans tous les cas. L'existence de plusieurs sites de terminaison dans la région 3' NC du gène humain permet l'obtention de transcrits ayant une séquence 3' NC de taille variable (Crumley *et al.*, 1989 ; Chiu *et al.*, 1990). Par conséquent, la protéine codée est de 155, 140 ou 134 acides aminés (tableau I).

Tableau I. Localisation chromosomique des gènes FGF, taille des transcrits et des protéines correspondant à ces gènes.

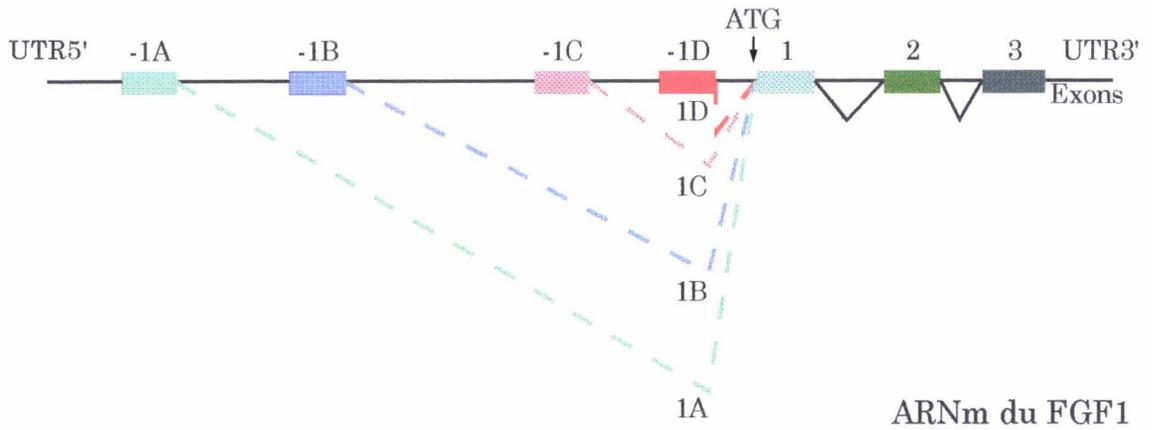
Gène	Localisation chromosomique	Transcrits (kb)	Protéines (aa)	Peptide signal
FGF1	5q31.3-31.2	4,5 ; 4,2 ; 0,8	155 ; 140 ; 134	-
FGF2	4q26	7 ; 4,6 ; 3,7 ; 2,2	210 ; 196 ; 155	-
FGF3	11q13	1,7	231	+
FGF4	11q13	3,3 ; 1,2	206 ; 153	+
FGF5	4q21	1,6 ; 4	267	+
FGF6	12p13	4,7 ; 3,9	208 ; 198 ; 175	+
FGF7	ND	5 ; 2,4	194	+
FGF8	10	1 à 1,2	215	putatif
FGF9	ND	4,3 ; 3,4 ; 2,7	208	-

Ce mécanisme de terminaison alternative a été également mis en évidence pour le gène FGF1 bovin (Renaud *et al.*, 1992). La diversité des transcrits FGF1 résulte également de l'épissage d'exons 5' NC différents. Jusqu'en 1994, 4 exons en amont de l'ATG ont été découverts dans la région 5' NC du gène du FGF1 (Wang *et al.*, 1989, 1991 ; Chiu *et al.*, 1990 ; Payson *et al.*, 1993). L'épissage alternatif de l'un de ces exons (-1A, -1B, -1C et -1D) à l'exon 1 codant du gène permet d'obtenir 4 types d'ARNm : 1.A, 1.B, 1.C et 1.D. La distribution de ces transcrits est tissu spécifique. Le type 1.A prédomine dans le rein, le 1.B dans le cerveau et le 1.C et

1.D dans des glioblastomes divers et dans des lignées cellulaires fibroblastiques (Myers *et al.*, 1993). Récemment cinq nouveaux transcrits épissés et deux nouveaux exons : -1E et -1F ont été décrits (Voulgaropoulou *et al.*, 1994). En résumé, le gène du FGF1 est composé, dans sa partie codante par 3 exons séparés par 2 larges introns et par de longues régions 5' et 3' NC. La région 5' NC comporte 6 exons non traduits et plusieurs promoteurs en amont de ces exons NC (Fig. 2). L'épissage qui intéresse les exons codant 1,2 et 3 génère la phase ouverte de lecture du FGF1 et sa longue région 3' NC. De même, comme l'épissage alternatif dans la région 5' NC implique des exons non traduits, tous les transcrits du FGF1 obtenus codent la même protéine. Le gène du FGF1 approche les 120 kb mais la protéine codée n'est que de 16-18 kDa. Par ailleurs, il est étonnant de noter l'absence de la séquence nucléotidique consensus type peptide signal en sachant que le FGF1 est sécrété.

Le FGF2 (FGF basique). Le gène FGF2 humain a été localisé sur le chromosome 4 au niveau de la bande q26 (Mergia *et al.*, 1986). La région codante de ce gène est, comme pour le FGF1, scindée en 3 exons séparés par 2 larges introns. Ces introns délimitent un exon central de 104 bases bien conservé entre ces 2 gènes (Abraham *et al.*, 1986b ; Volk *et al.*, 1989). L'exon 3 est également bien conservé et la région 3' NC s'étend sur 3 kb pour les deux transcrits majoritaires du FGF2, comme dans le cas du FGF1 (Wang *et al.*, 1989 ; Crumley *et al.*, 1989 ; Abraham *et al.*, 1986b). Le taux d'homologie de la séquence nucléotidique de ces deux gènes est de l'ordre de 55 %. Le gène du FGF2 humain d'environ 35 kb code pour des messagers de grande taille : 4,6 et 2,2 kb ; un transcrit de 6 kb a même été décelé dans le cortex cérébral du bovin et du rat (Shimasaki *et al.*, 1988). A l'inverse du FGF1, les transcrits du FGF2 présentent plusieurs sites d'initiation de la traduction. En plus du site classique de type AUG (site de traduction unique pour le FGF1), les ARNm du FGF2 utilisent trois sites originaux de type CUG localisés plus en amont. Par conséquent, un même transcrit peut engendrer des formes longues du FGF2 (24, 22,5 et 21 kDa) en plus de la forme 18 kDa initiée à l'AUG (Prats *et al.*, 1989 ; Florkiewicz et Sommer, 1989) (tableau I). Comme pour le FGF1, le gène du FGF2 est dépourvu de la séquence consensus peptide signal bien que le produit de ce gène soit une protéine sécrétée. Un épissage alternatif a été découvert pour le gène aviaire du FGF2 ; il est à l'origine d'un domaine N-terminal

A. ARNm FGF1 obtenus par l'épissage alternatif entre l'exon codant 1 et les exons non codants -1A, -1B, -1C, -1D.



B. Epissages alternatifs de l'ARNm FGF1 à l'origine des transcrits 1.A'/F, 1.A'/B, 1.A'/E, 1A' et 1.A''.

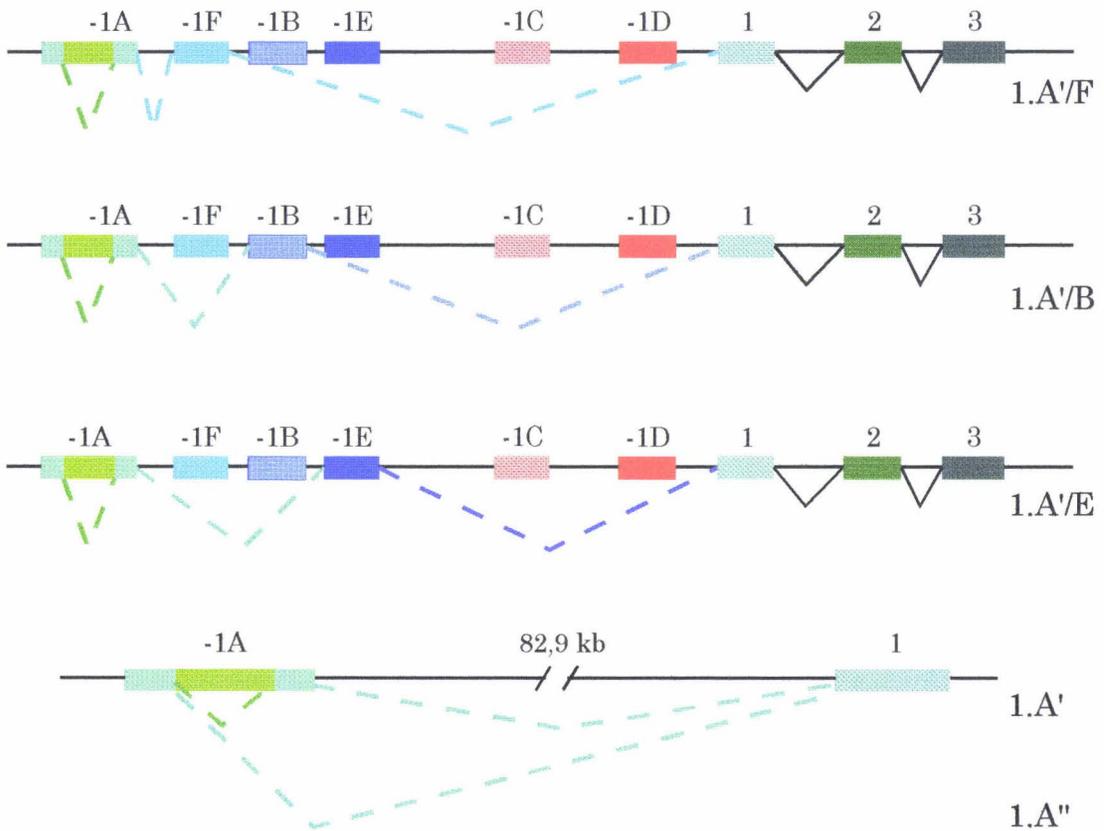


Figure 2. Structure du gène et des ARNm FGF1 humains.

nouveau de la protéine. Une des particularités importantes du gène FGF2 est la possibilité de transcription d'ARNm antisens. Des ARNm antisens FGF2 (*gfg2*) de 1,5 kb ont été mis en évidence récemment chez l'homme dans des tissus aussi divers que le rein, le colon, le coeur, le foie, le muscle squelettique, les testicules et les ovocytes non fécondés (Kinee *et al.*, 1994). Ce type de transcrit a été localisé également dans des lignées cellulaires dont une lignée de glioblastome humain et une lignée de cancer du sein (T47D) (Murphy et Knee, 1994). Les transcrits *gfg2* ont été découverts pour la première fois chez le xénope par Volk et collaborateurs (1989) sous forme d'ARNm de 1,3 kb couvrant les régions codantes et 3' NC du FGF2 de xénope. La comparaison des séquences nucléotidiques du clone *gfg2* humain avec celui découvert chez le xénope révèle une homologie de 73 % avec une forte conservation des sites de jonction d'épissage et de la phase ouverte de lecture.

2. Les autres gènes de la famille

Outre les FGF1 et 2 qui sont les mieux connus, la famille des FGF comporte 7 autres membres. A l'inverse du FGF1 et FGF2, ces autres membres, à l'exception du FGF9, possèdent tous une séquence nucléotidique de type peptide signal.

Le FGF3 (int-2). Le proto-oncogène *int-2* a été identifié dans des carcinomes mammaires induits chez la souris par le virus MMTV ("Mouse Mammary Tumor Virus"). Ce proto-oncogène est activé suite à l'insertion de l'ADN proviral au locus *int-2* (Dickson *et al.*, 1984 ; Dickson et Peters, 1987). Le gène reste dans sa structure très proche du FGF1 et du FGF2 ; il est en effet constitué, dans sa partie codante, par 3 exons interrompus par 2 séquences introniques ; l'exon central de 104 pb est bien conservé (Brookes *et al.*, 1989). Chez l'homme, ce gène est transcrit en un ARNm unique de 1,7 kb qui est traduit en un peptide de 231 acides aminés (Fantl *et al.*, 1989 ; Brookes *et al.*, 1989). Chez la souris, 4 transcrits différents sont exprimés dans 2 lignées cellulaires de carcinome embryonnaire PCC4 et F9 (Smith *et al.*, 1988). La même année, Mansour et ses collaborateurs ont mis en évidence un mécanisme de terminaison alternatif à l'origine de l'hétérogénéité transcriptionnelle. Mais cette diversité est également assurée par un épissage alternatif touchant 3 exons situés en amont de la région codante. Un promoteur pour chacun de ces 3 exons localisés dans la région 5' NC permet leur

transcription différentielle et donc cette diversité (Mansour *et al.*, 1988 ; Smith *et al.*, 1988).

Comme pour le FGF2, les transcrits du FGF3 contiennent des sites d'initiation de la traduction multiples permettant ainsi une traduction alternative à l'origine de plusieurs isoformes (Acland *et al.*, 1990). Il est intéressant de rappeler que ce gène ne s'exprime pas dans les tissus mammaires normaux (sauf dans les stades précoces du développement) et qu'il est par contre co-amplifié avec le gène FGF4 dans certains cancers humains (Adelaide *et al.*, 1988). Ces deux gènes sont contigus et localisés sur le chromosome 11 en q13 (Casey *et al.*, 1986 ; Yoshida *et al.*, 1988 ; Wada *et al.*, 1988). Ils possèdent une homologie de séquence de l'ordre de 40 % avec les FGF1 et 2.

Le FGF4 (KS3/hst). L'obtention de cellules NIH 3T3 transformées après transfection par l'ADN issu de sarcome de Kaposi a permis d'identifier l'oncogène KS3 (Kaposi Sarcoma 3) (Delli-Bovi *et al.*, 1987). Parallèlement, le même principe appliqué à l'ADN isolé de tumeur humaine d'estomac (Yoshida *et al.*, 1987) a permis la découverte de l'oncogène hst ("human stomach tumor") identique à KS3. KFGF, KS3, hst désignent tous le FGF4. Sa structure génique est semblable à celle des FGF1, 2 et 3. L'exon central de 104 pb est délimité par 2 introns (Yoshida *et al.*, 1987 ; Sakamoto *et al.*, 1988). Une séquence de type TATA et 3 boîtes de type GC ont été localisées en amont du site d'initiation de la transcription (Delli-Bovi *et al.*, 1987 ; Yoshida *et al.*, 1987). Deux transcrits du FGF4 de 3,3 et 1,2 kb ont été caractérisés. L'ARNm le plus long contient 2 phases de lecture : la première phase code pour les 206 acides aminés du FGF4, alors que la deuxième phase spécifie une protéine putative de 153 acides aminés. Le transcrit le plus court ne contient que la phase de lecture du FGF4 (Yoshida *et al.*, 1987 ; Taira *et al.*, 1987)

Le FGF5. Le gène FGF5 humain est localisé sur le chromosome 5 ; il a été isolé selon le même principe que le FGF4 (Zhan *et al.*, 1988). Cet oncogène est, comme le FGF4, composé de 3 exons codants précédés d'une boîte de type TATA. Deux transcrits humains de 1,6 et 4 kb ont été caractérisés. Deux phases ouvertes de lecture sont présentes sur les deux transcrits. La première

phase code pour une protéine putative de 38 acides aminés et la deuxième pour les 267 acides aminés du FGF5. La région codante pour le FGF5 présente 40 à 50 % d'homologie avec les autres FGF.

Le FGF6. Le gène du FGF6 a été identifié à partir d'une banque d'ADNc de souris après hybridation avec une sonde hst humaine (Marics *et al.*, 1989). Il présente 70 % d'homologie avec hst et possède également des propriétés transformantes sur des cellules NIH 3T3. Ce gène, composé de 3 exons, est localisé en 12p13 et permet la synthèse de 2 transcrits de 3,9 et 4,7 kb. De longues régions 5' et 3' NC délimitent une phase de lecture unique spécifiant les 208 acides aminés du FGF6 (Marics *et al.*, 1989). Trois sites d'initiation de la traduction de type AUG permettent la synthèse de 3 protéines FGF6 de 208, 198 et 175 résidus (Coulier *et al.*, 1991).

Le FGF7 (KGF). Le gène du facteur de croissance des kératinocytes (KGF) ou FGF7 a été isolé à partir d'une lignée de fibroblastes embryonnaires humains (Rubin *et al.*, 1989). Les transcrits sont de 5 et 2,4 kb et contiennent une seule phase ouverte de lecture à partir d'un codon AUG unique. La région codante est, comme dans le cas des autres FGF, entourée par d'importantes régions 5' et 3' non codantes (Finch *et al.*, 1989).

Le FGF8 (AIGF). Le gène du FGF8 a été cloné chez la souris (Tanaka *et al.*, 1992). L'ADNc code pour une protéine de 215 acides aminés qui possède un peptide signal putatif. La phase de lecture se situe entre un codon d'initiation de type ATG (en position 174) et un codon de terminaison en position 819. Les ARNm du FGF8 sont induits par la testostérone d'où le nom originel d'AIGF pour facteur de croissance induit par les androgènes (Tanaka *et al.*, 1992). Ces auteurs ont constaté une homologie en acides aminés de 30 à 40% entre le FGF8 et les autres membres de la famille FGF. Le caractère oncogénique du FGF8 a été démontré par Kouhara et ses collaborateurs en 1994: des cellules NIH 3T3 transfectées de façon stable par un vecteur d'expression contenant le gène FGF8 sont capables d'induire une tumeur dans la souris "nude" et de former des colonies en agar mou. Afin de définir le rôle du FGF8, les transcrits de ce gène ont été recherchés dans différents tissus de souris adulte et d'embryon de souris. Ce gène

semble être exprimé uniquement au cours de l'embryogenèse. En particulier il est exprimé lors de la gastrulation, du développement cérébral et au cours de la morphogenèse faciale et de celle des membres (Ohuchi *et al.*, 1994 ; Crossley et Martin, 1995). Chez la souris, le gène FGF8 contient un exon nouveau ainsi que plusieurs sites donneurs et accepteurs d'épissage alternatif (Crossley et Martin, 1995). L'épissage alternatif serait à l'origine de 7 transcrits différents, eux-mêmes à l'origine de plusieurs protéines FGF8 différentes dans leur région N-terminal. Le FGF8 humain a été récemment localisé sur le chromosome 10 (Lorenzi *et al.*, 1995). La comparaison de la séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène FGF8 a mis en évidence une homologie de séquence de l'ordre de 20% avec les FGF1, 2, 4 et 5 et de l'ordre de 30% pour les FGF6 et 7. Les exons 2 de la plupart des autres membres de la famille FGF montrent une homologie de séquence allant de 37% à 71%. Ceci indique que dans l'évolution de la famille des gènes FGF, le FGF8 est le membre le plus divergent.

Le FGF9. L'ADNc du FGF9 fut cloné à partir d'une lignée cellulaire de gliome humain (Miyamoto *et al.*, 1993). Cet ADNc spécifie un polypeptide de 208 acides aminés et l'homologie de séquence peptidique avec les autres membres de la famille est de l'ordre de 30 %. La comparaison du FGF9 humain et du FGF9 de rat permet de conclure à une grande conservation de ce gène. Chez l'homme, ce gène est transcrit en 3 ARNm dont les tailles approximatives sont de 4,3, 3,4 et 2,7 kb. Le site d'initiation de la traduction localisé sur l'ADNc est de type ATG et il n'existerait pas de mécanisme d'initiation alternative d'après l'analyse de la région 5' NC.

En conclusion, les 9 membres de la famille des FGF montrent une homologie importante de séquence et de structure génique qui suggère l'existence d'un ancêtre commun dont la duplication serait à l'origine de leur diversité (Fig. 3).

Jusqu'en 1992, la famille génique des FGF comprenait 7 membres. Cette famille s'est agrandie grâce aux travaux d'Isaac et ses collaborateurs (1992). Cette équipe a permis le clonage moléculaire chez le xénope de 2 nouveaux membres nommés Xe FGF_i et Xe FGF_{ii} ("Xenopus embryonic FGF_i et ii"). Ces gènes sont exprimés lors de l'induction mésodermique au cours de la gastrulation de l'embryon de xénope. Ils seraient responsables de l'établissement de l'axe antéro-postérieur.

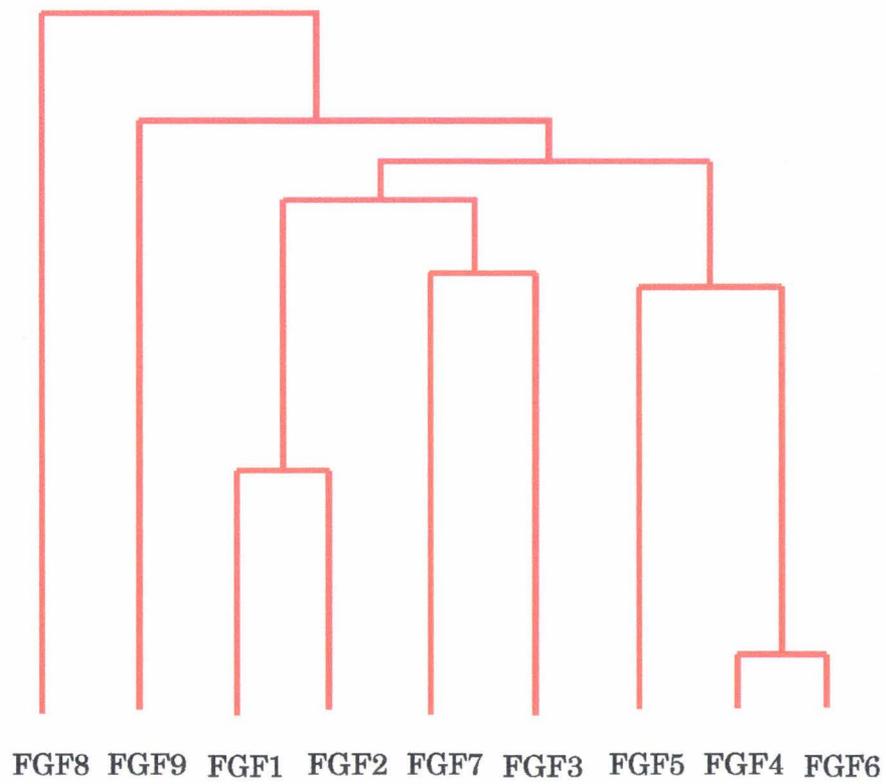


Figure 3. Arbre phylogénétique déduit des comparaisons de séquences.
 Les distances horizontales sont proportionnelles au nombre de substitutions par rapport à un ancêtre commun hypothétique.

Leurs séquences nucléotidiques présentent 92 % d'homologie et les séquences peptidiques qui en dérivent 89 %. L'homologie avec le FGF2 est faible (16 %), mais Xe FGF partagerait un gène ancestral commun au FGF6 et au FGF4. Ce gène aurait subi une duplication et l'évolution l'aurait ensuite écarté de la lignée de mammifères

B. Structure protéique des FGF

Le développement des techniques de cultures de cellules eucaryotes *in vitro* a permis la découverte de molécules capables d'induire ou de favoriser la croissance cellulaire. Ces molécules mitogènes sont alors désignées sous le terme de facteurs de croissance. La stimulation de la prolifération de fibroblastes 3T3 mis en présence, *in vitro*, d'extraits de tissus divers a été rapportée dès 1939. Mais ce n'est qu'en 1974 que Gospodarowicz désigne, pour la première fois, un polypeptide mitogène pour les fibroblastes 3T3 (Armellin *et al.*, 1973) par le terme de "Fibroblast Growth Factor". On découvrira ultérieurement que cette terminologie est inappropriée car elle ne reflète qu'un aspect limité des propriétés actuellement attribuées à ces molécules. En 1975, une extraction à partir d'hypophyse et de cerveaux bovins aboutit à la caractérisation d'une protéine basique désignée par FGF (Gospodarowicz, 1975). L'amélioration des techniques de purification ont permis de distinguer deux formes de FGF: une forme acide (PI 5,6) à partir du cerveau de boeuf (Thomas *et al.*, 1984), et une forme basique (PI 9,6) à partir d'hypophyse de boeuf (Böhlen *et al.*, 1984). Parallèlement, Shing et collaborateurs (1984) mettaient en évidence la forte affinité pour l'héparine d'un extrait de chondrosarcome ayant une activité "FGF-like". Cette découverte fut le point de départ de la mise au point du procédé de purification des FGF par chromatographie d'affinité sur héparine immobilisée. Cette méthode constitue jusqu'à présent l'étape essentielle pour la recherche d'une activité du type FGF. Les FGF1 et FGF2 sont respectivement élués à des concentrations salines de l'ordre de 1 M et 1,5 M de chlorure de sodium (NaCl) (Gospodarowicz *et al.*, 1984 ; Maciag *et al.*, 1984 ; Lobb et Fett, 1984 ; Courty *et al.*, 1985 ; Böhlen *et al.*, 1985).

Tableau II. Comparaison croisée des séquences protéiques des FGF.

	FGF1	FGF2	FGF3	FGF4	FGF5	FGF6	FGF7	FGF8	FGF9
FGF1	*	53	28	29	27	23	32	15	28
FGF2	53	*	33	37	28	36	31	20	31
FGF3	28	33	*	27	39	30	38	19	27
FGF4	29	37	27	*	40	70	27	21	27
FGF5	27	28	39	40	*	40	30	15	32
FGF6	23	36	30	70	40	*	27	22	26
FGF7	32	31	38	27	30	27	*	18	28
FGF8	15	20	19	21	15	22	18	*	16
FGF9	28	31	27	27	32	26	28	16	*

1. Les protéines FGF1 et FGF2

Le FGF1 (*FGF acide*) a été purifié sous forme d'une chaîne polypeptidique unique de 140 acides aminés (aa) à partir du cerveau de boeuf (Gimenez-Gallego *et al.*, 1985). Des formes plus courtes dues à des délétions du côté N-terminal des 6 et 21 premiers aa ont été isolées du rein et de la rétine (Gautshisova *et al.*, 1987 ; Courty *et al.*, 1987). Par contre, une forme plus longue de 155 aa fut purifiée du cerveau bovin par Burgess et ses collaborateurs en 1986. Cette forme longue est obtenue après inhibition des protéases endogènes qui excisent normalement la méthionine en 1. Le FGF1 est une protéine non glycosylée d'environ 16 kDa, de point isoélectrique 5,6, parfois appelée "anionic HBGF" ("Heparin Binding Growth Factor") (Lobb, 1988a). La protéine FGF1 est bien conservée entre l'homme, le boeuf, le rat, la souris, le porc et le poulet: 86% à 99% d'homologie de séquence (Halley *et al.*, 1988a ; Goodrich *et al.*, 1989 ; Schnurch et Risau, 1991; Schmidt *et al.*, 1991).

Le FGF2 (*FGF basique*) est également un polypeptide constitué d'une chaîne unique non glycosylée et de poids moléculaire 18 kDa. Alors que le FGF1 est anionique, le FGF2 est cationique et de point isoélectrique 9,6. Des différences dans la région N-terminale sont à l'origine des formes courtes ou longues du FGF2 et donc de la variabilité de son poids moléculaire (29, 24, 22,5 et 21 kDa) (Presta *et al.*, 1988a et b ; Moscatelli *et al.*, 1987). Ces formes sont traduites, comme nous l'avons mentionné précédemment, à partir de codons d'initiation non usuels de type CUG, et sont retrouvées dans le cerveau de rat ou de cobaye.

Une homologie de séquence en acides aminés de 53% a été déduite des séquences nucléotidiques des FGF1 et FGF2 (tableau II). Ces deux facteurs présentent d'autre part une homologie de séquence de 30% avec l'interleukine IL-1 alpha et IL-1 bêta, molécules qui, comme les FGF1 et FGF2, ne possèdent pas de séquence peptide signal (Gimenez-Gallego *et al.*, 1985 ; Thomas *et al.*, 1985). Les FGF1 et 2 utiliseraient un mécanisme de sécrétion similaire à celui de ces interleukines, à savoir une exocytose membranaire indépendante du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Ce type de mécanisme a été démontré pour le FGF2 par Mignatti et collaborateurs en 1992.

Ces deux facteurs de croissance peuvent être phosphorylés sur un résidu sérine en position 108 (Feige et Baird., 1989), et d'après l'étude de leur structure tertiaire, ils ne présentent pas de pont disulfure intramoléculaire (Ago *et al.*, 1991 ; Copeland *et al.*, 1991). La mutagenèse dirigée ou la modification chimique des résidus cystéines des FGF avaient précédemment mis en évidence cette absence de pont disulfure. De plus, la formation putative de ces ponts serait sans conséquence sur l'activité de ces facteurs (Seno *et al.*, 1988). A l'opposé, des séquences peptidiques bien définies jouent un rôle clé dans l'activité biologique des FGF1 et 2. Ainsi, des zones de liaison au récepteur, à l'héparine et à la fibronectine ont pu être déterminées. La structure tridimensionnelle du FGF1 est similaire de celle du FGF2 ; elle s'organise en 12 repliements antiparallèles béta autour de trois axes de symétrie. Le caractère hydrophobe de ces molécules est dû à 9 résidus d'acides aminés disposés autour de l'axe de symétrie interne (Zhu *et al.*, 1991). L'affinité des FGF1 et 2 pour l'héparine et le rôle de cette molécule dans l'activité de ces deux facteurs de croissance seront détaillés plus loin.

2. Les autres protéines de la famille

Outre l'importante homologie de séquence peptidique avec les FGF1 et 2 (tableau II et Fig. 4), les autres FGF présentent également deux cystéines correspondant aux résidus en position 33 et 100 du FGF1 (1-154), ainsi qu'une forte affinité pour l'héparine. Par contre, l'existence de la séquence peptide signal chez 6 autres membres, à l'exception du FGF9, constitue une différence par rapport aux prototypes FGF1 et 2. Cependant, malgré l'absence de cette séquence de sécrétion, le FGF9 est détecté dans le surnageant de culture de cellules transfectées par le ADNc codant pour ce facteur (Miyamoto *et al.*, 1993). Ces FGF possèdent tous une séquence consensus de N-glycosylation. Quelques particularités distinguent cependant certains de ces facteurs. Le FGF3 se lie peu à l'héparine (Paterno *et al.*, 1989), et sa forme longue, initiée au codon leucine, n'est pas sécrétée mais transloquée dans le noyau. Le FGF4 se distingue par un point isoélectrique élevé proche de 11. Les FGF3, FGF4, FGF5 et FGF6 ont été décrits comme oncogènes pour leur activité transformante sur des cellules NIH 3T3 ou leur activation dans certains cancers. Le FGF8 possède des caractéristiques oncogéniques (Kouhara *et*



Figure 4. **Comparaison des séquences protéiques des 9 FGF connus.** Les séquences des protéines humaines (FGF1 à 7, FGF 9) ou murine (FGF8) ont été alignées en ménageant des interstices (-) de façon à faire ressortir les régions de similitude. Les résidus colorés en rouge ou en rose correspondent à des positions où 5 acides aminés ou plus sont respectivement identiques ou similaires. Une région cœur où les FGF présentent de fortes similitudes de séquence est évidente.

al., 1994), et la transformation de BALB/C 3T3 par l'ADNc du FGF9 permet de prédire le potentiel oncogénique du FGF9.

Chez les mammifères une homologie interespèce très importante apparaît pour les séquences peptidiques de FGF. En particulier, il existe entre le FGF3 de l'homme et celui de la souris une homologie de 89% pour la totalité du peptide et de 96% au niveau de la région centrale (Moore *et al.*, 1986).

II. DISTRIBUTION DES FGF

De nombreux travaux portant sur la localisation tissulaire et cellulaire ont montré que ces facteurs possèdent un large spectre de distribution. De même, ces études ont, pour certaines, montré que l'expression de ces facteurs de croissance est régulée en fonction du type cellulaire, du stade de développement embryonnaire et de la différenciation.

A. Localisations tissulaires et cellulaires

1. Localisation des FGF1 et FGF2

Les FGF1 et FGF2 présentent quelques différences au niveau de leur localisation tissulaire (tableau III).

Le FGF2 apparaît comme le facteur le plus ubiquitaire, il est en effet trouvé dans tous les tissus d'origine mésodermique et ectodermique, ainsi que dans de nombreux types cellulaires. Le FGF1 présente une distribution plus restreinte, et sa purification, principalement à partir du cerveau, de l'hypothalamus et de la rétine, a longtemps laissé penser qu'il était spécifique du système nerveux. Cependant, le FGF1 a été isolé ultérieurement à partir d'autres tissus tels que le tissu rénal, osseux et musculaire. Ces deux facteurs de croissance ont été également localisés dans divers tissus tumoraux et lignées cellulaires transformées ou cancéreuses (tableau IV). L'expression des FGF1 et 2 dans le tissu mammaire normal ou tumoral sera analysée dans le paragraphe suivant. Les FGF, et plus particulièrement le FGF2, ont été recherchés dans certains liquides biologiques. Dans le sérum, une forme immuno-réactive de 70 kDa du FGF2 a été rapportée par Mormède et ses collaborateurs en 1985. Takei et ses collaborateurs (1994) ont également mis en évidence du FGF2 dans le sérum de malades atteints de tumeurs malignes diverses dont des cancers du sein. Des molécules apparentées aux FGF

Tableau III. Localisation tissulaire et cellulaire du FGF1 et du FGF2.

FGF1	Tissus	Références
	Cerveau	Thomas <i>et al.</i> (1984)
	Rétine	Courty <i>et al.</i> (1895); Baird <i>et al.</i> (1985c); Jacquemin <i>et al.</i> (1990)
	Os	Hauschka <i>et al.</i> (1986)
	Muscle squelettique	Oliver <i>et al.</i> (1992)
	Rein	Gautschi-Sova <i>et al.</i> (1987)
	Myocarde	Thompson <i>et al.</i> (1986)
	Blastème de régénération	Boilly <i>et al.</i> (1990)
	Tube digestif	Hughes et Hall (1993)
	Cellules	
	Satellites	Alterio <i>et al.</i> (1990)
	Musculaires lisses	Winkles <i>et al.</i> (1987)
	Myocytes cardiaques	Weiner et Swain (1989)
	Gliales	Faucheux <i>et al.</i> (1991)
FGF2	Tissus	
	Cerveau	Gospodarowicz (1974,1975)
	Hypophyse	Böhlen <i>et al.</i> (1984)
	Rétine	Baird <i>et al.</i> (1985c); Cirillo <i>et al.</i> (1990)
	Rein	Baird <i>et al.</i> (1985b)
	Foie	Ueno <i>et al.</i> (1986)
	Coeur	Thompson <i>et al.</i> (1986)
	Muscle squelettique	Kardami <i>et al.</i> (1985)
	Placenta	Sommer <i>et al.</i> (1987)
	Surrénale	Gospodarowicz (1986a)
	Prostate	Story <i>et al.</i> (1987)
	Os	Hauschka <i>et al.</i> (1986)
	Testicule	Bellvé et Feig (1984)
	Cartilage	Klagsbrun et Beckoff (1980)
	Ovaire	Makris <i>et al.</i> (1984)
	Corps jaune	Gospodarowicz (1985)
	Cellules	
	Follicule pituitaire	Ferrara <i>et al.</i> (1987)
	Endothéliales vasculaires	Schweigerer <i>et al.</i> (1987b)
	Fibroblaste	Moscatelli <i>et al.</i> (1986)
	Macrophage	Baird <i>et al.</i> (1985c)
	Pigmentaire rétinien	Schweigerer <i>et al.</i> (1987b)

* Liste non exhaustive de localisation des facteurs FGF1 et FGF2.

Tableau IV. Liste non exhaustive de tumeurs contenant des facteurs de croissance FGF.

Tumeur	Facteurs de croissance	Référence bibliographique
Carcinome épidermoïde	FGF2	Yamamoto <i>et al.</i> , 1991
Tumeur de la tête et du cou	FGF2 FGF3	Thomas <i>et al.</i> , 1993 Sommers <i>et al.</i> , 1990
Astrocytome	FGF1 ; FGF2	Caruelle <i>et al.</i> , 1991
Glioblastome multiforme	FGF1 ; FGF2 FGF1	Stefanik <i>et al.</i> , 1991 Myers <i>et al.</i> , 1993
Méningiome et gliome	FGF1 ; FGF2	Takahashi <i>et al.</i> , 1990
Carcinome du tube digestif	FGF2	Ohtani <i>et al.</i> , 1993
Carcinome gastrique	FGF2	Bordi <i>et al.</i> , 1994
Carcinome du colon	FGF2	Gross <i>et al.</i> , 1993
Cancer de l'oesophage	FGF2	Iida <i>et al.</i> , 1994
Carcinome de la bouche	FGF1	Myoken <i>et al.</i> , 1994
Carcinome hépatique	FGF1 ; FGF2 ; FGF3 ; FGF4 ; FGF5	Leung <i>et al.</i> , 1994
Carcinome rénal	FGF2	Chodak <i>et al.</i> , 1988 Mydlo <i>et al.</i> , 1988
Carcinome de la vessie	FGF2	Allen et Maher, 1993
Phéochromocytome	FGF2	Statuto <i>et al.</i> , 1993
Tumeur parathyroïde	FGF2	Zimering <i>et al.</i> , 1990
Leucémie	FGF2	
Carcinome du col de l'utérus	FGF2	Moscatelli <i>et al.</i> , 1986
Mélanome	FGF2	
Chondrosarcome	FGF1	Caruelle <i>et al.</i> , 1991

ont été détectées dans l'humeur vitrée de l'oeil (Baird *et al.*, 1985a ; Mascarelli *et al.*, 1987), dans le liquide synovial (Hemerman *et al.*, 1987) et l'urine de patients atteints de tumeur rénale ou de la vessie (Chodak *et al.*, 1986, 1988). Dans le sang, des formes circulantes de FGF ont été mises en évidence indirectement grâce à l'identification de trois formes solubles de récepteurs de FGF (Hanneken *et al.*, 1994). En outre, l'expression des FGF peut être régulée en fonction des conditions physiologiques. Une variation du taux de FGF2 a été mise en évidence au cours du développement embryonnaire du rein (Risau et Ekblom, 1986) et du bourgeon de membre de poulet (Munaim *et al.*, 1988). Plus récemment, Mullaney et Skinner (1992) ont montré que ce facteur est régulé en fonction du stade de différenciation et du type cellulaire dans le testicule de rat durant la maturation sexuelle. Dans les cellules médullaires adrénales, un stimulus hormonal contrôle non seulement l'expression génique du FGF2, mais également sa distribution subcellulaire (Michal *et al.*, 1994). Des myocytes cardiaques surexprimant des formes courtes ou longues du FGF2 (initiées au codon AUG ou CUG) montrent de même une localisation subcellulaire différentielle qui pourrait être à l'origine de la diversité fonctionnelle de ce facteur. Le taux du facteur FGF1 varie au cours du développement du cerveau de souris (Thomas *et al.*, 1991).

La distribution des oncogènes de la famille des FGF est relativement différente de celle des FGF1 et 2. En effet, ces oncogènes sont rarement exprimés dans le tissu adulte normal mais sont, par contre, activés durant l'embryogenèse et la tumorigenèse. Des amplifications de FGF oncogènes semblent donc avoir lieu durant les périodes d'intense prolifération.

2. Localisation des autres FGF

Le FGF3 est exprimé pendant la période de mi-gestation de l'embryon de souris et d'une façon particulièrement importante dans les dérivés de l'endoderme primitif (Jakobovits *et al.*, 1986). Le FGF3 est également exprimé lors de la différenciation du cervelet et de la rétine, lors de la formation et du développement de l'oreille interne, ainsi que dans la morphogenèse dentaire (Wilkinson *et al.*, 1989). Ce gène est également activé dans des tumeurs de type mélanome (Adelaïde *et al.*, 1988), carcinome (Zhou *et al.*, 1988), et dans une lignée cellulaire de tératocarcinome (Brookes *et al.*, 1989).

Le FGF4 est exprimé dans des tumeurs diverses telles que le cancer de l'estomac à partir duquel il a été identifié, le sarcome de Kaposi, les tumeurs du foie, les mélanomes et les carcinomes du colon. Ce gène est co-amplifié avec le FGF3 dans de nombreuses tumeurs humaines dont des carcinomes mammaires (Theillet *et al.*, 1989). Par contre, la distribution cellulaire du FGF4 est fortement restreinte. Ce facteur n'a encore été détecté dans aucun tissu adulte normal. Cependant, comme pour le FGF3, le gène est transcrit dans les embryons (Yoshida *et al.*, 1989 ; Basilico *et al.*, 1989). Chez l'homme, le FGF4 est exprimé dans les tumeurs de cellules germinales mâles (Yoshida *et al.*, 1988), et dans une lignée cellulaire de tératocarcinome.

Le FGF5 a été initialement identifié dans un carcinome de la vessie, mais il est également exprimé dans les hépatomes et carcinomes endothéliaux. La première localisation du FGF5 dans le tissu sain fut dans le cerveau néonatal humain (Zhan *et al.*, 1988).

Le FGF6 est exprimé pendant l'embryogenèse (Theillet *et al.*, 1989). Les FGF5 et FGF6 murins sont exprimés au cours de l'embryogenèse ainsi que dans quelques rares tissus adultes (Hebert *et al.*, 1990 ; de Lapeyriere *et al.*, 1990).

Le FGF7, isolé à partir du milieu de culture de fibroblastes embryonnaires humains, a été trouvé ultérieurement dans le derme, et plus précisément dans le stroma sous-jacent au tissu épithélial (Finch *et al.*, 1989), dans le rein, dans le tractus gastro-intestinal, dans le poumon et la glande salivaire (Mason *et al.*, 1994). La distribution des FGF8 et FGF9, découverts récemment, est encore peu connue.

Le FGF8 est exprimé, chez la souris, par la lignée cellulaire SC-3 d'un carcinome mammaire androgéno-dépendant à partir duquel il a été isolé (Tanaka *et al.*, 1992), et pendant l'embryogenèse et la morphogenèse de la souris (Ohushi *et al.*, 1994). Dans cette étude, l'analyse par "Northern-blot" montre que le FGF8 n'est exprimé dans aucun des tissus adultes examinés, alors qu'il joue un rôle essentiel au cours de la gastrulation, du développement cérébral et de la morphogenèse des membres et de la face

Le FGF9, isolé d'un gliome humain, a été détecté également dans le cerveau et le rein de souris (Miyamoto *et al.*, 1993).

B. Dans la glande mammaire normale

L'expression des FGF dans les cellules épithéliales de la glande mammaire humaine a été mise en évidence par Flamm et collaborateurs en 1989. Par des techniques d'immunohistochimie et d'immunoblot, Gomm et collaborateurs (1991) ont localisé le FGF2 dans la glande mammaire normale humaine, et plus précisément dans les cellules myoépithéliales et non dans les cellules épithéliales canaliculaires ou lobulaires. Cette expression myoépithéliale du FGF2 a été confirmée dans des cellules humaines en culture par Ke et collaborateurs en 1993, et dans des cellules myoépithéliales et fibroblastiques de rate par Barraclough et collaborateurs en 1990. Une lignée épithéliale dérivée de glande mammaire normale de rate ne contient pas de FGF2 par d'ARN poly (A) mesuré par "Northern-blot". Cependant, une quantification par hybridation dot-blot montre que le transcrite FGF2 dans les cellules épithéliales représente 15 à 20% du taux exprimé dans les cellules myoépithéliales (Fernig *et al.*, 1993). Cependant, dans cette étude, aucune activité relative à une molécule de type FGF2 n'a été décelée dans cette lignée épithéliale. Quelques éléments de réponse ont été avancés récemment pour lever l'ambiguïté sur la localisation du FGF2 dans la glande mammaire. En effet, Rudland et collaborateurs (1993) ont constaté chez la rate que le FGF2 est associé aux basales des canaux mammaires quiescents et qu'il existe aussi au niveau des cellules épithéliales des canaux en croissance. Le FGF2 est impliqué dans la croissance de l'épithélium mammaire ; les variations de sa localisation dépendent de la structure et de l'état de différenciation de la glande.

En comparaison, le FGF1 a été initialement localisé dans les fibroblastes mais pas dans les cellules myoépithéliales ni dans les cellules épithéliales de la glande mammaire de rate. Une analyse récente par "Northern-blot" de tissus mammaires humains normaux et tumoraux a mis en évidence des taux de FGF1 et FGF2 plus élevés dans le tissu normal que dans le tissu malin (Anandappa *et al.*, 1994). Par contre, Smith et collaborateurs en 1994 ont mis en évidence le FGF1 dans les tumeurs et dans quelques tissus normaux adjacents, mais ils n'en ont pas détecté dans les tissus bénins ni dans les tissus sains. Par contre, le FGF2 a été trouvé dans tous les échantillons de tumeurs bénignes et de tissus sains, mais pas

dans les tumeurs malignes examinées. Ces résultats, en partie contradictoires, rendent difficile la compréhension du rôle de ces facteurs de croissance dans le processus de tumorigénèse mammaire. L'expression des autres membres de la famille des FGF dans la glande mammaire normale est encore peu connue. Les FGF3 et FGF4 ne sont pas exprimés dans les tissus mammaires normaux (Smith *et al.*, 1994). Le FGF7 est décrit actuellement comme étant un bon candidat pour être un facteur régulateur du développement mammaire. En effet, le FGF7 est capable de stimuler la prolifération *in vitro* de cellules épithéliales isolées de glande mammaire de souris (Imagawa *et al.*, 1994b).

C. Dans la tumeur mammaire

Il est généralement admis que la prolifération anormale des cellules tumorales est due, en partie, à la production de facteurs de croissance autocrines que leurs homologues normales ne produiraient pas. Cependant, cette idée manquait d'arguments directs totalement convaincants. En effet, il est actuellement démontré qu'un grand nombre de ces facteurs de croissance sont également produits par les cellules normales (pour revue: Imagawa *et al.*, 1994a). La production de facteurs de croissance n'implique donc pas à elle seule le caractère transformant. Pour comprendre la part de facteurs de croissance tels que les FGF dans le cancer du sein, nous allons procéder d'abord à une étude bibliographique des FGF dans les tumeurs mammaires. Un facteur de croissance dérivé d'une tumeur mammaire humaine et identifié ultérieurement comme étant du FGF2 a été purifié par Rowe et collaborateurs en 1986. Flamm et collaborateurs en 1989 confirment l'expression du FGF2 dans les cellules épithéliales cancéreuses et normales de la glande mammaire humaine. Une étude immunohistochimique sur des biopsies mammaires malignes humaines a permis de localiser le FGF2 dans la composante myoépithéliale de cette glande (Gomm *et al.*, 1991). Par la technique de RT-PCR, Luqmani et collaborateurs (1992) ont également montré la présence du FGF2 dans les biopsies de cancer du sein. Des cellules épithéliales et myoépithéliales transformées dérivées de lésions mammaires bénignes humaines expriment le transcrit et la protéine correspondant au FGF2 (Ke *et al.*, 1993). Cependant, la quantification de l'ARNm ou de la protéine révèle une expression beaucoup plus élevée dans le type myoépithélial que dans le type épithélial (Ke *et*

al., 1993). Dans cette même étude, la technique de fixation de FGF2 radiomarqué à l'iode 125 montre que les cellules épithéliales dérivées de ces lésions bénignes n'expriment ni le récepteur de haute affinité ni les sites de fixation de basse affinité. Par contre, les cellules myoépithéliales dérivées de ces mêmes lésions expriment les 2 types de récepteurs. La conclusion de ce travail était que la différenciation vers le phénotype myoépithélial de cellules en culture est associée à une surexpression de FGF2. Il a été, de plus, suggéré que le FGF2 détecté par immunocytochimie dans les membranes basales du sein proviendrait en partie des cellules myoépithéliales du parenchyme mammaire. Les cellules épithéliales tumorales de glande mammaire de rate expriment également du FGF2 ; l'apparition de ce facteur ainsi que de son récepteur de haute affinité (non ceux de basses affinités) augmentent avec le phénotype malin ; plus précisément en fonction de son pouvoir métastatique.

Le FGF1 a été détecté dans la majorité des échantillons cancéreux (68%) et dans quelques tissus normaux adjacents (57%) alors que les échantillons normaux ou bénins ne contenaient pas de protéine relative au FGF1 (Smith *et al.*, 1994). A l'inverse, le FGF2 était présent dans tous les échantillons normaux et bénins examinés mais dans aucune tumeur. Dans cette étude une seule tumeur exprimait le FGF4 mais aucune ne contenait le FGF3. Après purification sur héparine-Sepharose et tests biologiques sur des fibroblastes NR6 (fibroblastes 3T3 déficients en REGF), il a été montré que le milieu conditionné par des tumeurs mammaires humaines contient du FGF1 (Smith *et al.*, 1994). L'activité biologique FGF1 a été neutralisée par un anticorps anti-FGF1. Une plus forte activité biologique sur les fibroblastes NR6 a été obtenue avec la fraction éluée dans les mêmes conditions que le FGF2. Cependant, l'activité de cette fraction n'a pas été inhibée par des anticorps anti-FGF2 ni par des anti-FGF4. Cette molécule, baptisée par les auteurs facteur de croissance du sein (BGF), est plus efficace que les FGF1 et 2 dans la stimulation de la formation de colonies en agar mou par les NR6 et de l'activité mitogène sur la lignée cellulaire MCF-7 de cancer du sein. L'activité de ce facteur est réduite en présence de FGF suggérant ainsi que ces deux facteurs entrent en compétition pour le même récepteur. Paradoxalement, les milieux conditionnés par différentes lignées cellulaires de cancer du sein ne contiennent aucune activité relative à une

molécule de type FGF. Ce résultat suggère qu'en culture les lignées cellulaires perdent quelques caractéristiques des tumeurs primaires (Smith *et al.*, 1994). En conclusion de cette étude, Smith et collaborateurs avancent l'hypothèse qu'une augmentation de la synthèse et de la séquestration du FGF1 serait l'une des premières caractéristiques du développement d'un cancer du sein. Ceci est en accord avec le résultat relatif à la présence du FGF1 dans le tissu normal adjacent à la tumeur mais non dans les tissus normaux issus de réduction mammoplastique ou les tissus bénins (Smith *et al.*, 1994). A l'opposé, le FGF2 a été trouvé dans les tissus bénins ou normaux adjacents à la tumeur mais pas dans les carcinomes examinés. Le FGF2 a été localisé plus précisément dans les membranes basales des cellules myoépithéliales (Gomm *et al.*, 1991). En sachant que l'une des premières caractéristiques morphologiques du cancer du sein est l'altération de la membrane basale et la perte des cellules myoépithéliales, il devenait logique de penser que l'absence de FGF2 soit associée à la disparition des cellules productrices. Cependant, cette absence de la production du FGF2 par les tumeurs n'est pas le cas général dans le cancer du sein (Anandappa *et al.*, 1994 ; Luqmani *et al.*, 1992). En effet, l'analyse par "Northern-blot" de la production de FGF1 et FGF2 dans des tissus mammaires humains bénins ou cancéreux révèle l'expression de formes normales d'ARNm de FGF1 et FGF2 aussi bien dans les tissus bénins que tumoraux. Comparativement, l'expression des transcrits FGF1 et FGF2 est plus élevée dans les échantillons bénins. Cependant un niveau de FGF2 équivalent ou supérieur à celui des lésions bénignes a été trouvé dans 25% des tumeurs analysées. Dans cette même étude, seulement 11% des tumeurs malignes ne contiennent pas de quantité détectable de FGF1 et 27% de niveau détectable de FGF2. Par contre, une lignée cellulaire épithéliale invasive de cancer du sein MDA-MB-231 exprime l'ARNm du FGF2 à un taux élevé. Tous ces résultats suggèrent que dans certains cancers une population de cellules tumorales pourrait acquérir la capacité d'exprimer un taux élevé d'ARNm du FGF2. Le FGF2 est un facteur angiogène puissant et l'angiogenèse est nécessaire à la croissance tumorale et à la métastase. L'expression du FGF2 par certains sous-clones de cellules épithéliales cancéreuses pourrait donc favoriser l'angiogenèse et la métastase dans le cancer du sein. D'autre part, le taux de FGF2 plus important dans le sérum de la plupart des

patientes atteintes d'un carcinome mammaire semble également indiquer un rôle important du FGF2 dans la tumorigenèse (Takei *et al.*, 1994).

Le FGF3 est le second proto-oncogène découvert en tant que site d'intégration commun du rétrovirus MMTV dans les tumeurs mammaires de souris. Il est devenu important de déterminer comment les homologues humains des gènes int étaient impliqués dans cette pathologie. L'approche la plus directe a consisté à examiner l'état du locus int sur l'ADN de tumeurs du sein et plus précisément à analyser les amplifications et/ou les possibles altérations de ce locus. De telles anomalies indiqueraient de façon indirecte une altération de l'expression génique. L'utilisation de cette stratégie a permis de montrer que le locus int-2 est amplifié 2 à 8 fois dans environ 20% des tumeurs mammaires examinées (Adelaide *et al.*, 1988 ; Lidereau *et al.*, 1988 ; Zhou *et al.*, 1988). Lidereau et collaborateurs (1988) ont mis en évidence une association entre l'amplification du gène int-2 et la récurrence locale de la maladie, alors que Borg et collaborateurs (1989), tout en confirmant ce résultat, montrent en plus une corrélation positive entre cette amplification et l'expression du récepteur aux œstrogènes dans la tumeur mammaire. L'amplification du gène FGF3 dans certains cancers du sein coïncide avec une surproduction de la protéine ; l'ARNm correspondant est décelé dans la majorité des tumeurs où le gène est amplifié (Liscia *et al.*, 1989). Plusieurs formes de la protéine FGF3, traduites à partir de codons d'initiation distincts, présentent des localisations subcellulaires différentes et des activités spécifiques (Acland *et al.*, 1990). L'analyse de la séquence nucléotidique de gènes int-2 de plusieurs carcinomes de sein et leur comparaison avec la séquence de ce gène dans l'ADN d'un placenta normal révèle que la région codante de int-2 est identique dans les 2 types d'ADN (Meyers et Dudley., 1992). Ces résultats impliquent que les cancers agressifs du sein expriment une forme non altérée de la protéine Int-2. L'oncogène int-2 n'est pas transcrit dans la glande mammaire normale de souris et l'intégration du virus MMTV à ce locus active la transcription de ce gène (Dickson *et al.*, 1984). La surexpression de la protéine Int-2 dans des souris transgéniques induit le développement d'hyperplasies mammaires et prostatiques (Muller *et al.*, 1990). L'addition de Int-2 au milieu de culture de cellules épithéliales mammaires quiescentes de souris les induit dans la voie de la prolifération (Dixon *et al.*, 1989).

L'ensemble de ces résultats suggère que malgré le faible pourcentage de cancers mammaires surexprimant l'oncogène int-2, cette amplification mène probablement à la tumorigenèse.

Un autre oncogène de la famille des FGF est parfois également amplifié dans les tumeurs mammaires. Il s'agit de l'oncogène hst-1 codant pour le FGF4. Ce gène est immédiatement adjacent à int-2 sur le chromosome 11 chez l'homme (Adelaide *et al.*, 1988 ; Wada *et al.*, 1988) et sur le chromosome 7 chez la souris (Peters *et al.*, 1989). Hst-1 est transcriptionnellement activé seul ou avec int-2 dans certaines tumeurs mammaires de souris (Peters *et al.*, 1989). Dans les tumeurs mammaires humaines, Theillet et collaborateurs (1989) ont mis en évidence une amplification de l'amplicon contenant les proto-oncogènes int-2 et hst-1. Si l'amplification de int-2 et hst-1 joue un rôle dans le développement de tumeurs mammaires, alors on pourrait s'attendre à ce qu'un changement dans l'expression de l'un ou l'autre de ces gènes soit corrélé avec une amplification du locus. Peu de tumeurs expriment int-2 ou hst-1 avec ou sans amplification génique pour pouvoir analyser cette hypothèse. Le gène FGF6 avec le gène CCND2 spécifiant la cycline D sont également co-amplifiés dans certains cancers du sein (3,6%) (Dib *et al.*, 1994).

En conclusion de l'ensemble des travaux mettant en évidence des facteurs de croissance de type FGF dans le cancer du sein, la plupart des auteurs tendent à impliquer ces facteurs dans la tumorigenèse mammaire en tant que mitogènes puissants.

La tumorigenèse mammaire semble impliquer également les récepteurs des FGF. Des sites de fixation du FGF2 ont été décrits dans des cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses de rate (Fernig *et al.*, 1990), dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Briozzo *et al.*, 1991 ; Peyrat *et al.*, 1992a et b) et dans des biopsies de cancer du sein (Peyrat *et al.*, 1991). Des amplifications des gènes flg et bek spécifiant respectivement les récepteurs R1 et R2 du FGF ont été mises en évidence dans 12% d'une population de cancers du sein (Adnane *et al.*, 1991). Dans la plupart des tumeurs amplifiant flg, le récepteur R1 du FGF est surexprimé (Theillet *et al.*, 1993 ; McLeskey *et al.*, 1994). Selon Fernig et collaborateurs (1990 ; 1992 ; 1993) les cellules épithéliales de la glande mammaire normale et de tumeurs bénignes de rate ne portent pas de récepteurs au FGF alors que des cellules

malignes en sont largement pourvues. Comme nous l'avons précédemment décrit pour le FGF lui-même, ces travaux ont pu établir une corrélation entre l'expression des récepteurs au FGF et le phénotype malin des tumeurs mammaires. Cependant, la production du FGF et de son récepteur n'explique pas à elle seule le potentiel tumorigène des cellules mammaires puisque les cellules normales en sont également pourvues. Les sites de fixation de basse affinité des FGF (Moscatelli, 1987) pourraient également intervenir dans le processus de cancérogenèse. Les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) qui constituent ces sites de faible affinité sont présents dans les cellules épithéliales mammaires peu métastatiques mais n'existent pas dans les cellules métastatiques. Cette absence des "récepteurs" de basse affinité du FGF dans les cellules mammaires les plus malignes suggère que des altérations dans les HSPG pourraient jouer un rôle clé dans la contribution du FGF2 à la prolifération et à la dissémination des tumeurs mammaires malignes. Le résultat inverse est rapporté par Allen et collaborateurs (1993) dans le carcinome invasif de la vessie.

Contrairement aux résultats obtenus par Fernig et collaborateurs (1990, 1992, 1993) sur l'expression des FGF R dans les tissus mammaires sains et tumoraux chez la rate, Luqmani et collaborateurs (1992) rapportent des résultats variables et moins nets dans les tissus et les lignées cellulaires humaines. Deux types de récepteurs aux FGF (R1 et R2) ont été quantifiés par RT-PCR. Les taux de R1 et de R2 étaient plus faibles dans les tissus cancéreux que dans les tissus normaux ; les niveaux d'expression de R1 tendaient à être plus élevés dans les tumeurs possédant des récepteurs aux œstrogènes. La partie extracellulaire du récepteur FGF contient 3 domaines de type immunoglobuline (Ig). L'amplification par PCR des domaines Ig, le plus externe ou le plus proche de la région transmembranaire, montre que, même si les 2 formes tronquée et non tronquée du R1 coexistent dans les tissus normaux et cancéreux, la proportion des ARNm du récepteur tronqué est significativement plus élevée dans les cancers. Les formes tronquées et non tronquées des récepteurs FGF sont des isoformes obtenues par épissage alternatif affectant les 3 domaines structuraux. De hauts niveaux d'ARNm de la forme non tronquée du récepteur R1 ont été trouvés dans les cellules cancéreuses ZR-75-1 et des niveaux plus faibles dans les cellules cancéreuses T-

47D et les cellules normales (indécelables dans la lignée cancéreuse MCF-7). Les ARNm de la forme tronquée du R1 suivent le même plan de distribution que la forme non tronquée avec l'exception que la forme tronquée est très faiblement exprimée dans la lignée cancéreuse ZR-75-1 (celle-là même qui exprime le plus haut niveau de la forme non tronquée). D'autre part, la comparaison de l'expression des récepteurs R1 et R2 et des 2 isoformes de R1 révèle une expression différentielle entre des lignées cellulaires de cancer du sein et des cellules immortalisées dérivées de sein normal. Le R2 est exprimé dans certaines lignées épithéliales cancéreuses (ZR-75-1 et MCF-7) et pas dans d'autres (T-47D et MDA-MB-231) et dans certaines cellules normales (HBRSV 1.6.1 et 184B5) et pas dans d'autres (HBL-100 et 184A1).

En conclusion de ces résultats et du fait de leur hétérogénéité (tissus, cellules et cellules/cellules), il n'est pas possible de corréler l'expression des récepteurs R1 et R2 avec la tumorigenèse mammaire. Pour la même raison aucune conclusion ne peut être avancée concernant le sous-type de récepteur impliqué. Néanmoins ces résultats suggèrent que le rôle des FGF dans la malignité pourrait être dû à une production de récepteurs "aberrants". Dans l'étude de Luqmani et collaborateurs (1992) et malgré le faible nombre des tumeurs analysées, il apparaît une corrélation positive entre l'expression du récepteur aux œstrogènes et celle des ARNm du FGF R2. A l'inverse, dans l'étude de Peyrat et collaborateurs (1992b), des corrélations négatives entre le nombre total de sites de fixation du FGF et les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone sont mises en évidence. Dans une étude plus récente, il est montré que 9% des tumeurs mammaires amplifient le gène du récepteur R1 et 15% des tumeurs le surexpriment (Jacquemier *et al.*, 1994). Ce récepteur est également exprimé dans les tissus normaux au niveau des cellules épithéliales. Cependant, le tissu normal exprime un taux basal d'ARNm du R1, alors que les tumeurs en expriment plus (85,5% des tumeurs) ou autant (14,5% des tumeurs). Sur les 110 tumeurs analysées par cette équipe, les phénomènes d'amplification et de surexpression n'ont pas pu être corrélés très exactement, certaines tumeurs surexprimant R1 peuvent en effet ne pas montrer d'amplification génique et vice-versa. L'analyse de l'expression des 4 récepteurs du FGF (R1, R2, R3 et R4) dans la lignée MDA-MB-134 (RE+) indique une expression importante de

R1 et une amplification du gène alors que le R4 est très abondant mais sans amplification génique (McLeskey *et al.*, 1994). Sur les 23 lignées de carcinome de sein étudiées, toutes expriment l'ARNm d'au moins un récepteur de FGF et plusieurs transcrivent activement un récepteur en particulier. Le R4 est exprimé dans la lignée cancéreuse MCF-7 (Lehtola *et al.*, 1992) et est également amplifié dans les tumeurs mammaires (Jaakkola *et al.*, 1993).

A la suite de l'ensemble de ces résultats, il apparaît qu'une dérégulation de l'expression des FGF R et la production de formes anormales de ces récepteurs pourraient contribuer à la prolifération incontrôlée de certaines tumeurs. En plus des surexpressions et des amplifications géniques de ces récepteurs, il pourrait se produire l'activation d'une commutation ("switch") exonique dans les gènes des FGF R. Cette activation a déjà été constatée dans les cellules épithéliales de prostate où elle est associée à l'indépendance des cellules vis-à-vis du stroma et à la malignité (Yan *et al.*, 1993). Des altérations structurales (troncature du C-terminale) et des variations dans l'affinité des récepteurs pour le FGF constatées par Kobrin *et al.*, (1993) pourraient jouer un rôle dans la tumorigenèse. Une forme tronquée soluble du FGF R2 a été mise en évidence dans le milieu de culture de cellules cancéreuses gastriques (Kishi *et al.*, 1994). La transfection de NIH 3T3 par une version tronquée dans la région carboxy-terminale induit une forte activité transformante dans ces cellules (Itoh *et al.*, 1994). Kouhara et collaborateurs (1991) rapportent que la transfection des cellules CHO ("Chinese Hamster Ovary cells") par un clone FGF R de tumeur mammaire délété de 2 acides aminés (aa) dans le domaine extracellulaire, substitué pour 1 aa dans la région C-terminale et contenant l'insertion de 12 aa en N-terminal induit une augmentation de la fixation du FGF2 à la surface de ces cellules. L'inhibition du gène du récepteur R1 dans les mélanocytes et les mélanomes malins humains conduit à une inhibition de la prolifération accompagnée des signes indicatifs de différenciation (Becker *et al.*, 1992). Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres cancers.

Dans le domaine des facteurs de croissance, la thérapie anti-cancéreuse consiste en général à inhiber l'action des facteurs de croissance eux-mêmes ou la fonction de leurs récepteurs. Expérimentalement plusieurs voies d'approche ont été abordées: l'utilisation d'anticorps anti-facteur de croissance ou anti-récepteur de ce

facteur, l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens contre l'expression du facteur ou du récepteur, l'utilisation de toxines associées aux facteurs et qui, une fois internalisées, perturbent la machinerie cellulaire, et parmi d'autres moyens encore, l'utilisation de substances inhibant l'interaction des facteurs de croissance avec leurs récepteurs. La suramine, un dérivé polysulfonate du rouge trypan, utilisée par le passé comme agent anti-trypanosome, trouve actuellement un second intérêt en tant qu'agent anti-tumoral (Stein *et al.*, 1989 ; Myers *et al.*, 1990 ; La Rocca *et al.*, 1990). L'un des rôles de la suramine dans l'effet anti-prolifératif consiste en sa capacité d'interférer dans l'activité biologique des facteurs de croissance via leur fixation au récepteur et/ou via une modification du récepteur (Coffey *et al.*, 1987). Il a été montré que la suramine inhibe la fixation à leurs récepteurs de facteurs aussi divers que l'IGFI, l'EGF, le PDGF, l'IL2, le TGF β et le FGF2 (Pollak et Richard, 1990 ; Hosang, 1985 ; Mills *et al.*, 1990). Dans le cas particulier du cancer du sein, l'utilisation expérimentale et clinique de cette substance a aboutit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et a contribué à identifier les facteurs impliqués dans la croissance et la néovascularisation tumorales. Ainsi Foekens et collaborateurs (1992) ont montré sur des lignées cellulaires de cancer du sein une réversion de l'action inhibitrice de la suramine par addition de FGF2 au milieu de culture. De même, dans un réticulosarcome produisant de hauts niveaux de FGF2, Pesenti et collaborateurs (1992) réussissent à inhiber *in vivo* les effets anti-prolifératifs et anti-angiogénique de la suramine par administration de FGF2 exogène. En sachant que le FGF2 joue un rôle clé dans la néovascularisation (Folkman *et al.*, 1988) et la croissance tumorale (Hori *et al.*, 1991), ces travaux mettent en évidence, de façon indirecte, un rôle pour le FGF2 dans la tumeur. Les différentes voies d'action des FGF dans le processus de tumorigenèse feront l'objet du chapitre V.

Au long de cette bibliographie non exhaustive sur les FGF et leurs récepteurs dans le cancer du sein, nous avons noté quelques contradictions dans les résultats entre différents groupes. Ces contradictions empêchent toute conclusion générale sur la relation FGF/cancer mammaire mais tendent néanmoins à impliquer ce facteur dans la croissance de la tumeur et l'angiogenèse tumorale. La diversité des types de cancers mammaires, le faible nombre des tumeurs analysées et la diversité des méthodes utilisées peuvent être autant de raisons à la divergence des résultats.

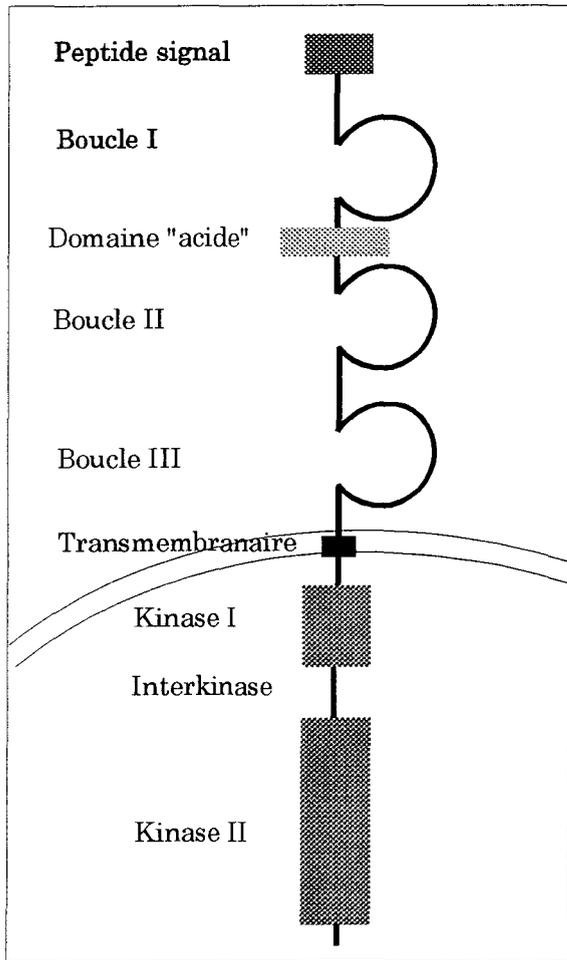


Figure 5. Représentation schématique de la structure des récepteurs des FGF.

Les récepteurs des FGF présentent une structure extracellulaire en trois boucles "immunoglobuline" terminées par un peptide signal. Le domaine catalytique est constitué de deux domaines kinases séparés par une séquence interkinase. Le récepteur est ancré dans la membrane par un domaine transmembranaire. Un domaine acide est présent entre la première et la deuxième boucle.

D'après Coulier et al., 1992.

III. LES RECEPTEURS DES FGF: STRUCTURE PROTEIQUE ET GENIQUE

Les activités biologiques des FGF sont assurées par deux classes de sites de fixation: des sites de haute affinité ($K_d = 10\text{-}600\text{ pM}$) et des sites de basse affinité ($K_d = 2\text{-}20\text{ nM}$). Les sites de haute affinité sont des récepteurs membranaires liant spécifiquement les FGF. Le spectre de distribution de ces récepteurs est assez large et comprend des types cellulaires aussi divers que des fibroblastes (Olwin et Hauschka, 1986 ; Huang et Huang, 1986), des myoblastes (Olwin et Hauschka, 1986), des cellules endothéliales (Friesel *et al.*, 1986), des cellules épithéliales du cristallin (Moenner *et al.*, 1986, 1987), des cellules de phéochromocytome de rat (Neufeld *et al.*, 1987). Ces récepteurs ont été localisés également dans différents tissus: le cerveau de boeuf (Courty *et al.*, 1988), le placenta de souris (Hondermarck *et al.*, 1990), des tissus d'origine nerveuse, mésenchymateuse ou épidermique (Wakana *et al.*, 1991). Les sites de basse affinité sont des protéohéparanes sulfates localisés dans la membrane cellulaire, la matrice extracellulaire (Burgess et Maciag, 1989 ; Bashkin *et al.*, 1989) et dans les membranes basales de vaisseaux sanguins, de la cornée et de la capsule du cristallin en particulier (Jeanny *et al.*, 1987 ; Gospodarowicz *et al.*, 1987 ; Folkman *et al.*, 1988 ; Vigny *et al.*, 1988.). Pour ces 2 types de récepteurs le nombre de sites par cellule varie en fonction du type cellulaire: de 5000 à $2 \cdot 10^6$ pour les hautes affinités et de $5 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^6$ pour les basses affinités. A quelques exceptions près, la plupart des travaux tendent à prouver que la co-existence de ces deux récepteurs est indispensable à la transduction du signal FGF. Après fixation du FGF, le récepteur membranaire transmet le signal à la cellule grâce à son activité tyrosine kinase alors que le "récepteur" basse affinité semble jouer un rôle préalable dans la fixation même du ligand.

A. Haute affinité

Les récepteurs des FGF sont des glycoprotéines transmembranaires composées globalement de 3 domaines (Fig. 5). 1. Le domaine intracytoplasmique subdivisé en deux domaines tyrosine kinase séparés par une séquence interkinase de 14 acides aminés. Ce domaine de taille variable comprend la région C-terminale

contenant les résidus tyrosine. 2. Le domaine transmembranaire de 20 aa permettant l'ancrage dans la membrane cellulaire. 3. La région extracellulaire fixant le ligand et formée de domaines de type immunoglobuline. Dans la forme à 3 boucles Ig un domaine acide (formé d'acide aspartique ou glutamique) sépare les boucles I et II. Cette région extracellulaire N-terminale est également de taille variable (2 ou 3 boucles Ig) et comprend 6 à 9 sites de N-glycosylation. Ces particularités structurales caractérisent une famille de 4 récepteurs: R1-R4 ayant une homologie de séquence importante (56 à 71%). Néanmoins, des formes solubles de FGF R ont également été décrites (Burrus *et al.*, 1991). Les récepteurs membranaires sont des protéines glycosylées (Feige et Baird, 1988) dont le poids moléculaire apparent est de 125 à 165 kDa. La glycosylation semble nécessaire à la fonction du récepteur et en particulier pour la fixation des FGF. En effet, l'utilisation d'endoglycosidases perturbe fortement la liaison du ligand. En général, ces récepteurs lient indifféremment le FGF1 et le FGF2 (Neufeld et Gospodarowicz, 1986 ; Olwin et Hauschka, 1986 ; Friesel *et al.*, 1986). Néanmoins, des récepteurs de forte affinité pour l'une des 2 formes de FGF ont été mis en évidence (Halaban *et al.*, 1987). Il semblerait par ailleurs que les récepteurs possédant les plus faibles poids moléculaires soient plus affins pour le FGF1 tandis que l'affinité des formes de hauts poids moléculaires est plus importante pour le FGF2 (Neufeld et Gospodarowicz, 1986). La grande variabilité du poids moléculaire du récepteur est due, pour partie, à une glycosylation plus ou moins importante qui expliquerait aussi l'hétérogénéité des constantes de dissociation (10-600 pM).

L'affinité des FGF pour leurs récepteurs est un problème complexe puisque plusieurs facteurs peuvent se lier à un même récepteur et qu'un facteur peut activer plusieurs récepteurs (tableau V). Cette double redondance reste pour le moment caractéristique des FGF et il en résulte que la liaison des FGF à leurs récepteurs montre une faible spécificité des FGF R vis-à-vis de leurs ligands. Les 4 FGF R humains sont spécifiés par 4 gènes distincts dont la localisation chromosomique, la taille des transcrits et des protéines obtenues sont reportées dans le tableau VI. Des épissages alternatifs des gènes des FGF R1 et R2 permettent d'obtenir plusieurs isoformes de chacun de ces récepteurs. Les isotypes obtenus peuvent différer dans leur région extracellulaire par le nombre de boucles

Tableau V. Liaison des FGF à leurs récepteurs.

Récepteurs	Ligands
FGFR-1	FGF1, FGF2, FGF4
FGFR-2	FGF1, FGF2, FGF4, FGF7
FGFR-3	FGF1, FGF2
FGFR-4	FGF1, FGF4, FGF6

D'après Bradshaw R. et al., 1994

Tableau VI. Localisation chromosomique, ARNm et protéines FGF-R

FGF-R	Localisation	ARNm (kb)	Protéine (kDa)
FGF-R1	8p12	4,2 ; 4,3	150
FGF-R2	10q26	4,4	135
FGF-R3	4p16.3	4,5 ; 7,5	135
FGF-R4	5q35	3	110

D'après Partanen A.M. et al. 1992

de type immunoglobuline (2 ou 3), la composition du 3ème domaine Ig et la présence ou non du domaine acide et/ou des résidus arginine-méthionine localisés en aval de cette région acide ainsi que de la séquence signal de sécrétion. Dans la région cytoplasmique, les isoformes peuvent se distinguer par la présence ou non des résidus thréonine-valine dans la séquence jouxtant la membrane et par la taille de cette région C-terminale. La diversité de la séquence C-terminale pourrait être à l'origine d'une interaction avec des substrats spécifiques à chaque type de kinase (Jaye *et al.*, 1992). La variabilité dans la région extracellulaire affecte l'affinité des récepteurs pour leurs ligands. La composition de la 3ème boucle immunoglobuline est particulièrement variable et semble porter la spécificité de liaison. Le 3ème domaine "Ig-like" du R1 peut être spécifié par 3 exons (IIIa, IIIb, IIIc) épissés alternativement au niveau du gène. L'épissage alternatif génère des isoformes membranaires à l'exception de la forme soluble du récepteur R1 obtenu par le transcrit contenant l'exon IIIa. Le FGF R1 IIIc lie le FGF1, le FGF2 et le FGF4 avec la même affinité alors que le FGF R1 IIIb lie le FGF1 avec une affinité 50 fois supérieure à celle qu'il présente pour le FGF2 (Werner *et al.*, 1992).

Les différentes formes du FGF R1 ont été caractérisées chez l'homme (Ruta *et al.*, 1988, 1989 ; Hou *et al.*, 1991) et d'autres espèces (souris, rat, poulet, drosophile). En outre, plusieurs isotypes de FGF R1 peuvent être présents sur un même type cellulaire: Hou et collaborateurs (1991) ont caractérisé des variants de FGF R1 au niveau des 3 domaines structuraux extra/intracytoplasmique et juxtamembranaire sur des cellules d'hépatomes humains. Actuellement 6 formes différentes de FGF R1 sont connues (Dell et Williams, 1992 ; Duan *et al.*, 1992 ; Eisenmann *et al.*, 1991 ; Fujita *et al.*, 1991 ; Hou *et al.*, 1991). Certaines de ces isoformes pourraient jouer un rôle dans la modulation de l'activité des récepteurs. Par exemple, le FGF R1 contenant 2 boucles "Ig-like" serait associé aux caractères malin et transformé (Yan *et al.*, 1992 ; Yamaguchi *et al.*, 1994), tandis que les formes sécrétées ou tronquées dans le domaine kinasique seraient antagonistes de ces caractères (Duan *et al.*, 1992). L'isoforme FGF R1 IIIb lie préférentiellement le FGF7 et le FGF1 mais pas le FGF2 tandis que le variant IIIc présente l'affinité la plus élevée pour le FGF2 (Miki *et al.*, 1992). Un autre variant du 3ème domaine "Ig-like" lie le FGF1 avec une forte affinité mais pas le FGF2 (Dell *et al.*, 1992).

Le gène du FGF R2 est structuralement très proche du gène du FGF R1 et subit également des épissages alternatifs à l'origine d'une diversité de récepteurs (Champion-Arnaud *et al.*, 1991). La structure en 3 exons alternatifs est conservée et la composition du 3ème domaine "Ig-like" du FGF R2 dépend aussi des exons épissés (IIIa, IIIb, IIIc). Les études sur les variants du 3ème domaine Ig du FGF R2 démontrent également un certain niveau de spécificité de liaison du ligand. Les FGF1, 2, 4 et 7 se lient avec différentes affinités à 3 isoformes de ce récepteur (Mansukkani *et al.*, 1992 ; Miki *et al.*, 1992 ; Yayon *et al.*, 1992). La 2ème boucle immunoglobulinique du FGF R2 contribue également à spécifier l'affinité de liaison pour ce récepteur (Johnson *et al.*, 1991 ; Miki *et al.*, 1992 ; Yayon *et al.*, 1992 ; Zimmer *et al.*, 1993 ; Cheon *et al.*, 1994).

Plusieurs équipes ont caractérisé le FGF R2 chez l'homme (Dionne *et al.*, 1990 ; Houssaint *et al.*, 1990 ; Hattori *et al.*, 1990), la souris et le poulet. Des études sur des cellules en culture ou divers tissus tendent à démontrer que les différents FGF R et leurs isoformes sont exprimés différenciellement de façon tissu spécifique (Patstone *et al.*, 1993 ; Yazaki *et al.*, 1993). Au cours du développement embryonnaire de souris, les FGF R1 et FGF R2 sont détectés dans l'ectoderme primitif puis dans les tissus dérivés du mésoderme et du neurectoderme (Orr-Urtreger *et al.*, 1991). Cependant, une distribution préférentielle des transcrits FGF R1 est observée dans les mésenchymes et des FGF R2 dans les épithéliums. Concernant les isoformes du FGF R1, le IIIb est présent dans la peau alors que les formes IIIc sont réparties de façon plus ubiquitaire (Werner *et al.*, 1992). De même, si les formes IIIb du FGF R2 sont spécifiques des tissus de type épithélial, les formes IIIc sont quant à elles plus largement distribuées (Miki *et al.*, 1992). L'incorporation de l'exon IIIa lors de l'épissage des messagers introduit un codon stop en phase ainsi que des sites de polyadénylation ; ces messagers permettraient la traduction de formes sécrétées et constituées de la majeure partie du domaine extracellulaire (Johnson *et al.*, 1991). Des messagers capables de coder pour une forme sécrétée constituée de la 1ère boucle immunoglobuline précédée du peptide signal ont également été décrits pour le FGF R1 (Eisenmann *et al.*, 1991). Par ailleurs, des formes délétées dans le domaine intracellulaire ont été décrites pour le FGF R1 et FGF R2. Hou et collaborateurs (1991) ont caractérisé un FGF R1, délété

d'une grande partie du domaine kinase, dont la fonction kinase aurait disparu. Il est vraisemblable que ce variant ait un rôle régulateur négatif. Des délétions moins importantes du domaine C-terminal ont aussi été décrites pour le FGF R2 (Hattori *et al.*, 1990 ; Champion-Arnaud *et al.*, 1991). Ces délétions n'affectent pas le domaine catalytique mais impliquent les régions régulatrices négatives communément retrouvées en aval du site catalytique. Contrairement à ce qui a été postulé pour le FGF R1, ces délétions pourraient donc avoir un rôle d'activation de la fonction kinase (Champion-Arnaud *et al.*, 1991). Les modifications précédemment citées telles que la présence ou non du dipeptide Arg-Met (entre la boîte "acide" et la 2ème boucle "Ig-like" du FGF R1) et du dipeptide Thr-Val (au niveau du domaine juxtamembranaire des FGF R1 et FGF R2) pourraient avoir une importance considérable sur la régulation de l'activité de ces kinases à tyrosine. Eisenmann et collaborateurs (1991) suggèrent deux rôles possibles pour les formes délétées des portions intramembranaire et intracytoplasmique, ces récepteurs sécrétés pourraient servir de transporteurs pour les FGF dépourvus de la séquence signal de sécrétion. Ces récepteurs tronqués pourraient aussi, par piégeage des FGF libres, moduler la réponse des cellules cibles aux FGF. A l'opposé, le rôle des formes délétées du domaine kinase, incapables de transmettre le signal, localisées dans divers tissus dont la glande mammaire, le système nerveux central (SNC) et le coeur (Luqmani *et al.*, 1992 ; Asai *et al.*, 1993) reste inconnu. La combinaison des différents variants des FGF R1 et FGF R2 permet le foisonnement d'un nombre considérable de formes potentielles de ces récepteurs. Selon un grand nombre d'auteurs, ces combinaisons différentielles qui constituent les isoformes de récepteurs aux FGF sont de nature à affecter l'affinité de la liaison avec le ligand, l'oligomérisation de la molécule, sa localisation sur la cellule, son métabolisme ainsi que le signal de transduction.

Le FGF R3 a été mis en évidence chez l'homme (Keegan *et al.*, 1991 ; Partanen *et al.*, 1991) et d'autres espèces (la souris et le poulet). Chez l'homme, ce récepteur est exprimé dans le cerveau, dans le rein, le poumon et l'intestin grêle (Thomson *et al.*, 1991). Des variants du FGF R3 ont été trouvés dans les mêmes organes chez la souris et aussi dans la peau (Chellaiyah *et al.*, 1994). Une forme du FGF R3 correspondant aux variants épissés FGF R1, 2 et 4 contenant l'exon IIIc a

été décrite récemment par Ornitz et Leder en 1992. Cette forme de FGF R3 est préférentiellement activée par le FGF1 et FGF4, peu par le FGF2 et pas du tout par le FGF5. En 1994, Chellaiah et collaborateurs ont caractérisé un autre variant du FGF R3 de souris, celui-ci correspond aux formes alternativement épissées des FGF R1 et 2 contenant l'exon IIIb. Ces auteurs ont également montré que ce variant du FGF R3 ne fixait ni le FGF2 ni le FGF7 mais exclusivement le FGF1. Le FGF R4 a été caractérisé dans des cellules leucémiques humaines (Partanen *et al.*, 1991). En outre, ces auteurs ont montré que ce récepteur est aussi exprimé au cours du développement embryonnaire humain dans les tissus dérivés de l'endoderme et du mésoderme alors que le système nerveux en est dépourvu.

La même distribution du FGF R4 a été observée chez la souris (Starck *et al.*, 1991). Par contre chez le pleurodèle au stade du bourgeon caudal, des transcrits FGF R4 ont été localisés dans des tissus nerveux (Shi *et al.*, 1992). En 1992, Vainikka et collaborateurs décrivent le FGF R4 comme étant un membre présentant de nouvelles caractéristiques au niveau de la structure génique, de la fixation du ligand et de la transduction du signal mais pas de variants alternativement épissés. Des variants du FGF R4 ne montrant pas d'épissage alternatif ont été découverts par Ornitz et Leder (1992). Le FGF R4 est capable de lier plusieurs membres de la famille FGF (FGF1, 4 et 6) (tableau V), cependant son affinité la plus importante serait pour le FGF1 et il ne fixerait pas le FGF2 (Partanen *et al.*, 1991). La liaison des FGF à leurs récepteurs est facilitée par des glycoprotéines spécifiques constituant les sites de liaison de basse affinité.

B. Basse affinité

Les FGF partagent la propriété de se lier spécifiquement et avec une forte affinité à l'héparine et aux héparanes sulfates. La signification biologique de cette caractéristique fut comprise depuis la découverte des héparanes sulfates au niveau des surfaces cellulaires et de la matrice extracellulaire (Gallagher *et al.*, 1986 ; Kjellen et Lindahl, 1991). Ces héparanes sulfates sont présents sur les cellules sous la forme de protéoglycanes dont les chaînes polysaccharidiques sont liées de façon covalente au corps protéique (HSPG).

L'isolement d'un gène codant pour un récepteur de basse affinité du FGF2 (Kiefer *et al.*, 1990) a permis d'assimiler ce récepteur au syndécan, une protéine transmembranaire déjà connue (Saunders *et al.*, 1989). C'est une protéine de 309 résidus d'acides aminés dont la partie extracellulaire comporte un site de glycosylation lié aux asparagines et 5 sites d'attachement de glycosaminoglycanes occupés principalement par des héparanes sulfates (Kiefer *et al.*, 1991). A proximité du domaine transmembranaire, la partie extracellulaire du syndécan présente un site de clivage protéolytique alors que la partie la plus éloignée de ce domaine contient le peptide signal. Le domaine intracellulaire du syndécan est constitué par 34 résidus bien conservés entre les espèces et les différents membres de la famille de ces protéoglycanes.

Il existe principalement 2 classes d'HSPG membranaires, les syndécans qui sont ancrés dans la cellule par un domaine transmembranaire du corps protéique (Bernfield *et al.*, 1992) et les glypicans ancrés dans la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI-HSPG) (David *et al.*, 1990 ; Stipp *et al.*, 1994). Une quantité faible (5%) de FGF2 présente dans la matrice extracellulaire (MEC) est liée à des HSPG de type GPI-HSPG (Bashkin *et al.*, 1992). Le bétaglycan est un autre type de protéohéparane sulfate membranaire constituant le récepteur type III du TGF β (Andres *et al.*, 1992). Les héparanes sulfates de la MEC et des membranes basales sont liés à un protéoglycane nommé le perlecan (Murdoch *et al.*, 1992). Mais il n'est peut-être pas impossible que des HSPG membranaires soient présents dans la MEC. Par des expériences sur des cellules CHO mutantes pourvues de FGF R de haute affinité mais dépourvues d'HSPG membranaires, Yayon et collaborateurs (1991) ont montré que les cellules mutées ne fixent le FGF que si de l'héparine ou des héparanes sulfates sont ajoutés au milieu de culture des cellules. Il apparaissait à travers ces expériences que la présence des sites de basse affinité était indispensable à la liaison du FGF à son récepteur tyrosine kinase. Le rôle exact des HSPG dans la fixation du FGF reste à préciser, mais plusieurs hypothèses ont été avancées. Selon Yayon et collaborateurs (1991), les HSPG induiraient des changements conformationnels du FGF nécessaires à sa liaison aux récepteurs de haute affinité. Par contre, Bashkin et collaborateurs (1992) confèrent aux HSPG un rôle de réservoir à FGF. Dans ce modèle, le FGF pourrait être libéré

de la matrice extracellulaire par des endoglycosidases, des protéases ou bien des phospholipases C spécifiques des glycosylphosphatidylinositol.

IV. DEVENIR DU LIGAND ET TRANSDUCTION DU SIGNAL

Comme nous l'avons précédemment mentionné, les études de fixation des FGF ont révélé l'existence de 2 types de sites: les sites de basse et de haute affinité. Les analyses par Scatchard suggèrent que la fixation du FGF2 aux HSPG, constituant les sites de basse affinité, est sensible aux sels. La fixation de ce facteur au récepteur tyrosine kinase, site de haute affinité, est quant à elle insensible aux sels mais labile à l'acidité (Moscatelli, 1987 ; Nugent et Edelman, 1992). Par ailleurs, la fixation du FGF2 aux sites de basse affinité est sensible à l'héparinase et à la compétition par de l'héparine exogène (Fernig *et al.*, 1992). Pour la plupart des cellules étudiées *in vitro* dont certaines cellules mammaires (Fernig *et al.*, 1992, 1993), le nombre des sites HSPG est 50 fois supérieur à celui des FGF R. Plusieurs types d'HSPG peuvent coexister sur un même type cellulaire: dans le cas des cellules myoépithéliales mammaires de rat, 3 constantes de dissociation différentes ont été trouvées. L'intervention des polysaccharides dans le changement de conformation du FGF, indispensable à sa reconnaissance par les FGF R, pourrait expliquer en partie le rôle des HS dans l'activité mitogène du FGF2 (Yayon *et al.*, 1991 ; Rapraeger *et al.*, 1991). D'autre part, la formation de dimères de FGF1 et FGF2 en présence de polysaccharides sulfatés (Ornitz *et al.*, 1992 ; Zhu *et al.*, 1993) pourrait faciliter l'activation du FGF R/kinase. L'induction par les HSPG du changement de conformation et de la dimérisation des facteurs de croissance serait suffisante pour conduire au processus d'activation des FGF R et à la genèse du signal de transduction. L'activation des récepteurs tyrosine kinase des FGF consiste en la formation d'homodimères et d'hétérodimères de récepteurs capables de s'autophosphoryler et de transphosphoryler leur vis-à-vis (Ullrich et Schlessinger, 1990 ; Bellot *et al.*, 1991). Les hétérodimères peuvent être constitués par deux types de récepteurs différents (FGF R1 et FGF R2 par exemple) ou de variants d'un même type (formes à 2 ou 3 domaines Ig). Les mécanismes induits par l'activation des récepteurs haute affinité du FGF ne sont pas complètement

élucidés. Cependant, plusieurs voies de transduction du signal, dépendant du type cellulaire et de la réponse induite par le FGF (prolifération, survie, différenciation) ont été caractérisées.

Pour la réponse mitogène plusieurs modes d'activation du signal FGF sont décrits. La phospholipase C γ (PLC γ) est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du phospho-inositol en diacylglycérol et en inositol phosphate libre qui en retour active la protéine kinase C et augmente le taux de calcium intracellulaire. Cette cascade d'événements est impliquée dans la réponse cellulaire à différents facteurs de croissance. Dans le cas de la réponse au FGF, la mise en jeu de cette voie se trouve controversée par des résultats contradictoires dépendant du type cellulaire étudié. La PLC γ , capable de s'associer aux récepteurs des FGF au niveau d'un résidu phosphotyrosine situé dans la partie C-terminale (Mohammadi *et al.*, 1991), est un substrat cytoplasmique des FGF R (Burgess *et al.*, 1990). La phosphorylation de cet enzyme par les FGF R et l'activation consécutive de la voie des inositides seraient mises en jeu dans les fibroblastes 3T3 mais pas dans les cellules CHO ("Chinese Hamster Ovary cells") (Hicks *et al.*, 1989). La voie des inositides ne serait pas impliquée dans la mitogenèse. En effet, l'activité mitogène du FGF n'est pas perturbée lorsque la phosphorylation de la PLC γ est abolie à la suite du remplacement de la tyrosine en position 766 par une phényl-alanine (Mohammadi *et al.*, 1992 ; Peters *et al.*, 1992). La transduction du signal FGF par la PLC γ serait impliquée dans différentes autres fonctions biologiques telles que la mobilité cellulaire ou la différenciation cellulaire lors des premiers stades du développement (Mohammadi *et al.*, 1992 ; Peters *et al.*, 1992).

Outre l'autophosphorylation, la fixation du FGF sur son récepteur kinase induit également une augmentation de la production de plusieurs protéines de 90, 130 et 150 kDa (Magnaldo *et al.*, 1986 ; Coughlin *et al.*, 1988 ; Friesel *et al.*, 1989). D'après Coughlin et collaborateurs (1988), le FGF induirait spécifiquement la phosphorylation d'une protéine de 90 kDa dans des fibroblastes 3T3. De plus, comme pour d'autres facteurs de croissance, il a été observé une activation de transporteurs d'ions tels que l'antiport Na^+/H^+ (Magnaldo *et al.*, 1986) ainsi que de canaux potassiques (Panet *et al.*, 1986 ; Halperin et Lobb, 1987 ; Lazkovits *et al.*, 1988).

Le récepteur FGF activé peut également phosphoryler la protéine GAP ("G-protein Activating Protein") qui ainsi activée stimule l'activité GTPase de la forme cellulaire normale de Ras. La protéine Ras, produit du proto-oncogène c-ras, est une protéine de liaison au GTP impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la morphogenèse (Kremer *et al.*, 1991 ; Satoh *et al.*, 1992). Ras joue le rôle de molécule "interrupteur" dans un processus physiologique où la forme active est liée au GTP alors que la forme inactive est liée au GDP (Polakis et McCornick, 1993). Il a été montré pour l'EGF, le PDGF et le FGF2 que l'activation de ras est liée indirectement au processus d'autophosphorylation sur le résidu Tyr des récepteurs. Les récepteurs phosphorylés se comportent comme des sites de fixation de haute affinité pour des molécules de transduction à domaine SH2 (Koch *et al.*, 1991). Ces dernières, elles-mêmes fixées par des domaines SH3 à d'autres molécules, forment un complexe capable d'activer la forme GDP-Ras (revue dans Schlessinger, 1993). La protéine tyrosine-kinase C-src est un autre produit de proto-oncogène impliqué dans la cascade de transduction du signal (le gène codant cette protéine est l'homologue cellulaire du virus du sarcome de Rous).

D'autres modes d'activation cellulaire ont été mis en évidence, il s'agit entre autres des formes internalisées des FGF. Après fixation à leur récepteur, les FGF1 et FGF2 sont internalisés et dégradés en des molécules de 10 et 15 kDa (Moenner *et al.*, 1987). Dès 1987, Bouché et collaborateurs ont pu montrer que le FGF2 exogène internalisé pouvait se localiser dans le nucléole, la signification biologique de cette localisation reste encore inconnue. Néanmoins, certaines observations tendent à conférer aux FGF un rôle de facteurs de transcription nucléaire. La transduction du signal FGF par internalisation du facteur peut également constituer un élément régulateur de la réponse cellulaire aux FGF. En effet, une approche ultrastructurale de l'internalisation du FGF2 lié aux HSPG (Gleizes *et al.*, 1995) dans des cellules endothéliales montre que le FGF2 lié aux HSPG pénètre la cellule par différentes voies et qu'il suit la voie de dégradation endosomale sans jamais atteindre le noyau. Or il a déjà été montré une translocation nucléaire du FGF2 dans des cellules endothéliales (Baldin *et al.*, 1990 ; Bouché *et al.*, 1987 ; Hawker et Granger, 1992). Cette différence de résultats pourrait être due au mode d'internalisation du FGF utilisé par la cellule. Pour l'instant, 2 modes sont connus :

l'internalisation après fixation aux récepteurs tyrosine kinase ou aux protéohéparanes sulfates.

Une autre voie de réponse cellulaire au FGF consiste en l'activation de gènes de la réponse précoce au signal mitogène: l'expression de c-myc et c-fos est rapidement induite après fixation des FGF à leurs récepteurs (Müller *et al.*, 1984 ; Tsuda *et al.*, 1986 ; Magnaldo *et al.*, 1986 ; Zeytin *et al.*, 1988).

Les MAP kinases ("Mitogen-Activated Protein kinase") constituent une famille de protéines kinases impliquées dans diverses réponses cellulaires chez les eucaryotes telles que la régulation de la prolifération et de la différenciation, le processus de sécrétion, la dépolarisation et les réponses métaboliques. Les MAPK sont un élément des séries de protéines kinases qui relient la membrane plasmique aux événements cytoplasmiques et nucléaires. Les MAPK possèdent une caractéristique spécifique en ce sens que leur activation requiert une phosphorylation à la fois sur une thréonine et une tyrosine. L'enzyme est une MAP kinase kinase fortement conservée chez les mammifères et elle-même sous le contrôle d'une MAPKKK (dont raf-1). Les MAPK assurent une phosphorylation sur le résidu proline et constituent le point de départ pour suivre le signal de transduction en aval de la 1ère cascade kinase/Ras et en amont des facteurs de transcription nucléaires. Les substrats des MAPK peuvent être cytoplasmiques (phospholipase A2 et autres kinases) ou nucléaires (les facteurs de transcription c-myc, c-jun) (pour revue: Marshall, 1994).

Les mécanismes généraux de la réponse cellulaire au FGF commencent à être décryptés mais les messagers secondaires et les événements qui sont à l'origine de leur activation sont loin d'être complètement identifiés. Cette multiplicité des modes de transduction du signal FGF justifie en partie les effets pléiotropes de cette famille de facteurs, le type cellulaire conditionnant, pour l'autre partie, le mode de réponse cellulaire.

V. ROLES BIOLOGIQUES DES FGF

A. Activité *in vivo* et *in vitro*

Les FGF se caractérisent par un large spectre d'actions. Ils sont impliqués dans divers processus fondamentaux tels que la prolifération et la différenciation cellulaires, la réparation tissulaire, le développement embryologique et dans des processus pathologiques tels que la transformation cellulaire, l'angiogenèse tumorale et la tumorigenèse. La spécificité d'action des FGF est multifactorielle. Les spectres d'expression tissulaires et temporels des gènes FGF diffèrent d'un gène à l'autre, pouvant ainsi conférer une certaine spécificité d'action. La distribution et la spécificité des récepteurs de surface des FGF représentent certainement un autre moyen d'assurer cette action de façon discriminatoire.

1. Le développement embryonnaire

Des expériences déjà anciennes menées par Nieuwkoop et collaborateurs (1969) et Ogi (1967, 1969) sur des blastulas ont mis en évidence une interaction entre le pôle animal et le pôle végétatif conduisant à la différenciation mésodermique. Les facteurs d'induction du mésoderme ont été identifiés plus récemment et se sont révélés appartenir à la famille des facteurs de croissance du TGF β (Smith *et al.*, 1988 ; Rosa *et al.*, 1988) et des FGF1 et 2 (Kimelman et Kirschner, 1987; Kimelman *et al.*, 1988 ; Slack et Isaacs., 1989). Les études par hybridation *in situ*, par immunohistochimie et par dosage de FGF et/ou de leur ARNm ont permis de suivre l'expression de ces facteurs au cours du développement. Au cours du développement de l'embryon de poulet, le FGF2 a été localisé très précocement dans l'albumen, dans le jaune d'oeuf et, par la suite, dans l'embryon entier (Seed *et al.*, 1988). L'étude quantitative de l'expression du FGF2 au cours du développement a montré que le niveau de ce facteur est constant entre les jours 2, 5 et 6 mais qu'il augmente ensuite jusqu'au 13ème jour. En revanche, dans le cerveau une étude de la fixation spécifique des FGF1 et FGF2 sur des préparations membranaires montre que le maximum de fixation a lieu au 7ème jour. Le nombre de sites de haute affinité décroît de moitié dès le 10ème jour. Ce niveau est maintenu jusqu'à l'éclosion puis diminue fortement dans le cerveau adulte (Hondermarck *et al.*, 1992). Thomas et collaborateurs (1991) constateront

parallèlement que le rôle du FGF dans le développement du cerveau varie aussi en fonction de l'espèce. En effet, chez la souris, le cerveau ne montre aucune variation significative du taux de FGF1 au cours du développement embryonnaire, par contre le développement post-natal est marqué par 2 périodes d'augmentation et par une période finale de diminution de la quantité de FGF1. Les FGF1 et 2 ne sont pas les seuls membres de la famille à intervenir dans l'embryogenèse. Le FGF5 est exprimé dans le cerveau de souris à l'approche de la naissance (Zhan *et al.*, 1988), alors que le FGF3 (Jakobovits *et al.*, 1986 ; Mansour et Martin, 1988 ; Wilkinson *et al.*, 1988) et le FGF4 (Yoshida *et al.*, 1989 ; Basilico *et al.*, 1989) s'expriment pendant le développement de l'embryon de souris. Une étude plus récente sur le FGF8 a mis en évidence l'expression du gène correspondant dans toutes les régions contrôlant la croissance et la morphogenèse de l'embryon de souris (Crossley et Martin, 1995). Pendant la période 1988-1994, les études de l'expression des gènes FGF1-FGF7 chez la souris ont montré que tous ces gènes sont actifs durant l'embryogenèse.

2. L'angiogenèse

Ce phénomène met en jeu des processus de migration et de prolifération de cellules endothéliales ainsi que de résorption de la matrice extracellulaire, permettant la progression des néoformations vasculaires. Le FGF2 est l'un des nombreux candidats (angiogénine, TGF α et β , certains lipides, TNF α) à l'activité angiogénique. Les FGF piégés dans la MEC ou libérés par les cellules favorisent à la fois la croissance des vaisseaux et le remaniement de la MEC. Les FGF sont hautement mitogènes pour les cellules endothéliales vasculaires et comptent parmi les inducteurs les plus puissants de la néovascularisation et de la formation du mésenchyme (cf. revue Folkman et Klagsbrun, 1987). Plus précisément, il a été montré que le FGF2 active la production de l'activateur du plasminogène tissulaire (PA) (Presta *et al.*, 1986) et stimule son activité dans les cellules endothéliales des capillaires (Saksela *et al.*, 1987 ; Müller *et al.*, 1987). Le FGF2 stimule la production d'autres enzymes de dégradation de la MEC telles que la collagénase I (Chua *et al.*, 1987). Ces enzymes sont nécessaires à la dégradation de la membrane basale permettant la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires. *In vivo*, cette néovascularisation peut être normale ou pathologique. La surexpression des FGF1 et 2 au cours du développement dans le

cerveau (Risau, 1986) et le rein (Risau et Ekblom, 1986), au moment où la vascularisation de ces organes est intense, est un argument qui conforte le rôle de ces facteurs dans l'angiogenèse. Le FGF2, produit par les cellules de la granulosa, possède une forte activité angiogénique lors de la formation du corps jaune (Gospodarowicz *et al.*, 1985 ; Shimazaki *et al.*, 1988). Les tumeurs solides constituent l'une des pathologies où la néovascularisation est très importante (revue dans Folkman et Klagsbrun, 1987). Cette angiogenèse tumorale évite l'hypoxie aux cellules internes de la tumeur et assure la croissance de cette dernière. La corrélation entre le développement des tumeurs solides et leur vascularisation est mise à jour dès 1976 par Folkman (Folkman, 1976). L'hypothèse émise par Folkman et Cotran (1976), suggérant que les facteurs de croissance produits par la tumeur seraient des initiateurs de la vascularisation tumorale, a été largement vérifiée. Dans des cellules de tumeur de sein le FGF2 induit l'activité de l'activateur du plasminogène (Mira-Y-Lopez *et al.*, 1986). Ce résultat a conduit les auteurs à penser que le FGF2 pourrait stimuler la croissance des tumeurs mammaires *in vivo* par un mécanisme indirect de stimulation de la vascularisation. Des cellules d'adénocarcinome de l'endomètre possèdent des récepteurs au FGF2 et sont capables de répondre à ce facteur par une augmentation de la synthèse du PA (Presta *et al.*, 1988c). Le FGF2 est également capable de stimuler la prolifération de ces cellules confortant ainsi l'hypothèse d'une modulation coordonnée par ce facteur de la croissance tumorale et de la production du PA. Par des expériences d'injection de différents clones de cellules cancéreuses de l'endomètre dans des hamsters, Kuramoto (1972) a pu mettre en évidence cette relation étroite entre le FGF2 et l'angiogenèse via la production de PA. *In vivo*, les FGF se fixent au niveau des endothéliums (Rosengart *et al.*, 1988) et des vaisseaux (Hondermarck *et al.*, 1990) et interviennent dans les 3 étapes de l'angiogenèse: la dégradation de la membrane basale par induction de la production de protéases, la migration cellulaire car ces facteurs sont chémoattractifs pour les cellules endothéliales (Presta *et al.*, 1986) et la prolifération de ces mêmes cellules (Gospodarowicz *et al.*, 1976, 1984). Le pouvoir angiogénique des FGF1 et 2 a été démontré *in vitro* par des tests classiques d'angiogenèse réalisés sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet (Lobb *et al.*, 1985 ; Gospodarowicz *et al.*, 1986), sur la cornée de lapin (Lobb

et al., 1985 ; Gospodarowicz *et al.*, 1986) et sur la capsule rénale (Hayek *et al.*, 1987). Un modèle expérimental utilisant la perfusion de FGF2 par une minipompe osmotique a également mis en évidence le rôle angiogène de ce facteur dans la choroïde (Soubrane *et al.*, 1994).

3. La réparation et la régénération tissulaires

Après blessure, la cicatrisation est un processus complexe qui aboutit à la réparation du tissu endommagé. Ce processus fait intervenir des phénomènes de migration, de prolifération et de différenciation cellulaires. Un remodelage de la matrice extracellulaire et une néosynthèse de composants matriciels s'y ajoutent. La première étape de la cicatrisation consiste en la mise en place d'un tissu cicatriciel dit encore tissu de granulation. La formation de ce tissu est due à la libération par la lésion d'une cascade de molécules chémo-attractives et de facteurs de croissance dont le FGF2. Ce facteur induit la migration et la prolifération des cellules des tissus conjonctifs au niveau de la blessure (Buntrock *et al.*, 1984 ; Buckley-Sturrock *et al.*, 1989). L'addition de FGF2 sur des lésions dermiques augmente la vitesse de cicatrisation (Thomas *et al.*, 1987). Après la mise en place du tissu de granulation, s'établit une néovascularisation au cours de laquelle le FGF joue un rôle important. Le FGF2 piégé dans la MEC (Rogelj *et al.*, 1989) et le FGF2 libéré par les endothéliums lésés (Gadjusek et Carbon, 1989) induisent une activité angiogénique importante (Klagsbrun, 1989). Assouline et collaborateurs (1989) ont montré que le FGF2 accélère la réparation de l'épithélium cornéen endommagé expérimentalement. Cet effet serait le résultat d'interaction entre le FGF2 et la membrane basale de l'épithélium endommagé. L'épithélium cornéen intact ne contient pas de FGF2. Le FGF2 pourrait être utilisé en thérapie des lésions cornéennes superficielles (Rieck *et al.*, 1993, 1994). Le FGF1 est impliqué dans la réparation de l'épithélium cornéen par l'activation de la migration cellulaire (Dabin et Courtois, 1991). Les FGF sont également impliqués dans la régénération tissulaire. Ces facteurs interviennent lors de la régénération du membre de pleurodèle (Gospodarowicz et Mescher, 1981 ; Boilly *et al.*, 1990 ; Hondermarck et Boilly, 1990), du foie (Kan *et al.*, 1989) et des nerfs périphériques (Cuevas *et al.*, 1988 ; Danielsen *et al.*, 1988 ; Cordeiro *et al.*, 1989). L'endothélium de la cornée se régénère mieux en présence de FGF. Ce tissu possède des capacités

Tableau VII. Activités *in vitro* des FGF.

Cellules	Activité mitogène <i>in vitro</i>	Autre rôle et/ou rôle différenciateur <i>in vitro</i>
Fibroblastes	+	+
Endothéliales		
- de capillaires	+	+
- de vaisseaux	+	+
Cellules satellites	+	
Myocytes	+	+
Chondrocytes	+	+
Cellules osseuses	+	+
Kératinocytes	+	
Mélanocytes	+	+
Cellules de Leydig		+
Neurones rétiniens		+
Neurones du SNC		+
Neurones périphériques		+
Astrocytes	+	+
Oligodendrocytes	+	+
Cellules de Schwann	+	+
Myoblastes	+	+
Ostéoblastes	+	
Neuroblastes	+	

de régénération limitées en fonction de l'âge. L'adjonction de FGF à l'endothélium lésé stimule la prolifération des cellules endothéliales de la cornée *in vivo* favorisant ainsi la régénération de cette membrane (Landshman *et al.*, 1987 ; Fredj-Reygrobellet *et al.*, 1987 ; Rieck *et al.*, 1992). Les FGF seraient également impliqués dans la régénération axonale puisque l'addition de FGF exogènes *in vivo* stimule cette régénération (Aebischer *et al.*, 1989 ; Cordeiro *et al.*, 1989).

4. La prolifération et la différenciation cellulaires

Les facteurs de croissance FGF agissent à la fois sur la prolifération et la différenciation d'un éventail extrêmement large de cellules d'origine mésodermique et neurectodermique (tableau VII). Dans le système nerveux les FGF ont un rôle mitogène et/ou différenciateur, neurotrophique et de facteur de survie pour les neurones. *In vitro*, les FGF stimulent la prolifération et/ou la différenciation d'oligodendrocytes (Eccleston et Silberberg, 1985), d'astrocytes (Pettman *et al.*, 1985), de neuroblastes (Gensburger *et al.*, 1987) et de cellules gliales de la rétine (Tcheng *et al.*, 1994). Les FGF sont de véritables agents de contrôle du développement neuronal. En effet, l'association de FGF2 à des matrices artificielles composées d'héparine ou de chondroïtine sulfate augmente l'adhésion, l'agrégation et la poussée de neurites au niveau de neurones mis en culture (Schubert *et al.*, 1987 ; Walicke, 1988 ; Rogelj *et al.*, 1989). Par ailleurs, ces facteurs de croissance induisent l'activité choline acétyl-transférase (Unsicker *et al.*, 1987) et la synthèse protéique (Knusel *et al.*, 1990). Dans l'étude de l'effet neurotrophique des FGF sur les cellules nerveuses, plusieurs auteurs ont rapporté que les FGF, au même titre que le NGF, étaient capable de provoquer l'arrêt de la prolifération de cellules de phéochromocytome PC12 et d'induire la poussée de neurites à partir de ces cellules (Togari *et al.*, 1983, 1985 ; Wagner et D'Amore, 1986 ; Neufeld *et al.*, 1987 ; Rydel et Greene, 1987). Plusieurs types d'expériences ont permis de mettre en évidence l'effet neurotrophique *in vivo* du FGF sur les cellules nerveuses. Après lésion du système nerveux central, l'administration de FGF2 à proximité de la lésion permet d'augmenter la survie des neurones cholinergiques (Anderson *et al.*, 1988 ; Otto *et al.*, 1989) et de limiter la perte d'activité acétylcholine transférase (Barotte *et al.*, 1989).

Le FGF1 stimule également la différenciation myogénique (Alterio *et al.*, 1990). L'expression du FGF1 dans la rétine bovine est régulée au cours du développement suggérant ainsi que ce facteur peut jouer un rôle au cours des étapes tardives de la différenciation de la rétine (Jacquemin *et al.*, 1993). Le FGF2 quant à lui stimule la différenciation des cellules photoréceptrices de la rétine (Hicks et Courtois, 1992). En plus de cet effet différenciateur, les FGF possèdent également un effet mitogène sur les cellules nerveuses telles que les astrocytes et les oligodendrocytes (Kniss et Burry, 1988 ; Delaunoy *et al.*, 1988). Les effets non mitogènes des FGF sur ces 2 types cellulaires sont essentiellement de 3 sortes: effets chémotactiques, effets morphologiques et effets métaboliques. La balance entre l'action mitogène et l'action différenciatrice des FGF serait régulée en fonction du temps, de l'environnement cellulaire et de la cible elle-même. L'exemple de la différenciation myogénique permet de comprendre combien il est parfois difficile de déterminer le rôle exact du FGF dans un phénomène biologique tel que la différenciation. Clegg et collaborateurs (1987) ont montré que les FGF1 et 2 étaient capables de stimuler la prolifération et d'inhiber la différenciation de myoblastes. Un an plus tard, Seed et Hauschka (1988) montraient que le FGF retarde le déclenchement de la différenciation pour certaines sous-classes de myoblastes permettant ainsi leur prolifération, et que ce même facteur induit d'autres sous-classes de myoblastes dans la voie de la différenciation. Cependant une activité mitogène puissante des FGF a été établie *in vitro* pour des cellules aussi diverses que des cellules satellites (Allen *et al.*, 1984), des kératinocytes, des ostéoblastes (Togari *et al.*, 1983) et des neuroblastes (Gensburger *et al.*, 1987). Les FGF1 et 2 sont de puissants mitogènes pour la plupart des cellules d'origine mésodermique et neurectodermique (tableau VII). En règle générale, un type cellulaire donné répond à la fois au FGF1 et au FGF2. Cependant, quelques cellules répondent spécifiquement à l'un ou l'autre de ces facteurs. Les kératinocytes répondent uniquement au FGF2 alors que la lignée NBT-II d'un carcinome de la vessie répond uniquement au FGF1. Les FGF peuvent également jouer le rôle de facteur de survie pour différents types cellulaires (Anderson *et al.*, 1988 ; Renaud *et al.*, 1994).

5. La transformation et la croissance tumorale

Le clonage moléculaire des FGF1 et 2 démontre l'absence du peptide signal nécessaire à la sécrétion de ces protéines vers le milieu extracellulaire (Jaye *et al.*, 1986 ; Abraham *et al.*, 1986a, b). Reste donc inexplicée la présence de ces facteurs de croissance dans les matrices extracellulaires, les membranes basales et les surnageants de culture de cellules productrices. Trois modalités possibles pour cette sécrétion sont retenues actuellement. Ces molécules pourraient être libérées lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est compromise comme dans le cas de la lyse cellulaire. La mort cellulaire seule ne peut cependant pas expliquer la présence de quantités importantes de FGF dans le milieu extracellulaire. Une seconde hypothèse fut avancée à la suite des travaux de Rubartelli et collaborateurs (1990) sur l'interleukine IL-1. L'IL-1 comme les FGF ne possède pas de peptide signal et ne peut donc être sécrétée par la voie classique du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Cette cytokine serait sécrétée par l'intermédiaire de vésicules qui fusionneraient avec la membrane plasmique permettant ainsi la libération de la protéine. Une telle voie est envisagée pour les FGF1 et FGF2. La 3ème hypothèse fait appel aux observations immunohistochimiques du mode de sécrétion de la lectine C2 des cellules musculaires de souris (Cooper et Barondes, 1990). Les FGF, comme la lectine C2, seraient libérés par un processus de dévagination de la membrane plasmique après concentration de la protéine sous un endroit déterminé de la membrane. L'hypothèse la plus récente suppose une sécrétion en association avec des protéohéparanes sulfates qui permettraient ainsi une protection du facteur contre les protéases.

La transfection de cellules NIH 3T3 par le gène du FGF2 artificiellement associé à une séquence peptide signal d'immunoglobuline (FGF-sps) permet la transformation de ces fibroblastes (Rogelj *et al.*, 1988). Ces NIH 3T3 transfectés exprimant le FGF2 sont hautement transformés *in vitro* et tumorigènes *in vivo* dans la souris "nude". Cependant, la présence du facteur n'a pas été détectée dans le milieu de culture. Le même type d'expérience conduit par Yayon et Klagsbrun en 1990 a confirmé l'absence de sécrétion du facteur chimérique mais a révélé aussi une régulation négative des FGF R. Ces deux résultats suggéraient

nettement une action autocrine interne du FGF-sps dans les NIH 3T3 transfectés. Des expériences analogues ont été effectuées en utilisant la séquence du peptide signal de l'hormone de croissance. Dans ce cas, les cellules transfectées présentent les caractéristiques de cellules transformées et sont capables de sécréter le FGF2 dans le milieu (Blam *et al.*, 1988). Dans les deux cas, la transfection du gène du FGF2 seul ne permet pas la transformation des cellules. Néanmoins, des résultats contradictoires ont été rapportés par d'autres équipes. La transfection de fibroblastes par de l'ADN complémentaire du FGF2 seul, cloné dans des vecteurs d'expression plasmidiques ou rétroviraux, conduit à la transformation des cellules. L'injection de ces cellules transfectées dans des souris "nude" induit la formation de tumeurs (Sasada *et al.*, 1988 ; Neufeld *et al.*, 1988 ; Quarto *et al.*, 1989).

De même, la transfection de fibroblastes par le gène du FGF1 aboutit à la transformation phénotypique observée pour le FGF2 (Bunnag *et al.*, 1991 ; Imamura *et al.*, 1990 ; Jaye *et al.*, 1988). L'addition d'une séquence peptide signal au FGF1 augmente l'activité transformante et tumorigène des cellules transfectées ainsi que leur mobilité et leur potentiel métastatique (Jouanneau *et al.*, 1991 ; Forough *et al.*, 1993). D'après cette dernière équipe, le FGF1 (sans peptide signal) serait capable d'induire une transformation de moyen ordre par son activité intracellulaire alors qu'une transformation complète nécessiterait la présence du peptide signal. Jouanneau et collaborateurs (1991) ont réussi, grâce à la transfection par le FGF1 couplé ou non à un peptide signal, à transformer des cellules épithéliales de carcinome NBT-II en cellules de type fibroblastique mobiles et à caractère métastatique. La transformation induit des changements morphologiques et une augmentation de la vitesse de prolifération, prolifération qui devient indépendante de la densité cellulaire et de l'ancrage. *In vitro*, les cellules transformées sont capables de former des colonies en agar mou ; *in vivo*, ces cellules forment des tumeurs dans les souris "nude".

Une preuve directe de l'implication du FGF2 dans la transformation a été récemment donnée par Souttou et collaborateurs en 1994. Cette équipe a montré que les cellules épithéliales mammaires humaines normales immortalisées HBL-100 sont capables de produire du FGF2. Ce facteur a pu être purifié du milieu de culture conditionné par ces cellules et des cellules elles-mêmes. L'utilisation d'un

anticorps anti-FGF2 neutralisant dans le milieu de culture (dépourvu de sérum) des HBL-100 induit une diminution dose-dépendante de leur prolifération. De plus, ces cellules possèdent des récepteurs FGF de haute affinité. L'ensemble de ces résultats suggère que le FGF2 serait un facteur autocrine impliqué dans les événements précoces de la transformation néoplasique des cellules épithéliales mammaires. Becks et collaborateurs (1994) ont observé une augmentation du taux de protéines et de l'ARNm du FGF2 et du FGF R durant l'hyperplasie de la thyroïde chez le rat. Les changements temporels et spaciaux de la distribution cellulaire du FGF2 et du FGF R notés dans cette étude suggèrent que leur expression autocrine contribue à l'hyperplasie. En effet, chez les rats témoins l'immunohistochimie a permis de localiser le FGF2 dans les membranes basales des follicules, alors que dans les thyroïdes hyperplasiques, l'immunoréactivité apparaît dans le cytoplasme des cellules épithéliales folliculaires et disparaît de la matrice extracellulaire.

Par ailleurs, le potentiel transformant du FGF2 semble dépendre de la forme moléculaire exprimée. Nous rappelons que la traduction alternative de l'ARNm du FGF2 utilise 2 codons d'initiation différents (AUG ou CUG). Le codon AUG permet la synthèse d'une forme courte de 18 kDa et le codon CUG celle de formes longues de 22, 22.5 et 24 kDa. *In vitro*, la plupart des cellules expriment toutes les formes du FGF2. Les FGF2 de hauts poids moléculaires sont localisés préférentiellement dans le noyau alors que la forme 18 kDa est généralement cytosolique (Quarto *et al.*, 1991 ; Renko *et al.*, 1991 ; Bugler *et al.*, 1991 ; Florkiewicz *et al.*, 1991). D'après Couderc et collaborateurs (1991) les 3 formes 18, 22 et 22,5 kDa du FGF2 possèdent des potentialités transformantes différentes dans les cellules endothéliales d'aorte bovine transfectées. La forme courte n'est pas transformante, les 2 formes longues sont immortalisantes. Seule l'expression des 3 formes permet la transformation de ces cellules. Dans une étude récente, Bikfalvi et collaborateurs (1995) rapportent, grâce à la transfection de NIH 3T3 par les différentes formes du FGF2, que l'interaction de la forme 18 kDa avec son récepteur de surface est responsable de l'augmentation de la migration cellulaire et de la régulation négative des FGF R à la surface des fibroblastes transformés. Les formes 22, 22,5 et 24 kDa sont elles à l'origine de la stimulation de la croissance, dans un milieu pauvre en sérum, par

l'intermédiaire d'un mécanisme intracellulaire. Cette étude montre que les différentes formes du FGF2 possèdent des pouvoirs transformants différents et qu'elles pourraient agir selon des voies convergentes mais distinctes. Cependant, d'autres résultats postulent qu'il n'existe pas de relation entre l'expression des FGF1 et 2 et l'effet transformant/tumorigène car des transfections d'ADNc de FGF ne changent pas toujours le phénotype des cellules transfectées (Blam *et al.*, 1989 ; Jaye *et al.*, 1988). Ces résultats suggèrent que les FGF1 et 2 n'agissent pas de manière autocrine, mais un rôle paracrine pourrait être impliqué dans la transformation des cellules voisines. Par ailleurs, d'autres membres de la famille peuvent être impliqués: Zhang et collaborateurs (1994) ont montré que la transformation de cellules épithéliales rénales de rat induit une suppression de l'expression du FGF1 en faveur de la sécrétion du FGF3 et d'un autre facteur, le VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor").

Malgré la profusion des études sur la relation entre les FGF et la tumorigénèse, le rôle de ces facteurs de croissance dans le développement tumoral reste encore mal défini. Les FGF sont trouvés dans des tumeurs d'origine diverse (tableau IV). Dans la plupart des tumeurs produisant un FGF, il a été montré une stimulation autocrine de la prolifération des cellules tumorales par ce facteur. L'utilisation d'anticorps anti-FGF neutralisants induit une diminution importante de la prolifération des cellules tumorales (Halaban *et al.*, 1988 ; Gross *et al.*, 1993 ; Morrison *et al.*, 1993 ; Emoto *et al.*, 1994 ; Stan *et al.*, 1995 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995). Une autre méthode de mise en évidence du rôle autocrine du FGF consiste en l'utilisation d'oligodésoxynucléotides antisens dirigés contre l'ARNm du FGF. Cela a permis à Morrison et collaborateurs (1993) d'inhiber de 55% la capacité d'une lignée de gliome humain à former des colonies en agar mou. Becker et collaborateurs (1989) ont également réussi à inhiber la prolifération cellulaire de mélanomes humains et la formation de colonies en agar mou par l'adjonction d'oligo-antisens contre le FGF2. Cependant, quelques analyses de tissus normaux correspondant à ces tumeurs révèlent l'existence de FGF dans les tissus sains également. Pour certains auteurs la différence entre tissus sains et tumoraux pourrait résider dans la surproduction de FGF dans les tumeurs. Il reste néanmoins difficile d'expliquer la différence entre l'extension maligne des tumeurs

et la quiescence des tissus normaux par la seule augmentation du taux de FGF car, dans la plupart des rapports établis, l'augmentation est faible.

En plus du rôle mitogène du FGF2 endogène dans les tumeurs, cette différence pourrait être attribuée à la fonction angiogénique du FGF2. En effet, dans une étude portant sur un grand nombre de carcinomes hépatiques, Motoo et collaborateurs (1993) suggèrent que le FGF2 peut jouer un rôle dans cette pathologie en induisant une capillarisation importante. L'administration *in situ* d'anticorps anti-FGF2 dans des tumeurs gliales humaines inhibe nettement la néovascularisation ; l'effet angiogène étant ainsi très réduit, les tumeurs restent de petite taille (Stan *et al.*, 1995). De façon indirecte, Pesenti et collaborateurs (1992) montrent que la suramine, drogue bloquant l'activité du FGF2, supprime la néovascularisation et la prolifération tumorale. Le blocage de l'activité du FGF2 par un anticorps monoclonal neutralisant supprime la croissance de tumeurs solides (Hori *et al.*, 1991). Une étude récente (Czubayko *et al.*, 1994a) a permis d'élucider le mécanisme par lequel le FGF2 en tant que facteur immobilisé dans la MEC peut être solubilisé et activé. Des protéines fixant le FGF2 ("binding proteins") seraient responsables de la démobilisation du FGF2 et de son activation dans le processus de prolifération et d'angiogenèse tumorales. Ces "binding proteins" sont fortement exprimées dans des carcinomes squameux et des kératinocytes immortalisés alors qu'elles sont absentes dans les tissus sains.

Le rôle tumorigène des FGF fait également intervenir leur capacité à induire (ou augmenter) la mobilité et l'invasion cellulaires. Des expériences de transfection de NIH 3T3 par le FGF2 ou le FGF4 montrent que l'expression induite de ces facteurs augmente la mobilité cellulaire et que plus particulièrement le FGF2 augmente la vitesse de cette mobilité (Taylor *et al.*, 1993). Ces transfusions provoquent également l'augmentation du potentiel invasif des cellules. Dans l'étude d'un cancer pancréatique exprimant un taux important de FGF2, il a été montré que l'addition d'un gradient croissant de FGF2 induit chez ces cellules un potentiel invasif dose-dépendant (Hasegawa *et al.*, 1994). De plus, l'addition d'un anticorps dirigé contre le récepteur du FGF supprime le comportement invasif des cellules pancréatiques cancéreuses. Le FGF2 induit la mobilité cellulaire en provoquant le plissement de la membrane plasmique (Johnston *et al.*, 1995). Les FGF1 et 2

induisent ce plissement dans les cellules épithéliales cancéreuses du sein mais non dans leurs homologues normales. Cette étude a permis de mettre en évidence une différence entre cellules normales et cancéreuses dans la réponse aux FGF et une sélectivité du récepteur impliqué, seul le FGF R4 permet ce processus de plissement.

Nous rappelons brièvement que les FGF sont également impliqués dans l'invasion cellulaire via une stimulation de la production d'enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire. Les détails relatifs à cette donnée ont été analysés dans le chapitre "FGF dans les tumeurs mammaires". Dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, Miyashita et collaborateurs (1994) rapportent une stimulation par le FGF2 de la production de la protéine induite par les œstrogènes, pS2. Du fait de son homologie de séquence avec l'oligo-1,6-glucosidase, Tomasetto et collaborateurs (1990) suggèrent que la protéine pS2 sécrétée par les cellules cancéreuses mammaires pourrait contribuer à la dégradation de glycoprotéines matricielles.

Dans le cancer mammaire, des amplifications de *int2* et *hst* ont été observées et mises en cause dans cette pathologie. De plus, il a été montré que les gènes *int2*, *hst* et plus récemment le FGF8 coopèrent avec le gène *wnt1* dans la tumorigenèse induite par insertion du MMTV (Mac Arthur *et al.*, 1995).

En conclusion, l'ensemble des résultats sur le rôle des FGF dans la tumorigenèse montre que ces facteurs seraient impliqués dans cette pathologie par leurs effets mitogène, angiogène et invasif. Il existe cependant certains résultats qui attestent que ces facteurs de croissance ne sont liés qu'indirectement à la cancérisation et qu'ils n'y sont impliqués que pour une faible part. La production de FGF ne doit pas être la cause majeure d'induction de tumeur et de croissance tumorale puisque ces facteurs sont également trouvés dans des tissus normaux d'origines diverses et dans les tissus sains correspondant aux tumeurs productrices. Dans une revue parue en 1993, Rizzino soutient cette hypothèse lorsqu'il note les similitudes dans les types de facteurs de croissance et de leurs récepteurs produits par, d'une part, les jeunes embryons et, d'autre part, les tératocarcinomes de souris. De plus, il note d'après de nombreuses données bibliographiques que la différenciation de tératocarcinome s'accompagne d'une diminution de la synthèse

de facteurs de croissance (FGF4, PDGF-like, TGF α) et d'une augmentation de la synthèse d'inhibiteurs de croissance (TGF β). Par conséquent, un blocage de la différenciation pourrait conduire à une croissance tumorale par le maintien de la production autocrine de facteurs de croissance. Dans des carcinomes de rein, vessie, prostate, colon et sein, Singh et collaborateurs (1995) montrent que les interférons α et β produisent une régulation négative du FGF2. Dans le carcinome rénal, ces interférons ont un effet antiprolifératif indépendant de l'inhibition de l'expression du FGF2. Ces résultats nous incitent à être prudents dans l'établissement de corrélations directes entre production de FGF et carcinogénèse. La majorité des auteurs qui ont mis en évidence la production de facteurs de croissance par les cellules tumorales suggèrent qu'il serait possible de bloquer la croissance tumorale en bloquant la synthèse de leurs facteurs autocrines. Pour cette raison, Rizzino (revue 1993) indique qu'il serait important de déterminer si la production des facteurs autocrines par les tumeurs est effectivement liée à une expression aberrante des gènes les spécifiant. Pour répondre à cette question et procurer des informations utilisables en clinique, il serait nécessaire d'identifier et de caractériser en détail les cellules normales correspondant aux cellules cancéreuses. Néanmoins, il existe déjà plusieurs stratégies anti-facteurs de croissance dont certaines ont trouvé une application clinique. La suramine est une drogue dont l'activité antagoniste du FGF2 et d'autres cytokines a été montrée *in vitro* (Pienta *et al.*, 1991 ; Moscatelli et Quarto, 1989). Cette drogue peut agir en complexant le FGF et l'empêchant ainsi d'interagir avec son récepteur (Moscatelli et Quarto, 1989 ; Coffey *et al.*, 1987) ou en interagissant directement avec ce dernier. La suramine est également antagoniste du PDGF, de l'IGF I et de l'IGF II par un processus similaire. Son activité anti-cancéreuse est également médiée par sa capacité à inhiber les fonctions mitochondriales, la transduction du signal et les ADN polymérase. Sur des lignées cellulaires de carcinome de la prostate, il a été montré que l'adjonction de la suramine résulte dans une accumulation d'héparanes sulfates qui inhibe leur prolifération (Constantopoulos *et al.*, 1983 ; Rees *et al.*, 1986). Le traitement à la suramine induit cette accumulation dans le sang, l'urine et plusieurs tissus. Ces héparanes sulfates ont été purifiés récemment et leur effet antiprolifératif a été montré *in vitro*. Il est donc possible de considérer qu'une

partie de l'activité thérapeutique de la suramine dans le cancer est due à la production de certains types d'héparanes sulfates suppresseurs de tumeurs. Le rôle de l'héparine et des héparanes sulfates dans l'activité des facteurs de croissance, et en particulier des FGF, est analysé dans le paragraphe suivant.

En conclusion, les FGF, et en particulier les FGF1 et 2, possèdent des activités pléiotropiques recouvrant un large spectre de cellules cibles essentiellement d'origine mésodermique et neurectodermique. Cette caractéristique de facteurs multifonctionnels capables de promouvoir des fonctions aussi distinctes que la prolifération, la différenciation et la migration a été établie aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Il est à noter enfin que l'activité biologique du FGF1 peut être modulée par l'héparine.

B. Effet de l'héparine sur l'activité des FGF

Les FGF présentent la caractéristique commune d'une grande affinité pour l'héparine. L'héparine potentialise fortement (3 à 100 fois) l'activité mitogène, neurotrophique et angiogène du FGF1 *in vitro* et *in vivo* (Thornton *et al.*, 1983 ; Schreiber *et al.*, 1985 ; Lobb *et al.*, 1985, 1986 ; Uhlrich *et al.*, 1986), ce qui le rend aussi actif que le FGF2 (l'héparine n'a aucune influence sur le FGF2, (Gimenez-Gallego, 1986)). Si le site putatif de liaison à l'héparine des FGF est localisé au niveau de la Lys 132 (Harper et Lobb, 1988), le ou les mécanismes impliqués dans cette potentialisation sont encore mal compris.

Cette potentialisation serait le résultat d'une stabilisation du FGF1 et de sa présentation aux récepteurs de haute affinité. Cette stabilisation comprendrait une protection du facteur contre les dénaturations consécutives à la chaleur ou à l'acidité et contre les dégradations protéolytiques induites par la thrombine, la plasmine et la trypsine (Gospodarowicz et Cheng, 1986 ; Rosengart *et al.*, 1988). De plus, l'héparine augmente l'affinité du FGF1 pour ses récepteurs (Schreiber *et al.*, 1985 ; Yaron, 1991). La diminution de l'affinité du FGF1 pour l'héparine par mutation de la Lys 132 en sérine conduit à une diminution de l'activité mitogène. Cependant, ce FGF1 muté conserve une certaine affinité pour ses récepteurs et stimule certaines des étapes précoces de la transduction du signal comme l'activation des tyrosine kinases et l'induction des oncogènes c-jun et c-fos (Burgess *et al.*, 1990). Cette interaction forte avec l'héparine, ainsi que la modulation de

l'activité biologique qui en résulte, pourrait constituer une voie de régulation des activités biologiques des FGF. Bien que l'héparine soit rarement présente *in vivo*, la plupart des cellules synthétisent et sécrètent des héparanes sulfates et des protéohéparanes sulfates (Marcum *et al.*, 1986 ; Nader *et al.*, 1987 ; Saksela *et al.*, 1988 ; Gordon *et al.*, 1989). Bien que l'héparine soit sans influence sur l'activité du FGF2 (Gimenez-Gallego, 1986) d'une part, deux domaines fonctionnels pour la fixation de ce facteur à l'héparine et aux récepteurs ont été identifiés: (24-68)-NH₂ et (106-115)-NH₂ (Baird *et al.*, 1988) et d'autre part, un rôle régulateur de la mobilisation du FGF2 par l'héparine a été mis en évidence. En effet, le FGF2 synthétisé par des cellules endothéliales *in vitro* est trouvé associé avec la matrice extracellulaire produite par ces mêmes cellules (Vlodavsky *et al.*, 1987 ; Baird et Ling, 1987 ; Schweigerer *et al.*, 1987b). Le FGF2 ainsi stocké pourrait être libéré de cette matrice à l'aide d'enzymes de types héparinase ou héparanase (Vlodavsky *et al.*, 1987 ; Baird *et al.*, 1987 ; Bashkin *et al.*, 1989) et deviendrait accessible pour son récepteur. Le fait qu'*in vivo* les FGF soient associés avec les membranes basales contenant des glycosaminoglycanes sulfatés de type héparanes sulfates suggère que ces composants de la matrice constituent un lieu de stockage et de protection de ces facteurs, et que ces facteurs pourraient être libérés par des héparanases ou des protéases (Klagsbrun *et al.*, 1986 ; Jeanny *et al.*, 1987 ; Folkman *et al.*, 1988 ; Thompson *et al.*, 1988). Cette balance de stockage/libération du FGF serait un élément régulateur clé de la fonction du FGF. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le ou les mécanismes de mobilisation des FGF fixés à la matrice par la cellule (Vlodavsky *et al.*, 1987 ; Saksela *et al.*, 1988 ; Moscatelli, 1987 ; Baird et Walicke, 1989). La première hypothèse suppose une augmentation du nombre de récepteurs de haute affinité à la surface des cellules cibles qui entraînerait un déplacement des FGF liés aux sites matriciels de plus faible affinité vers les récepteurs membranaires de plus haute affinité. Une deuxième hypothèse préconise une modification du facteur lui-même qui perdrait ainsi son affinité pour les sites matriciels. La phosphorylation des facteurs est un phénomène qui peut étayer cette hypothèse. Feige et collaborateurs (1989) ont mis en évidence *in vitro* la phosphorylation des FGF1 et 2 par les protéines kinases A et C. Les FGF ainsi phosphorylés conservent leur activité mitogène et présentent une affinité accrue

pour les récepteurs membranaires. La troisième hypothèse suppose une dégradation de la matrice par action de protéases et/ou d'héparinase. Les protéases agiraient sur la partie protéique des protéohéparanes sulfates, ce qui permettrait la libération des FGF encore liés aux héparanes. Les FGF ainsi liés seraient protégés contre d'éventuelles dégradations. Il a été montré en effet que la plasmine libère le FGF2 sous une forme complexée aux HSPG ou aux HS (Flaumenhaft *et al.*, 1989).

Outre le rôle de réservoir de FGF, l'héparine et les HSPG augmentent l'affinité du facteur pour son récepteur membranaire. Cette propriété résulte de la capacité de l'héparine à modifier la conformation et/ou l'association intramoléculaire du FGF de façon à présenter ses sites de fixation aux récepteurs de haute affinité. Yayon et ses collaborateurs (1991) ont les premiers montré la nécessité d'une telle coopération entre les récepteurs de basse et haute affinité pour l'activité du FGF2, mais ce mécanisme d'activation a été depuis mis en évidence pour d'autres membres de la famille FGF (Olwin et Rappaport, 1992 ; Mansukhani *et al.*, 1992). Il a été montré récemment que l'héparine, dans certaines conditions, est capable de modifier la structure du FGF1 (Pineda-Lucena *et al.*, 1994). De plus, il semble que chaque FGF peut nécessiter des structures particulières d'héparanes sulfates (Guimond *et al.*, 1993 ; Olwin et Rappaport, 1992) et que la structure des chaînes HS détermine une fonction activatrice ou inhibitrice pour le FGF (Guimond *et al.*, 1993).

Enfin, un rôle de médiateurs d'endocytose du FGF2 est attribué aux HSPG. Ces HSPG auraient une fonction de transporteur du FGF du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (Gannoun-Zaki *et al.*, 1991 ; Roghani et Moscatelli, 1992 ; Rustani *et al.*, 1993). Cependant, dans les cellules épithéliales de cristallin de boeuf, il a été montré que seuls les récepteurs de haute affinité contribuent spécifiquement et directement à l'internalisation du FGF1 (Mascarelli *et al.*, 1993). Selon Gleizes et collaborateurs (1995), l'internalisation du FGF2 fixé aux héparanes sulfates protéoglycanes se ferait selon plusieurs voies. Le FGF2 est internalisé par un mécanisme d'endocytose clathrine-indépendant, par pinocytose ou par phagocytose. Après l'endocytose, le FGF2 est dégradé dans les lysosomes (Gleizes *et al.*, 1995) comme d'autres protéines internalisées via les héparanes sulfates protéoglycanes (thrombospondine et lipoprotéine lipase).

Matériel et méthodes

I. MATÉRIEL

A. Cellules épithéliales mammaires

1. Lignées cellulaires de cancer du sein

MDA-MB-231: lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'adénocarcinome de sein par Cailleau et collaborateurs (1974). Cette lignée se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales, un nombre de chromosomes hypotriploïdes (68 en moyenne) et une absence de récepteurs aux œstrogènes. Les cellules MDA-MB-231 sont métastatiques et tumorigènes dans les souris BALB/c immunodéprimées (souris "nude").

MCF-7: lignée épithéliale mammaire isolée d'une effusion pleurale par Soule et collaborateurs (1973). Cette lignée a conservé quelques caractéristiques d'épithélium mammaire différencié telles que la réponse à l'œstradiol via des récepteurs aux œstrogènes et sa capacité à former des dômes. Le nombre de chromosomes varie entre des formules hypertriploïdes et des formules hypotétraploïdes.

BT-20: lignée épithéliale établie à partir d'un carcinome de sein isolé et mis en culture *in vitro* par Lasfargues et Ozzello en 1958. Les cellules BT-20 sont hyperdiploïdes (nombre modal de chromosomes = 50), hormono-indépendantes et capables d'induire des tumeurs dans la souris nude.

2. Lignée cellulaire transformée

HBL-100: cellules épithéliales mammaires humaines immortalisées par intégration du génome du virus SV40, isolées par Gaffney et ses collaborateurs à partir de lait de femme. Malgré l'absence de lésion mammaire et d'antécédents de cancer du sein, les HBL-100 possèdent un caryotype anormal. Cette lignée est capable de répondre à la prolactine et aux œstrogènes par une surproduction de caséine. Le récepteur des oestrogènes n'a cependant pas été détecté. Les cellules HBL-100 ne sont pas tumorigènes dans la souris "nude" mais sont capables de former des colonies en agar mou (Caron de Fromentel *et al.*, 1985). La lignée HBL-100 nous a été généreusement offerte par le Pr. M. Crépin (Paris).

3. Cellules mammaires normales

CEMN: les cellules épithéliales mammaires normales ont été isolées après réduction mammoplastique de femmes saines. Le caractère épithélial a été vérifié du point de vue morphologique et en fonction de la présence des kératines C14 et C19 détectées par des anticorps spécifiques. La technique d'isolement et de culture des cellules épithéliales mammaires normales a été apportée au laboratoire de biologie du développement (Villeneuve d'Ascq) par le Dr. X. Dong-Le Bourhis que je remercie pour ses dons de CEMN.

4. Lignées cellulaires utilisées pour les tests d'activité FGF

CCL-39: lignée de cellules fibroblastiques isolées de poumon de hamster chinois et dont la prolifération est nettement augmentée par le FGF2.

PC-12: cellules de phéochromocytome de rat (tumeur médullo-adrénales) sensibles à de faibles doses de FGF2 (de l'ordre de 5 ng/ml). En présence de FGF2, les PC-12 normalement rondes s'étalent sur la boîte de culture et développent des neurites, ce qui leur confère une morphologie de cellule en forme de neurones.

B. Anticorps

1. Immunodétection:

L'anticorps polyclonal dirigé contre le FGF1 recombinant humain nous a été généreusement offert par le Dr. Y. Courtois (Paris). Cet anticorps a été produit chez le lapin et sa spécificité a été décrite par Oliver et collaborateurs (1992).

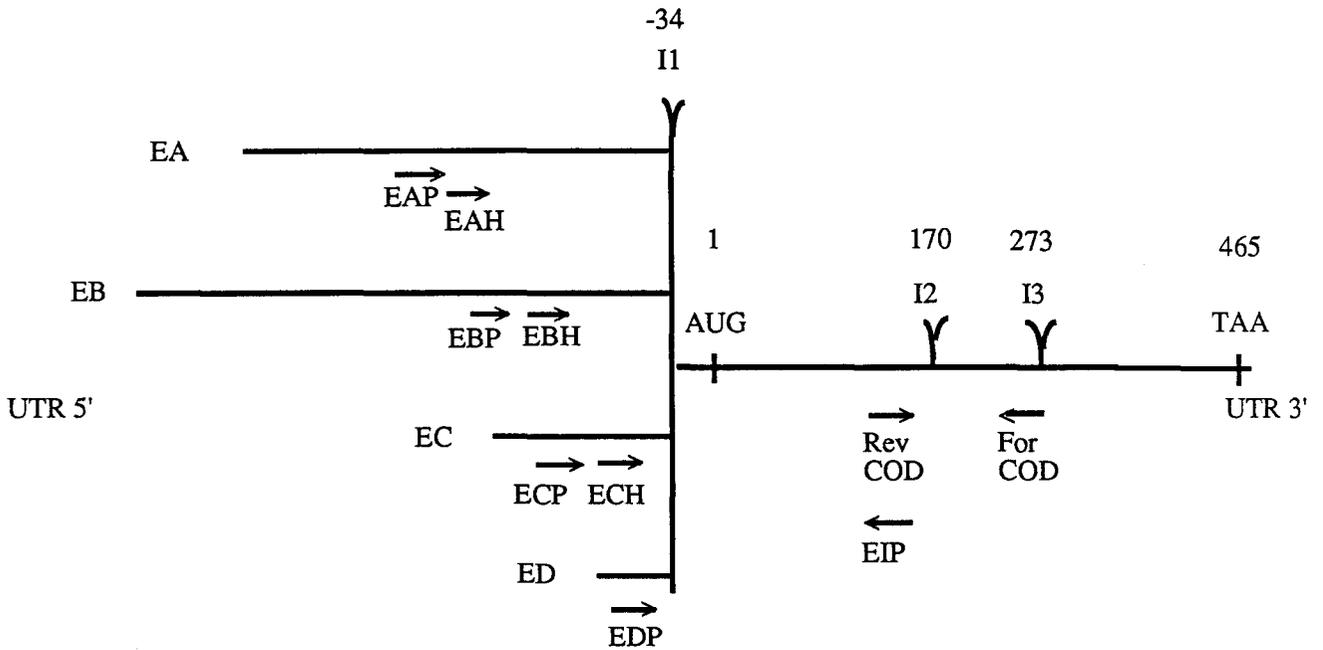
Le second anticorps anti-FGF1 recombinant humain nous a été offert par le Dr. Y. Cao (Stockholm, Suède).

Les anticorps polyclonaux dirigés contre le FGF2 recombinant humain proviennent du laboratoire du Dr Y. Courtois et de la société Farmitalia (Carlo Erba, Milan, Italie). L'anticorps polyclonal dirigé contre la séquence peptidique 1-24 du FGF2 provient de Sigma Chemical Co.

2. Immunoneutralisation de l'activité FGF

DG2: anticorps monoclonal neutralisant dirigé contre le FGF2 recombinant humain offert par le Dr T. Reilly (du Pont de Nemours, Wilmington, Delaware).

A. ARNm du FGF1 humain



B. Produits de RT-PCR

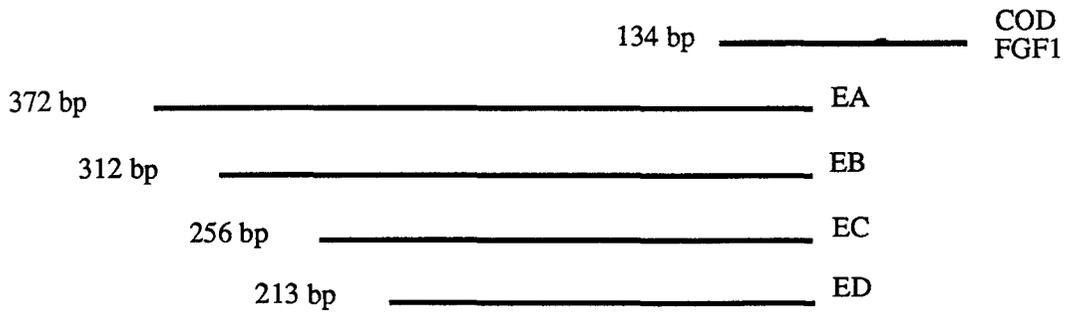


Figure 6. Transcrits E1.A, E1.B, E1.C et E1.D du gène FGF1. A: Position et sens des oligonucléotides utilisés en PCR (P) et en hybridation (H). B: Taille des fragments ADNc amplifiés par PCR.

47 α : anticorps monoclonal (IgM) neutralisant dirigé contre le FGF1 bovin purifié (Myoken *et al.*, 1993), offert par le Dr. J. D. Sato (Lake Placid, NY, USA).

3D12: anticorps monoclonal neutralisant dirigé contre le FGF1 provient du laboratoire du Dr. I.A. Hendry (Canberra, Australie).

C. Séquences oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR

Pour une meilleure compréhension des tableaux dans lesquels seront rapportés la spécificité, la séquence et la localisation des oligonucléotides utilisés, il nous paraît utile de dresser un schéma des ARNm du FGF1 humain étudiés dans cette thèse (Fig. 6).

La séquence codante des ARNm du FGF1 humain est constituée de 3 exons séparés par 2 introns (I2 et I3) en position 170 et 273. Des épissages alternatifs en amont de l'AUG peuvent donner lieu à 4 ARNm contenant l'un des 4 exons non codants, EA, EB, EC ou ED. La taille de ces exons serait de 320, 440, 90 et 40 paires de bases respectivement. La flèche Rev COD correspond à l'orientation sens de l'oligonucléotide utilisé pour l'amplification de tous les ARNm du FGF1 (For COD correspond à l'oligo-antisens). Pour les exons non codants, EAP indique par exemple l'orientation sens de l'oligonucléotide utilisé pour l'amplification de l'ARNm contenant l'exon A alternativement épissé à l'exon 1 de la région codante du FGF1. Pour toutes les amplifications PCR des exons non codants, un seul oligo-antisens EIP a été utilisé.

Les spécificités, les noms des oligonucléotides sens et antisens utilisés en PCR et la taille de fragments amplifiés sont rapportés dans le tableau VIII.

Les noms, les séquences, la position et l'orientation des oligonucléotides utilisés pour l'amplification PCR sont rapportés dans le tableau IX.

D. Sondes oligo- et polynucléotidiques

1. "Northern-blot"

- ADN complémentaire (ADNc) de 250 paires de bases dirigé contre la séquence codante 1-41 du FGF1 purifié à partir du cerveau de boeuf (Abraham *et al.*, 1986a). Ce fragment est introduit dans le plasmide pSP 65 par *Eco* RI et *Bam* HI afin de permettre son amplification dans un système bactérien.

Tableau VIII. Noms, spécificités des oligonucléotides et taille des fragments ADNc amplifiés.

Spécificité	Amorces oligonucléotidiques	Fragment amplifié (pb)
FGF1 COD	COD Rev / COD For	135
FGF1 E1.A	E1P / EAP	372
FGF1 E1.B	E1P / EBP	319
FGF1 E1.C	E1P / ECP	256
FGF1 E1.D	E1P / EDP	213
FGF2	BB Rev / BB For	175
NR	NR Rev / NR for	75

Tableau IX. Séquence et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées en PCR.

Spécificité	Amorce	Séquence (5' → 3')	Position *	Orientation
FGF1	COD For	AAGCCCGTCGGTGTCCATGG	261 à 242	antisens
	CODRev	GATGGCACAGTGGATGGGAC	127 à 146	sens
	E1P	GTCCCATCCACTGTGCCATC	146 à 127	antisens
	EAP	ATCCACAGCCTTCGCTCCA	-226 à -207	sens
	EBP	CACTCAGAGCTGCAGTAGCCT	-173 à -153	sens
	ECP	ATTCCTTAGTGAGTGAGTTCAC	-110 à -89	sens
	EDP	TGGCAGCAGCACAATGTTTGGGCTA	-67 à -43	sens
FGF2	BB For	CCCAGTTCGTTTCAGTGCCACC	393 à 372	antisens
	BB Rev	CTATCAAAGGAGTGTGTGCAAACC	219 à 241	sens
NR	NR For	GCTGGATCCATTGCAAATTTCC	284 à 264	antisens
	NR Rev	AGGAGCTGATGTGTTGCCCGG	207 à 227	sens

* Les positions sont numérotées par rapport au codon d'initiation de la traduction ATG.

- ADNc de 1,4 kb dirigé contre la séquence complète du FGF2 bovin (Abraham *et al.*, 1986a). Ce fragment est introduit dans le plasmide pSP 65 à l'aide d'*Eco* RI en vue de son amplification bactérienne.

2. "Southern-blot"

Les fragments amplifiés correspondant à la région codante du FGF1 et de la nitrate réductase (NR) sont détectés par des sondes oligonucléotidiques spécifiques dont les noms, les séquences, les positions et les orientations sont donnés dans le tableau X.

L'ensemble des oligonucléotides utilisés en PCR et en hybridation après Southern-blot proviennent de Oligo-Express (France).

Tableau X. Séquence, position et orientation des sondes nucléotidiques utilisées pour l'hybridation "Southern-blot".

Spécificité	Sonde	Séquence (5'→ 3')	Position *	Orientation
FGF1 COD	ADNc			
FGF1 E1.A	EAH	AATCAGGGCATCGCCTCCTTT	-202 à -182	sens
E1.B	EBH	CTACTCTGAGAAGAAGACACC	-133 à -113	sens
E1.C	ECH	CACTTCTGCAGGGAAGCCAGC	-68 à -48	sens
E1.D	E1H	ATGGCTGAAGGGGAAATCACC	1 à 21	sens
FGF2	F-bF	TGGAGTATTTCCGTGACCG	364 à 346	antisens
NR	ADNc			

* Les positions sont numérotées par rapport au codant d'initiation de la traduction ATG.

E. Produits de culture

- Les produits utilisés en cultures et leur provenance sont rapportés dans le tableau XI.

- L'insuline provient d'Organon, Sérifontaine, France.
- Le FGF2 provient de Amgen, Thousand Oaks, CA, USA.

Tableau XI. Produits de cultures cellulaires et provenances.

Sigma Chemical-Co France	Eurobio Les Ullis - France	Gibco / BRL Eragny - France
Collagénase type XI	Milieu DMEM	Milieu MEM
Hyaluronidase	Bicarbonate de Sodium	Milieu MEM sans rouge de phenol
Cortisol	Hepes	Sérum de veau foetal
Toxine Cholérique	a.a. non essentiels	Sérum de cheval
Milieu DME / Ham F12	L-glutamine	
Sérum de veau chélaté en Ca ⁺⁺	Pénicilline / Streptomycine	
Sérum albumine bovine (SAB) fraction V	Trypsine (0,05%)- EDTA (0,025%)	
Fibronectine		
Transferrine		
Holotransferrine humaine		
17 β - oestradiol		
Tamoxifène		
FGF1 standard		
EGF		

F. Produits de RT-PCR

1. Rétrotranscription

Le tampon de rétrotranscription et la transcriptase reverse MMLV ("Moloney murine Leukemia-virus reverse transcriptase") 300 U proviennent de Gibco/BRL. Les hexanucléotides et les désoxyribonucléotides triphosphates (d NTP à 100 mM) proviennent de Boehringer. La sérum albumine bovine (SAB) et la RNAsine proviennent de Promega et les transcrits de la nitrate réductase ont été produits dans le laboratoire INSERM, U 118 dirigé par le Dr. Y. Courtois.

2. Amplification PCR

Le tampon d'amplification 10x et la Taq polymérase 1 U proviennent d'Eurobio.

II. METHODES

A. Extraction des HBGF

1. Culture cellulaire

Dans le but d'extraire les protéines affines pour l'héparine à partir du milieu de culture ou des cellules elles-mêmes, les cellules cancéreuses, les cellules transformées et les cellules normales ont été cultivées dans des boîtes de culture 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson Co, Oxnard, CA, USA) selon les techniques décrites ci-dessous.

a. Culture primaire

Les cellules épithéliales mammaires normales humaines sont obtenues à partir de réductions mammaires et préparées selon la technique décrite par Soule et Mc Grath (1986). Une fois dégraissé, l'échantillon mammaire est dilacéré en fins morceaux à l'aide de ciseaux stériles dans du sérum de veau foetal (SVF). Les morceaux sont ensuite mis à digérer, en agitation à 37°C, avec de la collagénase type XI (450 à 500 UI/ml) et de la hyaluronidase (150 UI/ml) pendant 4 à 5 h en milieu dépourvu de sérum, les organoïdes résultant de cette digestion sont séparés par centrifugation sur gradient de densité au ficoll (10 ml/tube 50 ml) (1000 g, 30 min). Les organoïdes rassemblés dans l'interface sont récupérés et rincés deux fois par du milieu sans sérum, une centrifugation (1000 g, 15 min) permet de récupérer le culot après chaque lavage. Le culot est repris dans le milieu de base (milieu "pré-B1" constitué de DME/HAM F12 (vol/vol), Hepes 10 mM, NaOH 20 mM, bicarbonate de sodium 0,22%, glutamine 2 mM, pénicilline-streptomycine (100 UI/ml, 100 µg/ml), gentamycine 4 µg/ml, fongizone 0.25 ng/ml) puis centrifugé rapidement à 200 g. Le surnageant contenant les fibroblastes est éliminé et le culot contenant les organoïdes épithéliaux est repris dans un milieu de culture riche (milieu "B1") constitué par du milieu "pré-B1" auquel sont ajoutés: 10 µg/ml d'insuline, 2 ng/ml d'EGF, 100 ng/ml de toxine cholérique, 5.10⁻⁶ M de cortisol, 10% de SVF, 5% de sérum de cheval 1,05 mM de CaCl₂. La haute teneur en Ca²⁺ permet une bonne adhérence des organoïdes au plastique des boîtes de culture. Après 7 à 10 jours (37°C, 5% de CO₂/95% d'air), les cellules épithéliales essaient à partir des organoïdes et se dispersent sur le fond de la boîte de culture. A confluence les cellules sont mises en présence d'un milieu de faible teneur en Ca²⁺.

Ce milieu est constitué du milieu "B1" contenant non pas 1,05 mM de CaCl_2 mais 40 mM seulement et le SVF normal est remplacé par du SVF chélaté en Ca^{2+} sur Chelex 100 (Sigma). La faible teneur en Ca^{2+} facilite la division cellulaire et permet aux cellules de rester en suspension dans le milieu de culture. Les cellules en suspension sont centrifugées puis réparties dans de nouvelles boîtes de culture en présence de milieu riche. Les cellules sont incubées en atmosphère humide à 37°C, 5% de CO_2 /95% d'air dans un incubateur Heraeus.

b. Culture des lignées cellulaires

Les cellules cancéreuses MDA-MB-231, MCF-7, BT-20 et les cellules immortalisées HBL-100 sont cultivées (en boîte 75 ou 175 cm^2) dans du milieu complet composé de MEM contenant 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels, 2 mM de glutamine, 5 $\mu\text{g/ml}$ d'insuline et des antibiotiques (pénicilline 40 UI/ml et streptomycine 40 $\mu\text{g/ml}$). L'addition de 20 mM d'Hepes et de 0,22% de bicarbonate de sodium permet d'ajuster le milieu à pH 7. Les cellules tumorales sont incubées également à 37°C en atmosphère humide (5% de CO_2 / 95% d'air). A confluence, les cellules sont dissociées en présence de trypsine avant d'être réparties dans de nouvelles boîtes. Plus précisément, les cellules sont d'abord rincées avec du milieu de sevrage pour éliminer les traces de sérum, puis incubées quelques minutes en présence de 1 à 2 ml de trypsine. Lorsque les cellules sont détachées du plastique, la digestion par la trypsine est arrêtée en présence de milieu complété en 10% SVF et les cellules sont dispersées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les cellules sont ensuite réensemencées au 1/10 de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture en présence de 12 ml de milieu pour une boîte 75 cm^2 . En sevrage, les cellules sont incubées dans un milieu MEM auquel sont ajoutés 30 $\mu\text{g/ml}$ de transferrine, 2 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectine et les mêmes quantités d'acides aminés non essentiels, de glutamine et d'antibiotiques que pour le milieu complet.

c. Cultures pour l'étude des régulations par le sérum et l'œstradiol

■ Régulation par le sérum de veau foetal

Lorsque les cellules normales, les HBL-100 et les lignées tumorales, ensemencées à faible densité, atteignent environ 50% de la confluence, le milieu complet est éliminé et les cellules sont rincées 2 fois par du milieu de sevrage.

Après 24 h de sevrage, les cellules sont divisées en 2 lots, une moitié qui sera maintenue en milieu de sevrage renouvelé et une moitié qui sera remise en milieu complet 10% de SVF. Après 24 h, le milieu de sevrage conditionné par les cellules est collecté puis congelé à -20°C en présence de 1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride) (Sigma). Les cellules sont récoltées pour l'extraction des protéines et la préparation des ARN messagers.

■ Régulation par le 17β -œstradiol

Les cellules à 50% environ de la confluence sont rincées 2 fois avec du PBS (voir annexe technique) et leur milieu de culture complet est remplacé par du milieu MEM sans rouge de phénol pour 48 h afin d'éliminer les œstrogènes endogènes. Le milieu sans rouge de phénol est suppléé en 2 mg/ml de sérum albumine bovine fraction V, 10 $\mu\text{g/ml}$ d'holotransferrine humaine, 5 $\mu\text{g/ml}$ d'insuline, 2 mM de glutamine, 2 mM d'acides aminés non essentiels et des antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Après les 48 h, un tiers des cellules est incubé en présence de 10^{-8} M de 17β -œstradiol (Sigma) dans le milieu décrit ci-dessus. Un autre tiers est mis en présence simultanément de 10^{-8} M de 17β -œstradiol et de 10^{-6} M de Tamoxifène (Sigma) (le Tamoxifène est un analogue des œstrogènes utilisé en chimiothérapie des cancers du sein hormono-dépendants, cette molécule entre en compétition avec l'œstrogène pour la fixation à son récepteur). Le dernier tiers représente l'expérience témoin qui a consisté à incuber les cellules dans le milieu sans rouge de phénol seul auquel sont ajoutées les mêmes quantités d'eau et d'éthanol absolu qui ont servi respectivement à dissoudre le 17β -œstradiol et le Tamoxifène. Après 24 h, les 3 types de milieux conditionnés sont récoltés et immédiatement congelés à -20°C . Les cellules sont récoltées par type d'expérience pour en extraire les protéines et les ARNm. Pour l'étude des régulations par le SVF et le 17β -œstradiol, les conditions d'incubation restent les mêmes que pour les cultures d'amplification des cellules, à savoir 37°C , 5% de $\text{CO}_2/95\%$ d'air dans un incubateur à atmosphère humide.

2. Extraction des protéines cellulaires

La méthode d'extraction des protéines diffère suivant la quantité de cellules traitées.

a. Extraction à partir de quantités importantes de cellules et de milieu conditionné

Cette méthode a été utilisée pour l'extraction de quantités importantes de cellules MDA-MB-231 cultivées en sevrage (20 boîtes de culture de 75 cm²) et de quantités plus réduites des autres cellules épithéliales mammaires (5 boîtes de culture). Pour les études de régulations de la production de FGF par le sérum ou les oestrogènes, d'importantes quantités de protéines devaient être également obtenues afin de permettre une quantification des FGF au-dessus des limites de détection. Deux boîtes de Pétri (pour culture cellulaire, 145 mm de diamètre) contenant à subconfluence environ $22 \cdot 10^6$ cellules sont utilisées par type d'expérience. Dans tous ces cas, les tapis cellulaires sont rincés par du tampon PBS, pH 7,5. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 50 µg/ml d'héparine (15 min à 37°C) afin de décrocher les protéines FGF de leurs sites de fixation membranaires. Puis les cellules sont décollées mécaniquement du plastique (grattoir pour cellules) et reprises dans des proportions de vol 1:4 de tampon Tris/HCl, pH 7,5 contenant 1,5 M de NaCl et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 mg/ml leupeptine, 1 mg/ml pepstatine et 1 mM d'EDTA ("ethylenediamine tetra-acetic acid")). Les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation (-70°C, 1 h)-décongélation (37°C, quelques minutes). L'extrait cellulaire est ensuite homogénéisé par "sonication" pendant 10 min à 4°C. L'homogénat est centrifugé 1 h à 25000 g (1500 tours, JA20, Beckman) et le surnageant dilué 10 fois avec du tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7,5 afin d'abaisser la concentration en NaCl de l'homogénat de 1,5 M à 0,15 M. La concentration en protéines totales est déterminée par la méthode BioRad (Richmond, CA, USA) selon la méthode Bradford (1976) avec la sérum albumine bovine comme standard.

b. Extraction à partir de quantités réduites de cellules

Cette technique a été utilisée pour optimiser l'extraction de FGF à partir des diverses cellules épithéliales mammaires cultivées en présence de sérum.

Après élimination du milieu conditionné, les cellules sont lavées 2 fois par du PBS puis lysées en présence de 1 à 2 ml de tampon de lyse (PBS, pH 7,5 contenant NaCl 2 M, 0,1% de Triton X100 et des antiprotéases: 1 mg/ml de PMSF, 1 µg/ml de leupeptine et 1 µg/ml de pepstatine). Les cellules sont incubées 5 min à 4°C,

récupérées à l'aide d'un grattoir de cellules et sont enfin broyées dans un appareil de Potter. La concentration en protéines totales du lysat cellulaire est déterminée par utilisation du kit de quantification BCA (Pierce) selon les recommandations du fabricant. Les lysats cellulaires sont dilués dans du PBS afin d'abaisser la concentration en NaCl de 2 M à 0,6 M. Pour cette extraction de protéines, dans le but d'analyser la production des FGF par les différentes lignées cellulaires et les CEMN dans les conditions normales de culture, une seule boîte de 75 cm² subconfluente (environ 4.10⁶ cellules) a été utilisée par type de cellules.

3. Purification par chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose

Le milieu conditionné ou le surnageant de l'homogénat cellulaire est déposé à 4°C sur une colonne d'héparine-sepharose pré-équilibrée par du tampon Tris/HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5. Les protéines affines pour l'héparine sont éluées à 4°C par des concentrations croissantes de NaCl (0,5, 1,15, 2 et 3 M) dans un tampon phosphate, pH 7,5. Le débit de la charge des échantillons et de leur élution est fixé à 15 ml/h.

Après extraction de quantités réduites de cellules, 600 µg de protéines totales (dans du PBS à 0,6 M de NaCl, pH 7,5) sont incubées en présence de 100 µl d'héparine-Sepharose (Pharmacia) préalablement équilibrée par du PBS, NaCl 0,6 M. Après une nuit sous agitation à 4°C, l'héparine-Sepharose est lavée 2 fois par du PBS, NaCl 0,6 M, pH 7,5. Les protéines fixées à l'héparine sont éluées par 100 µl de tampon de Laemmli 2x contenant 5% de b-mercaptoéthanol (1 nuit à température ambiante).

B. Détection des FGF1 et FGF2

1. Test ELISA

Des aliquots des éluats de la chromatographie sur héparine-Sepharose sont soumis à une immunodétection de type ELISA ("enzymatic ligand immunosorbant assay") sur plaque de microtitration souple 96 puits (Falcon). Cent microlitres d'éluat (ou de milieu conditionné de MDA-MB-231) sont déposés par puits pendant une nuit à 4°C. Puis l'éluat ou le surnageant de culture est aspiré à la pompe à vide et chaque puits est saturé avec 200 µl de PBS contenant 2% de SAB pendant 2 h à température ambiante. Les puits sont lavés 4 fois avec du PBS, 0,1% SAB, 0,05%

Tween 20. Les protéines adsorbées dans les puits sont incubées 4 h à température ambiante en présence des anticorps primaires (anti-FGF1 ou anti-FGF2, dons du Dr. Y. Courtois ou anti-FGF2 Farmitalia ou anti-FGF2-DG2, don du Dr. Reilly). Après 3 lavages avec le même tampon, l'incubation avec le second anticorps biotinylé (Sigma) (dilué au 1/7000) est réalisée pendant 1 nuit à 4°C. Après rinçage, un complexe streptavidine-peroxydase dilué au 1/70 dans du PBS/SAB/Tween est ajouté pendant 1 h à t° ambiante. Après 5 lavages, la révélation est réalisée en présence d'OPD (orthophényldiamine) (9 mg) dans un tampon citrate, pH 5,5 (25 ml) contenant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30% (16 ml). La révélation à 37°C pendant 20 à 30 min est enfin arrêtée par addition de 100 ml d'HCl 1 N. Dans le test témoin, l'anticorps primaire est remplacé par du sérum pré-immun de lapin (dans le cas où l'anticorps primaire est polyclonal) ou par du surnageant de culture de myélomes BALB/c (pour l'anticorps monoclonal). La densité optique du contenu des puits est appréciée au lecteur de plaques (MR 700 Dynatech) à 490 nm.

2. Immunocytochimie

Dans cette étude, nous avons utilisé deux types d'anticorps secondaires, soit un anticorps marqué à la fluorescéine, soit à la peroxydase.

a. Marquage par la fluorescéine (FITC)

Les cellules MDA-MB-231 sont d'abord cultivées sur lamelles dans du milieu complet (10% SVF) pendant 24 h avant d'être sevrées pendant 24 h. Les cellules sont lavées avec du PBS avant d'être fixées (2 h à 4°C) dans un mélange de méthanol 6 V /chloroforme 3 V /acide acétique 1 V. Les cellules sont réhydratées puis rincées dans du PBS avant d'être saturées dans un mélange PBS, SAB 0,1% pendant 30 min. La solution de saturation est éliminée puis les cellules sont incubées en présence de l'anticorps primaire (anti-FGF1 ou anti-FGF2 polyclonaux dilués au 1/100) pendant une nuit à 4°C en atmosphère humide. Avant l'addition du second anticorps couplé au FITC (Sigma), on procède à 3 lavages de 5 min dans du PBS et à une coloration de 5 min au bleu Evans 0,5% (dilué au 1/10000 dans du PBS, Sigma) puis à un rinçage rapide au PBS. Le second anticorps dilué au 1/80 est incubé 30 min en atmosphère humide à température ambiante et à l'obscurité puis les cellules sont lavées 3 fois 5 min au PBS avant le montage. Les témoins sont réalisés par incubation des cellules avec du sérum pré-immun de lapin ou en

omettant le premier anticorps. Après montage dans la glycérine, les cellules sont observées au microscope en fluorescence (Olympus BH 2) et les clichés réalisés sur film T-max 400 (Kodak Ektachrome).

b. Marquage à la peroxydase

Les cellules cultivées sur lamelles sont sevrées pendant 24 h après un jour de culture en milieu complet. Les cellules sont rincées par du PBS puis fixées (10 min) dans une solution PBS à 4% de paraformaldéhyde. Les cellules sont lavées par du PBS puis incubées (20 min) dans une solution de PBS, 3% H₂O₂ (30%), 1,5% de sérum de chèvre afin d'inhiber les peroxydases endogènes et de diminuer le marquage aspécifique. Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées (1 nuit à 4°C) avec l'anti-FGF1 ou l'anti-FGF2 dilué au 1/100 dans du PBS, 0,5% SAB, 0,5% Tween 20. Les témoins sont réalisés en remplaçant l'anticorps primaire par du sérum pré-immun de lapin à la même dilution. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées (90 min à température ambiante) avec l'anticorps secondaire: anti-IgG de lapin biotinylé (Sigma) dilué au 1/15 dans le tampon PBS, SAB, Tween 20. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois par du PBS puis incubées avec le complexe streptavidine-peroxydase (Sigma) dilué au 1/15 dans du PBS, 0,5% Tween 20 (90 min à t° ambiante). Après 3 lavages avec du PBS, l'immunoréactivité des cellules est révélée par incubation des cellules (10 à 15 min) dans une solution 5% AEC (Sigma), 1% H₂O₂ dans un tampon acétate 0,05 M, pH 5. Les cellules sont rincées avec de l'eau courante puis colorées quelques secondes à l'hématoxyline avant d'être montées au glycergel et photographiées au microscope.

3. "Western-blot"

Dans l'étude préalable sur les cellules MDA-MB-231 seules, les fractions NaCl 1,15 M et 2 M éluées de la colonne d'héparine-Sepharose ont été concentrées environ 500 fois sur membrane TM Micro-Pro Dicon (limite d'exclusion Mr de 10000, Spectrum, Los Angeles, CA, USA) contre du tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 contenant 0,5 M de NaCl. La quantité de protéines est ensuite déterminée par la technique du réactif BioRad. Les échantillons concentrés sont bouillis 5 min dans du tampon de Laemmli. Un aliquot de chaque échantillon concentré (environ 20 ng de protéine/puits) est déposé sur un gel de polyacrylamide à 15% contenant du SDS. Les protéines sont séparées, selon la technique décrite par Laemmli, dans

un système d'électrophorèse OSI. La migration a lieu à 199 V/27 mA pendant 90 min. Comme témoins positifs, du FGF1 et du FGF2 recombinants humains sont soumis simultanément à l'électrophorèse et les poids moléculaires sont déterminés par rapport à des témoins de masse standards (BioRad). Après la migration, le gel d'acrylamide est équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert, puis les protéines sont électrotransférées sur une membrane PVDF (Immobilon P, Millipore). Après un transfert de 3 h (80 V/243 mA), la partie de la membrane de transfert contenant les témoins de poids moléculaires est découpée puis colorée rapidement par une solution de bleu de Coomassie afin de les repérer. La membrane PVDF est dans un premier temps lavée 3x15 min dans du PBS, 0,05% Tween 20 puis saturée une nuit à 4°C dans une solution de PBS, 2% SAB, 0,05% Tween 20. Après 3 lavages au PBS, la membrane est incubée 5 h sous agitation à température ambiante avec l'anticorps primaire (anti-FGF1 ou anti-FGF2 polyclonal dirigé contre le FGF1 ou FGF2 recombinant humain, offerts par le Dr. Y. Courtois), dilué au 1/500 dans du PBS, Tween à 1% SAB. Après 3 lavages par du PBS Tween, la membrane est incubée une nuit à 4°C avec un anticorps secondaire (Sigma) dirigé contre le sérum de lapin et conjugué à la biotine (dilution 1/7000, Sigma). Après 2 lavages de 10 min au PBS Tween, le complexe antigène-anticorps est mis en présence du système d'amplification streptavidine-peroxydase (Sigma) dilué au 1/70 dans du PBS (1 h à t° ambiante) puis révélé par une coloration au chloronaphtol. Dans l'étude de l'expression des protéines FGF1 et FGF2 dans les cellules mammaires normales et cancéreuses cultivées en présence de 10% de sérum, les conditions de "Western-blot" ont été modifiées afin d'optimiser la détection de faibles quantités de FGF (les éluats d'héparine-sépharose n'ont pas été concentrés). Après ébullition (5 min) 10 mg de protéines affines pour l'héparine sont déposés par puits d'un gel de polyacrylamide à 18% (SDS-PAGE). Après une électrophorèse de 45 min à 200 V, les protéines sont soumises à un électrotransfert (45 min à 50 mA) sur une membrane de nitrocellulose (Optitran BA-S 83, Schleicher et Schuell). L'électrotransfert est réalisé dans un appareil Bio-Rad. La membrane de transfert est ensuite saturée (1 nuit sous agitation à 4°C) dans du PBS, 0,2% Tween 20, 5% de lait (écrémé en poudre). La membrane est incubée (1 h à 37°C) avec l'anticorps primaire anti-FGF1 polyclonal dilué au 1/5000 dans du PBS, pH 7,4 contenant 0,2% de Tween 20 et 1% de lait. Après 3 lavages (15 min à

température ambiante) par le même tampon PBS/Tween/lait, la membrane est incubée (1 h à 37°C) en présence de l'anticorps secondaire: anti-IgG de lapin biotinylé produit chez l'âne (Amersham) et dilué au 1/400 dans le tampon PBS, Tween, lait 1%. Trois nouveaux lavages dans le tampon précédent sont réalisés (15 min à 37°C) avant l'incubation de la membrane (1 h à 37°C) avec le système de détection amplifié à la streptavidine-peroxydase (1/400, Amersham), la membrane est ensuite lavée 2 fois par du tampon PBS, Tween, lait 1% puis 1 fois par du PBS seul (37°C). Le complexe antigène-anticorps est révélé à l'aide des réactifs du kit ECL (Amersham) selon les recommandations du fabricant.

C. Dosage des FGF1 et FGF2 par EIA ("Enzyme Immuno Assay")

Les quantités de FGF1 et FGF2 contenues dans les éluats NaCl 1,15 M et 2 M de la chromatographie d'affinité sur héparine-Sepharose sont déterminées par un dosage de type EIA en phase solide (Caruelle *et al.*, 1988). Le principe de cette technique repose sur une compétition entre un traceur, en l'occurrence le FGF couplé à l'acétyl cholinestérase (FGF-AChE) et le FGF à doser, au niveau des sites de reconnaissance d'un anticorps polyclonal spécifique du FGF. La séparation entre le traceur lié et le traceur libre est obtenue grâce à un 2ème anticorps monoclonal de souris anti-IgG de lapin (Fig. 7).

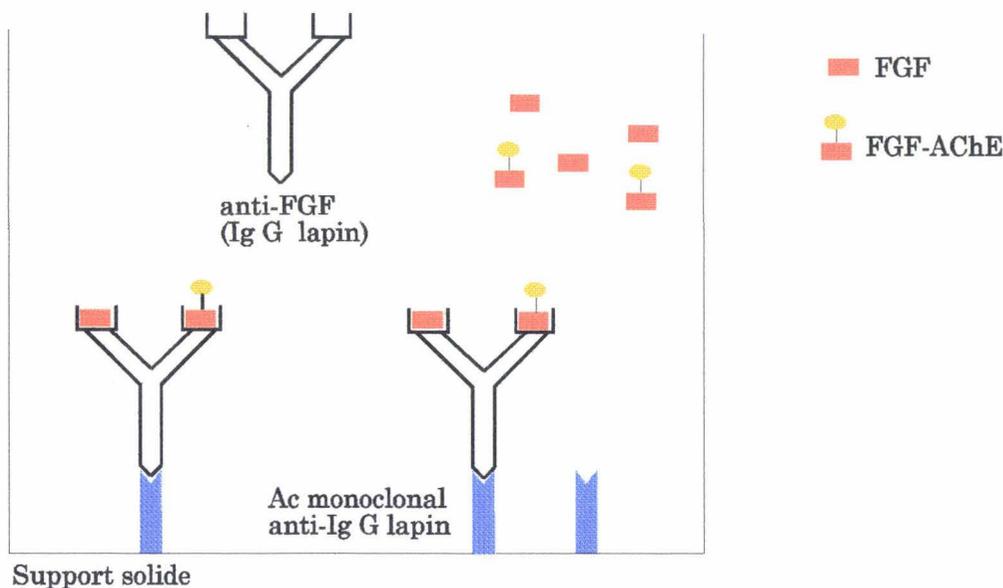


Figure 7. Représentation schématique du principe de la technique EIA

L'anticorps monoclonal de souris anti-IgG de lapin, dilué dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, est adsorbé à 2 µg par puits d'une plaque de microtitration 96 puits. Après élimination de cet anticorps, les puits sont saturés par du tampon EIA contenant 1% de SAB puis lavés par du tampon de lavage EIA. Les plaques sont remplies de 300 µl de tampon EIA et stockées à 4°C jusqu'à emploi. Les puits sont vidés puis 50 µl de tampon EIA, 50 µl de l'échantillon et 50 µl d'anticorps anti-FGF (1/10000) sont ajoutés par puits. Une gamme de dilution de FGF1 standard est réalisée par des dilutions par entraînement au 1/2 (le point le plus haut de la gamme est à 100 ng/ml). La fixation non spécifique (NSB=bruit de fond) est déterminée en incubant le traceur seul sans l'anticorps anti-FGF, soit 100 µl de tampon EIA et 50 µl de traceur. Le témoin de fixation du traceur en l'absence de compétiteur (Bo) est déterminée en incubant, dans le tampon EIA (50 µl), 50 µl de traceur et 50 µl d'anticorps anti-FGF. La plaque est incubée 5 h à t° ambiante. 50 µl de traceur FGF-AChE sont ensuite ajoutés à raison de 1 unité Ellman/ml. Une unité Ellman est définie comme étant la quantité d'enzyme produisant une augmentation de 1 unité DO pendant 1 min dans 1 ml de solution pour une cellule de mesure de 1 cm. La plaque est incubée une nuit à 25°C puis lavée 6 fois par 200 µl/puits de PBS, 0,05% Tween 20. Les puits sont vidés et 200 µl de réactif Ellman sont ajoutés. La plaque est enfin soumise à une agitation à t° ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à apparition d'une coloration jaune, la réaction enzymatique est développée pendant 1 à 2 h. L'absorbance à 412 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque Bio-Rad. La valeur de la densité optique correspondant à la compétition entre le traceur et le FGF à doser est noté B, B étant égal à la différence entre la densité optique mesurée pour l'échantillon et celle mesurée pour la fixation non spécifique ($B=DO_E-NSB$). Pour chaque valeur de la gamme étalon et pour chaque échantillon les résultats sont exprimés en terme de % $B/Bo=DO_E-NSB/Bo \times 100$. La courbe de la gamme étalon ou $B/Bo \times 100$ est fonction de la quantité de FGF (ng/ml), elle est établie afin de lire directement la valeur en ng/ml de FGF correspondant aux densités optiques des échantillons analysés. Toutes les mesures sont effectuées en 6 exemplaires.

D. Mesure de l'activité biologique

1. Culture des cellules cibles

CCL-39: cette lignée fibroblastique de poumon de hamster chinois fortement stimulée par le FGF à proliférer est utilisée pour les tests biologiques de mise en évidence de l'activité mitogène du FGF produit par les cellules normales et cancéreuses du sein. Ces cellules sont cultivées en milieu MEM contenant 10% de SVF, 2 mM de glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels et des antibiotiques. Les cultures sont incubées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules sont divisées 2 fois par semaine.

PC-12: cette lignée de phéochromocytome de rat est induite dans la voie de la différenciation par le FGF2. L'addition de faibles quantités de FGF2 (environ 5 ng/ml) dans leur milieu de culture dépourvu de sérum transforme les PC-12, normalement rondes, en des cellules en forme de neurones. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF, 5% de sérum de cheval, 2 mM de glutamine, des acides aminés non essentiels et des antibiotiques.

2. Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée

Les tests biologiques par incorporation de thymidine tritiée sont réalisés dans des boîtes de culture de 24 puits (Falcon) selon la méthode décrite par Plouët et collaborateurs (1984). Les cellules sontensemencées à 40000 cellules/ml de milieu de culture par puits. Tous les tests biologiques sont réalisés sur les cellules subconfluentes pendant 24 h. Quatre heures avant la fin du test biologique, 1 µCi (1 Ci= 37 GBq) de thymidine tritiée ([³H]-méthyl-thymidine) est ajouté dans chaque puits, puis les cellules sont remises à 37°C pendant 4 h. Le milieu est éliminé, les cellules rincées par du PBS puis fixées (45 min, 4°C) à l'acide trichloroacétique 5%. Les cellules sont rincées 3 fois à l'eau courante et les puits sont séchés à la pompe à vide. Les cellules sont enfin lysées dans 0,5 ml d'une solution de NaOH 0,3 M (1 h à 37°C). Le lysat est placé dans une fiole à scintillation contenant 2,5 ml de liquide scintillant (Ready Safe, Beckman). La radioactivité de chaque puits est mesurée par un compteur b (LKB, Wallac).

3. Les tests biologiques

L'activité biologique des FGF sécrétés par les cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses est appréciée sur les cellules elles-mêmes et sur les deux types cellulaires CCL-39 et PC-12 capables de répondre au FGF.

a. Activité mitogène du FGF endogène

Les cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses sont mises en suspension en présence de trypsine puis rincées 2 fois par du milieu de sevrage. Les cellules sont ensuiteensemencées à 20000 cellules/puits d'une plaque de 24 puits dans 250 ml de milieu de sevrage contenant des concentrations croissantes en anticorps anti-FGF1 neutralisants (0, 1, 4 ou 8 µg/250 µl). Les cellules sont maintenues en présence des anticorps 68 h à 37°C (atmosphère humide, 5% CO₂). Quatre heures avant la fin du test (à la 62ème heure), 1 µCi de thymidine tritiée est ajouté par puits et les cellules sont mises à incuber à 37°C pendant 4 h. La mesure de la radioactivité correspondant à la [³H]-thymidine incorporée est effectuée selon le protocole décrit précédemment. Le témoin de cette expérience correspond à la valeur 0, c'est-à-dire culture des cellules dans du milieu de sevrage ne contenant pas d'anticorps. Chaque test est réalisé en 6 exemplaires.

b. Test de l'activité mitogène sur CCL-39

L'activité mitogène du FGF produit par les cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses est appréciée sur CCL-39 de la façon suivante. Les CCL-39 sontensemencées à 20000 cellules/puits (d'une boîte de 24 puits) dans du milieu complet (10% SVF). A subconfluence, les fibroblastes sont sevrés pendant 24 h. Le milieu de sevrage est éliminé, les tapis cellulaires lavés 2 fois avec du milieu de sevrage puis les cellules sont incubées en présence d'éluats de chromatographie sur héparine de lysats de cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses. L'influence de ces éluats sur les fibroblastes est appréciée par incorporation de thymidine tritiée. Chaque test est réalisé en 6 exemplaires.

c. Test de l'activité différenciatrice sur PC-12

Un test simple consiste à incuber des cellules PC-12 en présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales mammaires et d'observer les cellules au microscope à contraste de phase. L'expérience témoin consiste à ajouter à la culture de PC-12 du milieu de sevrage non conditionné correspondant à celui des

cellules épithéliales mammaires. Le contrôle positif consiste à incuber les PC-12 en présence de 10 ng/ml de FGF2 recombinant humain (standard). Les cellules des différents expériences sont photographiées au même moment.

E. Détection des ARNm spécifiant les FGF1 et FGF2

1. Purification des ARN totaux et des ARN polyA

Les ARN totaux sont préparés selon la technique décrite par Chirgwin et collaborateurs (1979). Les cellules sont décollées du fond de la boîte de culture (75 cm²) à l'aide d'un grattoir dans 1 à 2 ml de tampon guanidinium. L'homogénat cellulaire est "soniqué" quelques secondes à 4°C (sur de la glace) puis déposé délicatement sur un coussin de chlorure de césium dans des tubes d'ultracentrifugation pour rotor SW 50-1 (Beckman). Après centrifugation (rotor SW 50-1, 150000 g, 1 nuit à 20°C), le culot d'ARN est rincé avec de l'éthanol 70% puis séché à température ambiante. Le culot d'ARN est ensuite repris dans 300 ml de tampon acétate de Na-b-mercaptoéthanol-sarcosyl de Na. La solution d'ARN est placée dans un tube Eppendorf puis 150 µl de la phase inférieure d'une solution de phénol saturé en Tris est ajouté. Le tube est agité pendant 10 min avant l'addition de 150 µl d'une solution de chloroforme/alcool isoamylique 24:1 (V/V). Le tube est à nouveau agité pendant 10 min puis centrifugé 15 min à 1650 g. La phase aqueuse contenant les ARN est récupérée puis placée dans un nouveau tube Eppendorf. Les ARN sont précipités par 50 ml d'acétate de sodium 3 M, pH 7,5 (0,3 M final) et 2 volumes d'éthanol 100% (-20°C, minimum 2 h). Les ARN précipités sont centrifugés (10 min à 11000 g), le culot rincé par de l'éthanol puis recentrifugé. L'éthanol est éliminé, le culot est séché au "speed-vac" pendant 30 min puis repris dans de l'eau exempte de RNase (eau de qualité mQ autoclavée en chaleur humide, 1 h à 130°C). La concentration en acides nucléiques est évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm, une unité de DO correspondant à une concentration de 40 mg/ml d'ARN.

Les ARN polyA sont purifiés sur colonne d'oligo-dT cellulose à partir de 1 mg d'ARN totaux. 0,5 g d'oligo-dT cellulose sont pré-équilibrés dans du tampon TE, NaCl 0,5 M, le gel ainsi formé est rincé par 10 volumes de NaOH 0,1 M, puis ré-équilibré par 10 volumes de tampon TE, NaCl 0,5 M (le pH de la colonne doit être de 7,4). La solution d'ARN totaux est dénaturée à 65°C pendant 3 min, refroidie rapidement sur la glace puis portée à une concentration finale de 0,5 M en NaCl.

Les ARN totaux sont injectés dans la colonne et cette colonne rincée par 3 volumes de tampon TE, NaCl 0,5 M. Cet éluat est repassé 3 fois sur le gel. Le gel est relavé par 10 volumes de TE, NaCl 0,5 M, avant d'être lavé par 3 volumes de TE, NaCl 0,1 M. Les ARN polyA sont élués par 3 volumes de tampon TE sans NaCl. Cet éluat contenant les ARN polyA est réinjecté dans la colonne puis les ARN polyA élués avec de l'eau de qualité mQ exempte de RNase. Les ARN polyA sont précipités par de l'acétate de sodium 0,3 M final et 2 volumes d'éthanol (2 h à -20°C). Après centrifugation (11000 g, 30 min, 4°C), le culot d'ARN polyA est séché puis repris dans de l'eau exempte de RNase.

2. Electrophorèse et transfert des ARN: "Northern-blot"

Vingt microgrammes d'ARN totaux ou 10 µg d'ARN purifié sur colonne d'oligo-dT sont repris dans un volume final de 20 µl de tampon de dénaturation, chauffés 15 min à 65°C et placés immédiatement dans de la glace. 2 µl de bleu de charge et 1 µl de bromure d'éthidium (BET à 1 mg/ml) sont ajoutés. Des marqueurs de poids moléculaires: ARNr 18S et 28S sont également préparés pour l'électrophorèse. Les ARN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) dénaturant (2,2 M de formaldéhyde). La migration s'effectue à voltage constant (80 V) pendant 6 h en tampon MOPS. Après la migration les ARN sont transférés dans du tampon SSC 20x (standard sodium citrate) sur membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) pendant 36 h à température ambiante. Les ARN transférés sont ensuite fixés à la membrane par un étuvage de 2 h à 80°C.

3. Amplification des ADNc utilisés comme sondes

Initialement nous disposions d'un fragment d'ADN de 250 pb codant pour la séquence 1-41 du FGF1 du cerveau de boeuf et d'un fragment d'ADN de 1,4 kb codant pour la totalité du FGF2 bovin. Ces fragments sont amplifiés afin d'en obtenir des quantités suffisantes en vue de leur utilisation comme sonde de détection des ARNm codant pour le FGF1 et le FGF2. Les bactéries, HB 101 (conservées à -20°C) contenant le plasmide pSP 65 dans lequel est inséré l'un ou l'autre des ADNc sont remises en culture (en agitation douce une nuit à 37°C) dans du milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline, antibiotique dont le gène de résistance est porté par le plasmide. Une dilution 1/50 de la culture bactérienne est réalisée dans 500 ml de milieu LB/ampicilline et les bactéries remises en agitation

à 37°C jusqu'à ce que la DO du milieu de culture à 600 nm atteigne la valeur 1. Sont ajoutés ensuite 170 µg/ml de chloramphénicol (Boehringer) puis l'incubation est poursuivie pendant une nuit à 37°C. Le milieu de culture est centrifugé (rotor Sorval, 7000 rpm, 10 min) puis le culot bactérien repris par 4,5 ml de tampon GTE. Les bactéries sont lysées dans 9 ml d'une solution NaOH 0,2 M, SDS 1% par agitation douce et une incubation de 30 min dans de la glace. La soude est neutralisée par 4,5 ml d'un tampon K Ac. Après 10 min dans de la glace, un précipité blanc constitué de protéines et de débris cellulaires se forme. Ce précipité est éliminé par centrifugation de 10 min à 15000 rpm dans un rotor SS 34 Sorval. Les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont précipités par l'addition de 12 ml d'isopropanol. Le surnageant est éliminé 10 min plus tard par une nouvelle centrifugation (rotor HB 4 Sorval, 10000 rpm, 10 min). L'isopropanol est évaporé puis le culot est repris dans 5 ml de tampon Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM auxquels sont ajoutés 5,3 g de chlorure de césium et 170 µl de BET (solution mère à 8 mg/ml). Le mélange est réparti dans des tubes à sceller (Beckman) pour une centrifugation verticale (rotor VTI 65, 45000 rpm, 16 h, 18°C). L'ADN plasmidique séparé de l'ADN bactérien et des ARN est prélevé à l'aide d'une seringue piquée à travers le tube à centrifuger. La solution de plasmides est transférée dans un tube à hémolyse et le BET extrait plusieurs fois par du butanol saturé en Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM. La solution plasmidique est ensuite dialysée contre 500 ml de tampon Tris 10 mM, pH 8, EDTA 10 mM (TE) pendant une nuit. Après 2 nouvelles dialyses, l'ADN plasmidique est précipité par 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol pendant 2 h à -20°C. Après centrifugation (10000 g, 15 min, 4°C) le culot de plasmide est rincé par de l'éthanol, séché puis repris dans de l'eau pure. La qualité de la préparation est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,9% en tampon TBE. 10 µg de plasmides sont digérés 2 h à 37°C par les enzymes de restriction qui ont servi à l'intégration des ADNc dans le poly-linker du plasmide pSP 65. Ainsi l'ADNc du FGF1 est libéré du plasmide dans un volume réactionnel de 60 µl contenant le tampon de digestion (Gibco/BRL) et les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI (BRL). L'ADNc du FGF2 est libéré selon la même technique par *Eco* RI. Après addition du bleu de charge, les plasmides digérés sont soumis à une électrophorèse

(tampon TBE, 90 V, 1 h) en gel d'agarose 0,9% contenant quelques gouttes de BET. La migration est examinée par illumination du gel aux rayons UV. Lorsque les bandes de 250 pb (ou de 1,4 kb) sont suffisamment séparées du plasmide, une fenêtre est découpée dans le gel à l'aide d'un scalpel puis placée dans un tube Eppendorf. Les fragments ADNc sont enfin extraits du gel d'agarose par utilisation d'un kit GeneClean II (BIO 101 Inc.).

4. Hybridation des sondes ADNc

La membrane sur laquelle les ARN sont fixés est préhybridée dans le tampon de préhybridation pendant 4 h en agitation à 42°C. La solution de préhybridation est éliminée et remplacée par la solution d'hybridation contenant la sonde radiomarquée au ^{32}P (kit et protocole Pharmacia de marquage par random-priming) à raison de 2 à 3.10^6 cpm/ml. L'hybridation s'effectue pendant une nuit à 42°C. La membrane est ensuite lavée à température ambiante 2 fois 10 min dans du tampon SSC 2x, 0,1% SDS, 2 fois 15 min à 65°C dans du tampon SSC 1x, 0,1% SDS et enfin 1 fois 10 min à 65°C dans du tampon SSC 0,1x, 0,1% SDS. La membrane est séchée à température ambiante avant d'être radiographiée entre deux écrans intensificateurs à -80°C sur film Kodak X Omat S pendant une nuit ou plus (en fonction de l'intensité du signal obtenu). Le film est révélé (révélateur Kodak LX24), fixé (fixateur Kodak AL4) puis abondamment rincé à l'eau.

5. RT-PCR

a. Rétrotranscription

Dans un tube Eppendorf 1 µg d'ARN total cellulaire et 150 µg de transcrits codant pour la nitrate réductase de feuille de tabac sont rétrotranscrits par la transcriptase reverse MMLV. Les 2 types d'ARN sont placés dans un mélange réactionnel d'un volume final de 30 µl contenant: 6 µl du tampon de rétrotranscription (Tris/HCl 50 mM, pH 8,9, MgCl_2 3 mM, KCl 75 mM), 0,6 µg de SAB, 4 mM d'un mélange de désoxyribonucléotides, 2,5 µM d'amorces hexanucléotidiques, 0,3 µl de RNAsine et de l'eau filtrée sur système Millipore et stérilisée qsp 27,3 µl (la provenance de tous les réactifs est détaillée dans le chapitre Matériel). Ce mélange est dénaturé 3 min à 95°C puis une fois refroidi (10°C), lui sont ajoutés 0,7 µl de RNAsine et 2 µl de transcriptase reverse Mo MMLV (300 U). Le mélange est incubé 2 h à 42°C, dénaturé 3 min à 95°C puis

conservé à -20°C jusqu'à emploi. Comme témoin de non contamination un tube contenant tous les réactifs sauf l'ARN total est également préparé en parallèle.

b. Amplification PCR

1/10 du volume de rétrotranscrits, soit 3 µl d'ADNc sont amplifiés par la Taq polymérase dans un volume final de 100 µl contenant du tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8,9, MgCl₂ 7 mM, KCl 50 mM, sulfate d'ammonium 15 mM, de la SAB (0,17 mg/ml), 1 mM d'un mélange de désoxyribonucléotides, 15 pmoles d'amorces désoxyoligonucléotidiques spécifiques du FGF1 (séquence codante et séquence contenant les exons non codants alternativement épissés au 1er exon codant), du FGF2 et de la nitrate réductase (la spécificité, la séquence et la position des amorces est détaillée dans le chapitre Matériel). Cent ml d'huile de paraffine stérile sont ajoutés avant l'incubation du mélange dans l'appareil PCR. L'amplification se déroule en 3 étapes: la dénaturation (92°C, 30 s), l'hybridation des amorces (62°C, 1 min) et l'extension (72°C, 30 s). De l'ARN non rétrotranscrit est également soumis à une amplification PCR pour servir de contrôle négatif d'une contamination par de l'ADN de la solution d'ARN cellulaire initiale. Dans des expériences préliminaires, le niveau d'ARNm du FGF1 ou du FGF2 dans les différentes lignées cellulaires est examiné par 20 à 40 cycles d'amplification et la phase exponentielle linéaire de leur amplification déterminée. Cependant, il peut apparaître des différences dans l'efficacité de RT-PCR entre chaque expérience. Par conséquent, afin de s'assurer que l'amplification a bien lieu en phase exponentielle de la réaction PCR, pour chaque expérience ont été réalisés 3 aliquots amplifiés à 3 cycles différents (28, 30 et 35 cycles). L'ADNc de la nitrate réductase est co-amplifié avec les ADNc du FGF1 et du FGF2 afin de vérifier que l'efficacité de la PCR reste identique dans les différents échantillons de chaque expérience. Les co-amplifications sont menées selon les combinaisons suivantes: FGF1 codant/FGF2/NR ; E1.A/E1.C/NR et E1.B/E1.D/NR.

c. Electrophorèse et transfert des ADNc: "Southern-blot"

Les produits des amplifications PCR et des témoins de masse ADN (BRL) sont séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide 10%. Aux 20 µl d'ADNc amplifiés sont ajoutés 6 µl de bleu de charge avant d'être soumis à une migration (30 mA constant, 2 h) dans du tampon TBE. Après l'électrophorèse, le gel

est coloré dans de l'eau contenant quelques gouttes de BET pendant 10 min. Après plusieurs rinçages à l'eau, le gel est examiné aux UV et des photos sont prises au polaroïde. Une étape de dénaturation est réalisée avant l'électrotransfert des ADNc séparés sur gel par incubation du gel dans 250 ml d'un tampon NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M pendant 10 min. Après 3 rinçages avec de l'eau de qualité mQ, le gel est rincé 3 fois dans du tampon citrate 0,15 M (trisodium citrate dihydrate 0,15 M). L'électrotransfert semi-sec est réalisé en tampon citrate à 0,8 mA/cm² pendant 2 h dans un sandwich constitué par une pile de 9 papiers de Whatman, la membrane Hybond N⁺ préalablement neutralisée (2 min) dans du méthanol, le gel puis 1 autre pile de papiers Whatman. L'ensemble est placé entre deux électrodes de l'appareil d'électrotransfert Bio-Rad.

d. Hybridation des sondes oligonucléotidiques et ADNc

La membrane de transfert est séchée 2 h à 80°C, préhybridée dans une solution de préhybridation pour "Southern-blot" puis hybridée dans cette même solution avec la sonde radiomarquée au ³²P et préalablement dénaturée (3 min à 95°C puis sur la glace). L'hybridation a lieu pendant un minimum de 2 h en agitation à 42°C. La solution d'hybridation diffère en fonction du type de sonde utilisé (oligo-ou polynucléotidique) (voir annexe technique). Les bandes d'ADNc correspondant au FGF1 codant et à la nitrate réductase sont révélées par hybridation avec des sondes ADNc polynucléotidiques spécifiques marquées au [³²P]-dCTP (Amersham) par la méthode du kit random-priming (Amersham). La membrane de transfert contenant les fragments amplifiés correspondant au FGF2 et aux transcrits FGF1 contenant l'un des exons (A, B, C ou D) alternativement épissé au 1er exon codant est hybridée avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chacun de ces transcrits (séquence et position sont reportées dans le chapitre Matériel) radiomarquées au [³²P]-γATP (Amersham) par la méthode du kit de kination (Amersham). La membrane hybridée avec une sonde radiomarquée par "random-priming" est lavée une fois 15 min à 42°C dans du tampon SSC 1x, SDS 0,1% puis 2 fois 15 min à 65°C dans du tampon SSC 0,1x, SDS 0,1%. La membrane hybridée avec les sondes oligonucléotidiques est lavée de la même manière mais à 55°C au lieu de 65°C. La membrane de transfert est ensuite exposée à un film autoradiographique X-OMAT AR5-Kodak. Le film est ensuite révélé comme précédemment décrit pour la technique "Northern blot".

Résultats

Chapitre I

LES FGF1 ET FGF2 DANS LES CELLULES EPITHELIALES NORMALES ET TUMORALES DU SEIN

Une partie des résultats a fait l'objet d'une publication parue (El Yazidi et Boilly-Marer, 1995) et de deux publications soumises à publication dans:

Experimental Cell Research sous le titre de "Production and estrogen regulation of FGF1 and FGF2 in normal and cancer breast cells." El Yazidi I., Renaud F., Courtois Y., Boilly-Marer Y.

Biochem. Biophys. Res. Commun. sous le titre de "Differential regulation by serum of the different FGF1 mRNA expression in mammary epithelial cells." Renaud F., El Yazidi I., Boilly-Marer Y., Courtois Y., Laurent M.

I. INTRODUCTION

La prolifération des cellules normales ou cancéreuses de la glande mammaire est sous le contrôle de plusieurs facteurs dont les hormones stéroïdes et les facteurs de croissance. Les facteurs de croissance sont mitogènes pour une grande variété de cellules normales ou cancéreuses d'origine diverse. Ils sont capables d'induire l'angiogenèse péritumorale et le processus de métastase. Cependant, le rôle du FGF1 et du FGF2 dans la prolifération des cellules épithéliales du sein n'est pas encore complètement élucidé. Les études portant sur la localisation des FGF dans la glande mammaire normale ou cancéreuse présentaient, à leur début, une contradiction dans les résultats obtenus (origine myoépithéliale ou épithéliale du FGF). Les cultures cellulaires représentent donc une méthode intéressante pour l'analyse de la production du FGF par les cellules mammaires indépendamment de toute source externe de FGF. La culture *in vitro* permet également l'étude du rôle biologique spécifique au FGF endogène. L'analyse *in vitro* de la production et du rôle des FGF dans des cellules épithéliales mammaires normales et dans différents types de cellules cancéreuses correspondantes nous permettra de déterminer s'il existe une corrélation entre la production du FGF1 et du FGF2 et si la production de l'un et/ou l'autre de ces facteurs est impliquée dans le processus de la tumorigenèse mammaire.

II. RESULTATS

A. Les protéines FGF1 et FGF2

1. Immunocytochimie

a. Marquage par la fluorescéine

Une analyse immunocytochimique préliminaire des cellules épithéliales mammaires cancéreuses MDA-MB-231 à l'aide d'anticorps anti-FGF1 et anti-FGF2 démontre l'existence de protéines FGF1 et FGF2 dans le cytoplasme de ces cellules (Fig. 8, a et b respectivement). Le témoin réalisé par substitution de sérum de lapin pré-immun à l'anticorps anti-FGF ne montre pas de fluorescence (le second anticorps est couplé au FITC) (Fig. 8c).

b. Marquage à la peroxydase

La même technique est ultérieurement réalisée sur l'ensemble des cellules étudiées: cellules épithéliales mammaires normales (CEMN), cellules immortalisées (HBL-100) et cellules cancéreuses (MDA-MB-231 et MCF-7) de sein, à l'aide des anticorps anti-FGF1 et anti-FGF2 et de deuxième anticorps couplé à la peroxydase. Les anticorps anti-FGF1 et anti-FGF2 montrent une immunoréactivité positive au niveau du cytoplasme de CEMN, des HBL-100 et des MDA-MB-231 (Fig. 9: b, c ; e, f ; k, l). Comparativement aux autres cellules, l'immunomarquage des FGF1 et 2 dans la lignée MCF-7 est beaucoup plus faible (Fig. 9h, i). Les expériences contrôles, correspondant aux cellules incubées en présence de sérum de lapin pré-immun, ne montrent aucune immunoréactivité (Fig. 9a, d, g, j). Cette étude a été réalisée deux fois et des résultats identiques sont obtenus dans les deux expériences.

A la suite de ces observations qui semblent indiquer la présence de FGF1 et FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses, nous avons poursuivi la recherche de ces molécules au niveau d'extraits cellulaires et aussi du milieu conditionné par ces cellules.

2. Isolement et caractérisation des FGF

L'étude de la production de FGF1 et FGF2 a été réalisée sur des cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses cultivées dans du milieu

Figure 8. Immunolocalisation du FGF1 et du FGF2 dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 sevrées.

Les anticorps dirigés contre le FGF2 et le FGF1 révèlent la présence de FGF2 (**a**) et FGF1 (**b**) dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 (x 1600). Dans l'expérience contrôle (**c**), l'anticorps primaire est remplacé par du sérum de lapin pré-immun. Le noyau est indiqué par la lettre **n**.

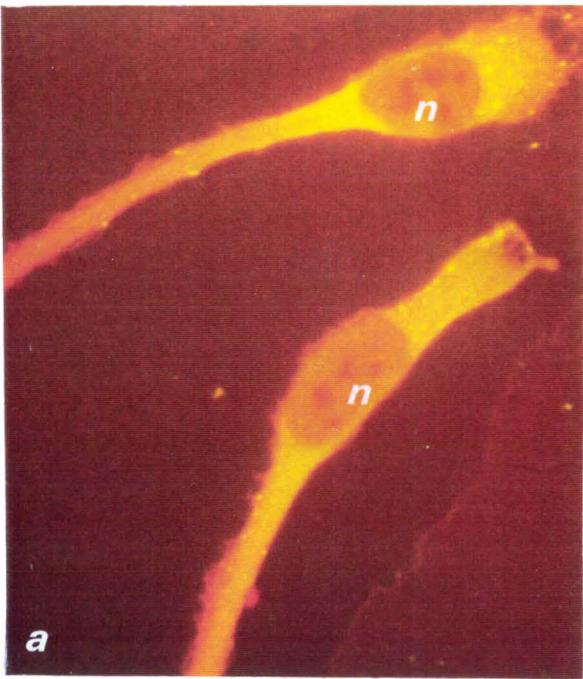
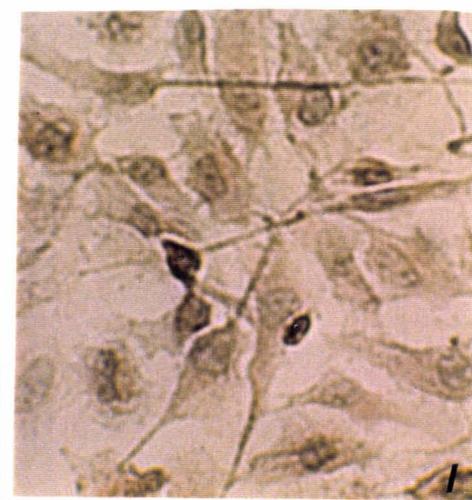
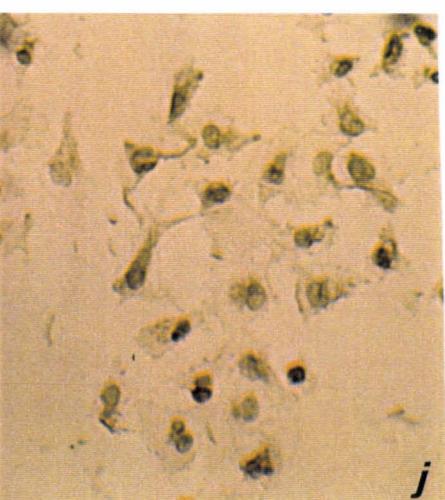
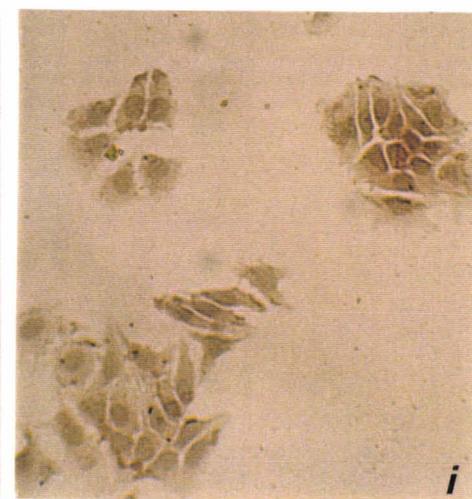
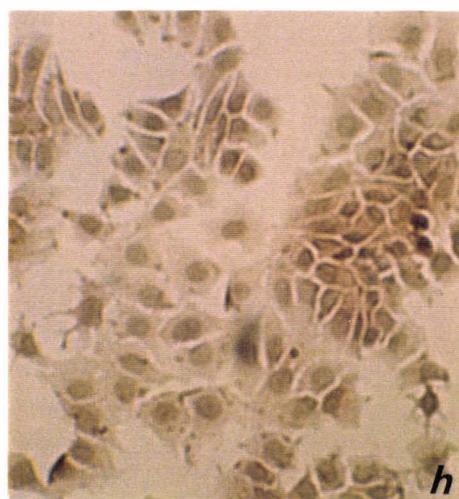
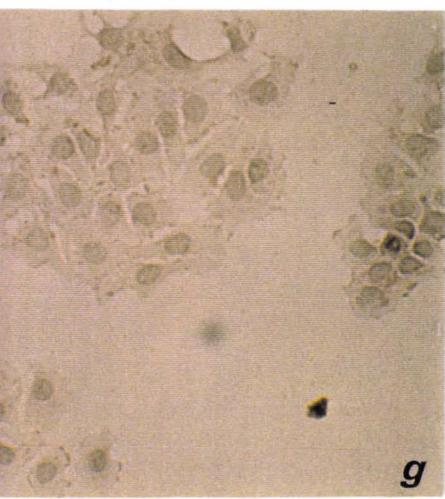
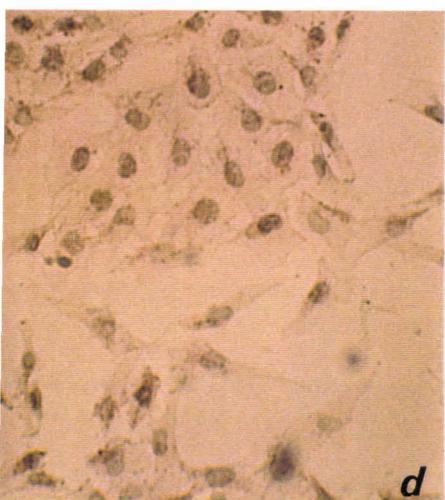
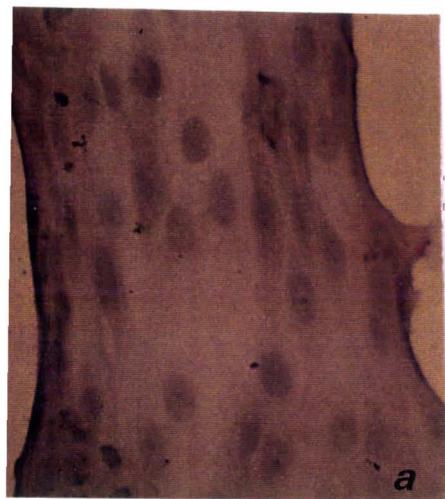


Figure 9. Immunolocalisation du FGF1 et du FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires normales, immortalisées et cancéreuses.

Les expériences témoins (sérum pré-immun de lapin), l'immunolocalisation du FGF1 et du FGF2 sont montrées respectivement pour les CEMN (**a**, **b** et **c**), les cellules HBL-100 (**d**, **e** et **f**), MCF-7 (**g**, **h** et **i**) et MDA-MB-231 (**j**, **k** et **l**). (x 900).



de sevrage pour éviter l'interférence de toute trace de FGF exogène pouvant être contenu dans le sérum.

a. ELISA

Après chromatographie d'affinité sur l'héparine du contenu cellulaire et du milieu conditionné, les fractions éluées en présence de concentrations croissantes de NaCl ont été soumises à un test de détection immunologique de FGF (ELISA) à l'aide d'anticorps anti-FGF1 et anti-FGF2. Des molécules apparentées aux FGF1 et FGF2 ont été détectées respectivement dans les fractions éluées en présence de NaCl 1,15 M et de NaCl 2 M.

b. "Western-blot"

La production massive de cellules MDA-MB-231 nous a permis de concentrer 500 fois les fractions éluées de la colonne d'héparine- Sepharose avant de les soumettre à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert des protéines ("Western-blot"). L'anticorps anti-FGF1 révèle une bande protéique proche de 18 kDa dans les fractions éluées en présence de NaCl 1,15 M à partir d'extraits cellulaires (Fig. 10, ligne C) ou de milieu conditionné (Fig. 10, ligne B). Une bande correspondant à une protéine de type FGF2 est détectée, par l'anticorps anti-FGF2, dans les éluats obtenus en présence de NaCl 2 M à partir du surnageant de culture (Fig. 10, ligne E) ou du contenu cellulaire (Fig. 10, ligne F).

L'analyse par "Western-blot" du contenu cellulaire de l'ensemble des cellules épithéliales mammaires (normales et cancéreuses) étudiées a été réalisée sur les éluats NaCl 1,15 M non concentrés. La quantité de protéines totales de chacune des fractions correspond environ au 1/20 de celle utilisée dans l'étude initiale sur les cellules MDA-MB-231. La reconnaissance de protéines par l'anticorps anti-FGF1 a été visualisée après révélation du deuxième anticorps marqué à la peroxydase soit par réaction avec le chloronaphtol, soit en utilisant le kit ECL (chimiluminescence, Amersham). Une bande de poids moléculaire apparent de 18 kDa comigrant avec la protéine FGF1 a été nettement révélée pour les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) (Fig. 11), plus faiblement pour les lignées HBL-100 et MDA-MB-231 mais n'a pas été détectée dans la lignée cellulaire MCF-7.

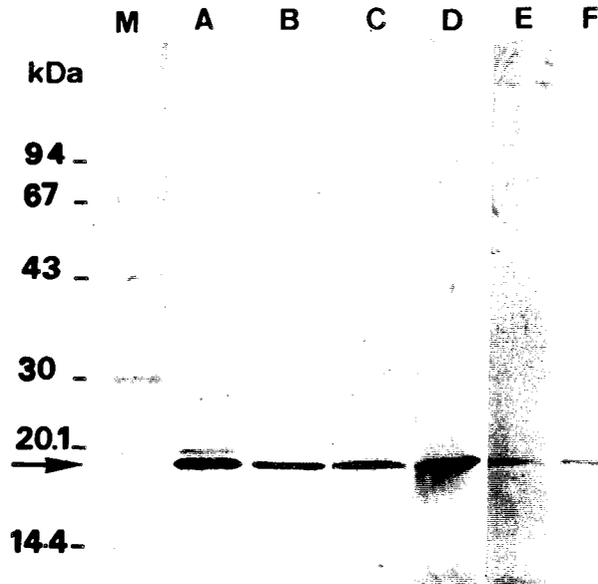


Figure 10. Analyse par "Western-blot" du milieu de sevrage conditionné et de l'extrait cellulaire des cellules MDA-MB-231 après chromatographie sur héparine-Sepharose.

Des protéines comigrant avec le FGF1 recombinant humain (ligne A) sont détectées avec l'anticorps anti-FGF1 dans les fractions de milieu conditionné (ligne B) et d'extrait cellulaire (ligne C) éluées en NaCl 1,15 M. L'anticorps anti-FGF2 a révélé la présence de protéines comigrant avec le FGF2 standard (ligne D) dans les fractions de surnageant de culture (ligne E) et d'extrait cellulaire (ligne F) éluées en présence de NaCl 2 M. Les fractions ont été préalablement concentrées (500 fois).

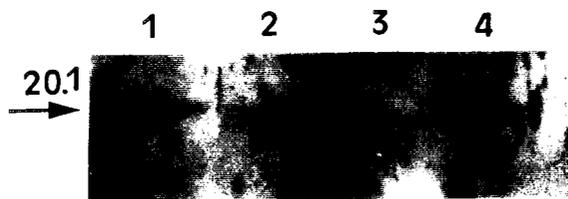


Figure 11. Analyse par "Western-blot" des extraits cellulaires non concentrés de CEMN, de cellules HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231 en culture normale (10% de sérum).

Une bande protéique de poids moléculaire apparent 18 kDa est détectée dans l'extrait des CEMN (ligne 1), des signaux plus faibles sont obtenus pour les cellules HBL-100 (ligne 2) et MDA-MB-231 (ligne 4). La protéine FGF1 n'a pu être détectée dans l'extrait cellulaire des cellules MCF-7 (ligne 3).

3. Quantification par EIA

La quantification du FGF1 et du FGF2 par la technique EIA, méthode de dosage très sensible, permet une bonne approche de la quantité de FGF produit par les cellules mammaires normales et cancéreuses. Nous avons dosé les fractions issues de l'élution en NaCl 1,15 M et en NaCl 2 M. Les valeurs obtenues pour chaque fraction ont été additionnées et le total rapporté à la quantité de protéines totales extraites. Chaque valeur est la moyenne de 6 mesures. L'EIA que nous avons employé pour cette étude nous a permis de doser le FGF1 avec une sensibilité de l'ordre de 2 ng/ml. La sensibilité du test est définie comme étant la valeur correspondant à B/Bo égale à 50%. La limite de détection ou de recevabilité du dosage est fixée pour une valeur de B/Bo égale à 80%. Dans notre étude la limite de détection du FGF1 est de 0,2 ng/ml. Les quantités de FGF1 produit par les cellules épithéliales mammaires normales et les lignées transformées ou cancéreuses sont rapportées dans le tableau XII. Un test EIA utilisant un compétiteur du FGF2 (FGF2-AChE) et un anticorps anti-FGF2 a permis de la même façon de quantifier le FGF2 intracellulaire. La sensibilité du test est de 4,4 ng/ml et la limite de détection de 0,6 ng/ml. Les valeurs en ng/mg de protéines du FGF2 exprimé dans les cellules mammaires sont également rapportées dans le tableau XII. Les résultats obtenus (tableau XII) montrent que dans un milieu de culture dépourvu de sérum les cellules épithéliales mammaires cancéreuses très invasives MDA-MB-231 expriment le facteur de croissance FGF1 à un taux plus élevé par rapport aux cellules normales et aux autres lignées cellulaires. Cependant, les cellules normales (CEMN) expriment plus de FGF1 que les cellules cancéreuses MCF-7 ou les cellules transformées HBL-100. Les cellules cultivées en absence de sérum expriment faiblement le facteur FGF2 (de l'ordre de 0,2 ng/mg de protéines) (tableau XII).

Tableau XII. FGF1 et FGF2 intracellulaires quantifiés en culture sans sérum (ng/mg de protéines).

	CEMN	HBL-100	MCF-7	MDA-MB-231
FGF1	6,18	1,6	4,3	11
FGF2	0,16	0,2	ND*	0,16

* *Quantité non décelée.*

Les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 ont été également quantifiés dans les surnageants de culture. Les milieux conditionnés par les CEMN et les cellules HBL-100 contiennent une quantité de FGF1 de l'ordre de 2 ng/mg de protéines. Le milieu conditionné par les cellules MDA-MB-231 en contient un peu plus (3,2 ng/mg de protéines). Le surnageant de culture des cellules MCF-7 contient très peu de FGF1 (0,18 ng/mg de protéines). De très faibles quantités de FGF2 (de l'ordre de 0,2 ng/mg de protéines) ont été détectées dans les surnageants de culture de l'ensemble des cellules épithéliales mammaires étudiées.

4. Les tests biologiques

Afin de montrer que les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 produits par les cellules épithéliales mammaires sont biologiquement actifs, deux types de tests sont réalisés: un test utilisant des cellules sensibles aux FGF et un test sur les cellules productrices elles-mêmes.

a. Test de mitogénicité sur CCL-39

La prolifération des fibroblastes de poumon de hamster chinois CCL-39 est stimulée par de faibles quantités de FGF exogène. Les fibroblastes CCL-39 sont incubés en présence des fractions NaCl 1,15 M et 2 M éluées de la chromatographie sur héparine-Sepharose, des lysats cellulaires et de milieux conditionnés, de façon à ce que la concentration en NaCl dans les puits de culture soit de 0,2 M. Les résultats obtenus (Fig. 12) indiquent que la fraction NaCl 1,15 M de l'extrait cellulaire (cellules normales et cancéreuses) est mitogène pour les cellules CCL-39. La stimulation la plus importante a été obtenue dans le cas de la fraction éluée en présence de NaCl 1,15 M des cellules MDA-MB-231. La fraction NaCl 1,15 M des cellules normales reste la moins active. Nous pouvons donc conclure que la fraction NaCl 1,15 M de toutes les cellules contient un facteur affiné pour l'héparine et biologiquement actif. Seules les fractions NaCl 2 M des CEMN et des cellules MDA-MB-231 sont mitogènes pour les cellules CCL-39 (Fig. 12). Cette fraction contient donc un facteur mitogène se liant à l'héparine et élué à NaCl 2 M .

Une activité mitogène plus faible a été également démontrée au niveau des fractions NaCl 1,15 M et 2 M isolées du milieu conditionné par les cellules.

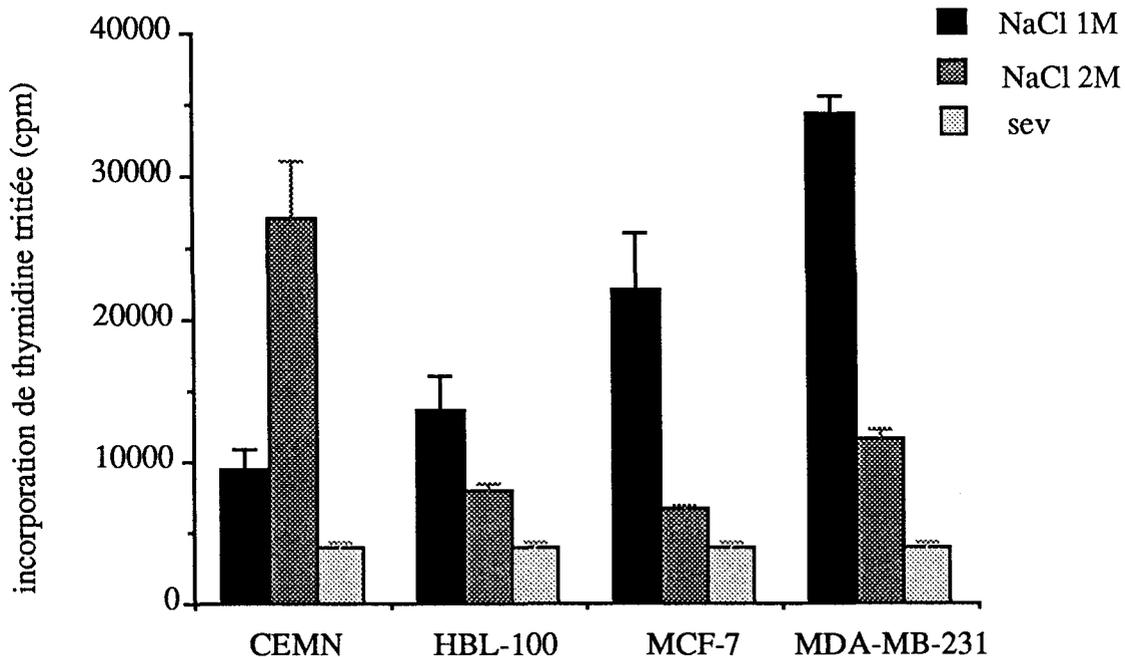


Figure 12. Tests de mitogénicité sur cellules CCL39 des fractions NaCl 1,15 M et 2M éluées par chromatographie sur héparine-Sepharose de lysats cellulaires. La culture en absence de sérum et sans addition de fraction de lysat cellulaire constitue l'expérience témoin (sevrage: sev.). La prolifération des cellules CCL39 est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

b. Test de différenciation sur PC-12

Les PC-12 sont des cellules particulièrement sensibles au FGF. Sous l'action de faibles doses de ce facteur elles réagissent en se différenciant en neurones. Cette évolution se traduit par la croissance de neurites (Fig.13b). Dans l'étude préliminaire sur la lignée MDA-MB-231, l'incubation de PC-12 en présence de surnageant de cellules MDA-MB-231 sevrées stimule la différenciation de neurites (Fig. 13c) mais de façon modérée. En milieu de culture normal, les cellules PC-12 sont rondes et ne possèdent pas de neurites (Fig. 13a).

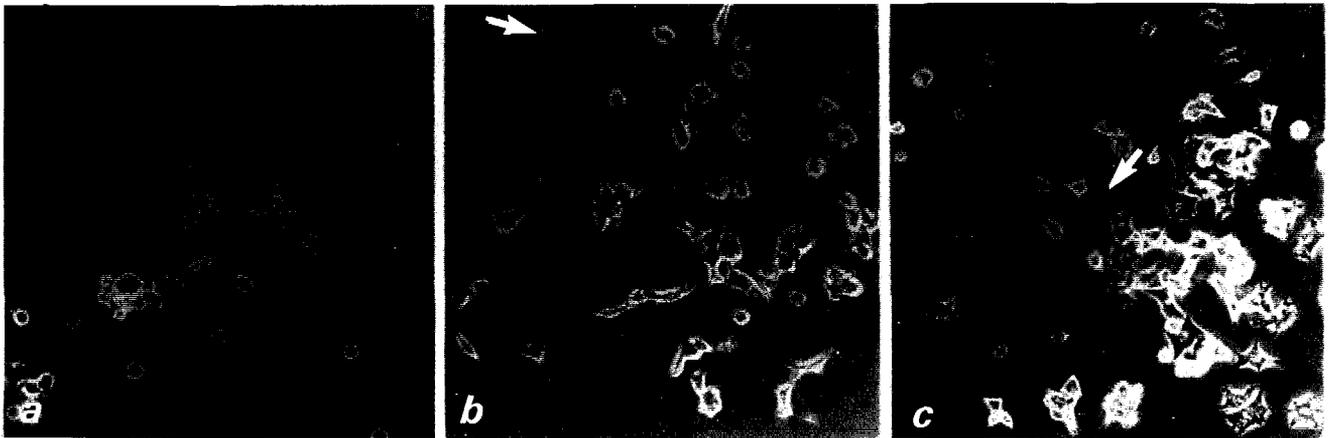


Figure 13. Test d'induction de neurites chez les cellules PC12 sous l'action de FGF2 et de surnageant de culture de cellules mammaires cancéreuses MDA-MB-231 (Grossissement x150).

a. Cellules PC12 cultivées en milieu dépourvu de sérum.

b. Cellules PC12 24 hr. après addition de FGF2 (10 ng/ml) (La flèche indique l'un des neurites induit par ce facteur de croissance).

c. Cellules PC12 24 hr. après addition de surnageant de culture (sans sérum) de MDA-MB-231.

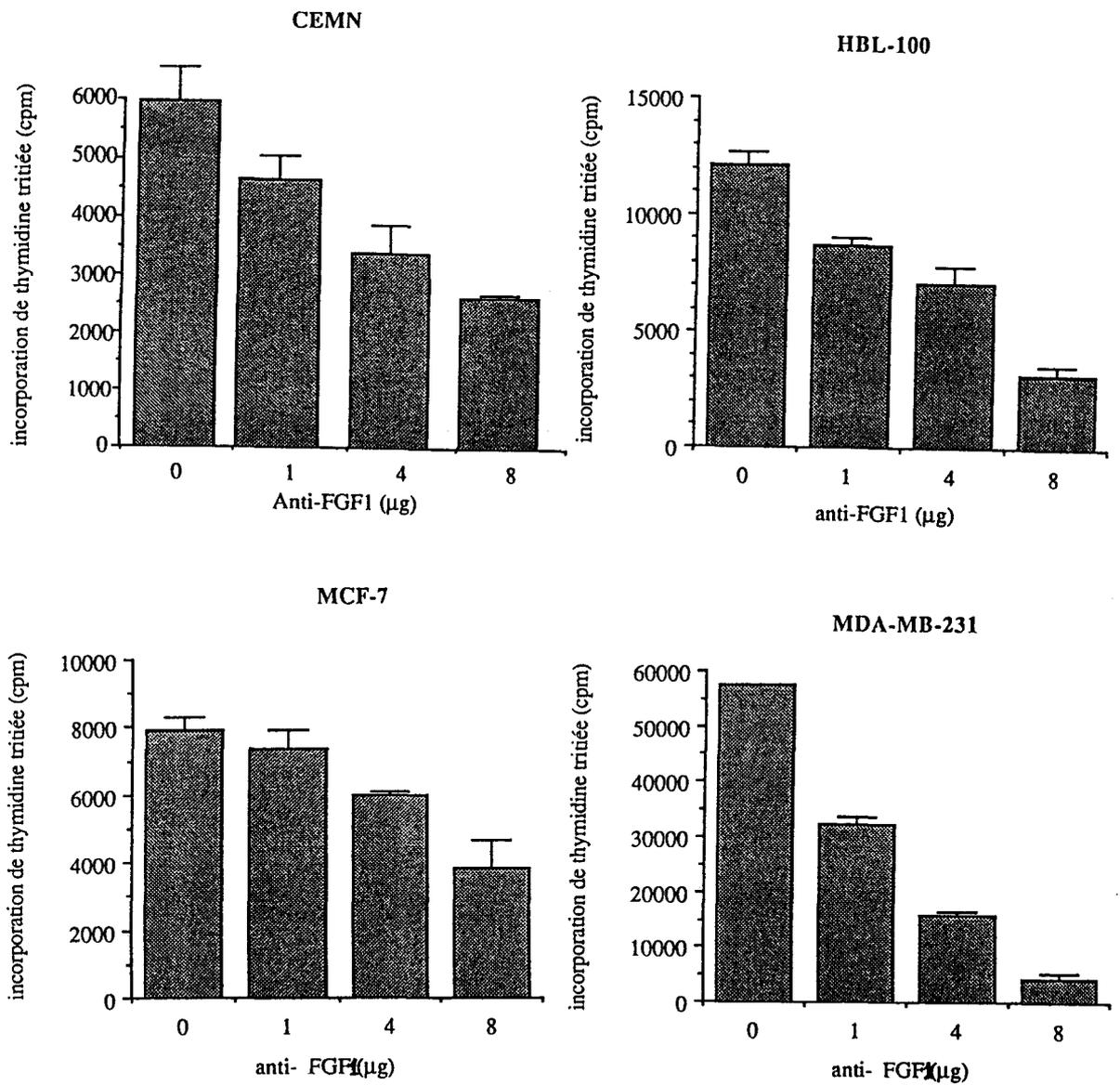


Figure 14. Prolifération des cellules épithéliales mammaires en présence ou non (valeur 0) d'anticorps anti-FGF1 neutralisant (47 α). Les cellules mammaires sont incubées en milieu de culture dépourvu de sérum en présence de quantités croissantes d'anticorps. La prolifération est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

c. Activité biologique du FGF endogène

L'activité de type FGF1 du milieu conditionné par les cellules mammaires est recherchée à l'aide d'un anticorps anti-FGF1 neutralisant (47 α). Les cellules mammaires sont incubées en présence de concentrations croissantes en anticorps dans du milieu dépourvu de sérum. L'anticorps neutralisant induit une diminution dose-dépendante de la prolifération des cellules normales (CEMN), transformées (HBL-100) et cancéreuses (MCF-7 et MDA-MB-231) (Fig. 14). La concentration maximale (8 μ g/250 μ l) induit une inhibition de la prolifération de l'ordre de 90% pour les cellules MDA-MB-231, 70% pour les HBL-100 et 50% pour les MCF-7 et les CEMN. L'addition simultanée de FGF1 standard (12,5 ng) et de l'anticorps (4 μ g/250 μ l) annule l'inhibition de la prolifération observée avec l'anticorps seul (Fig. 15).

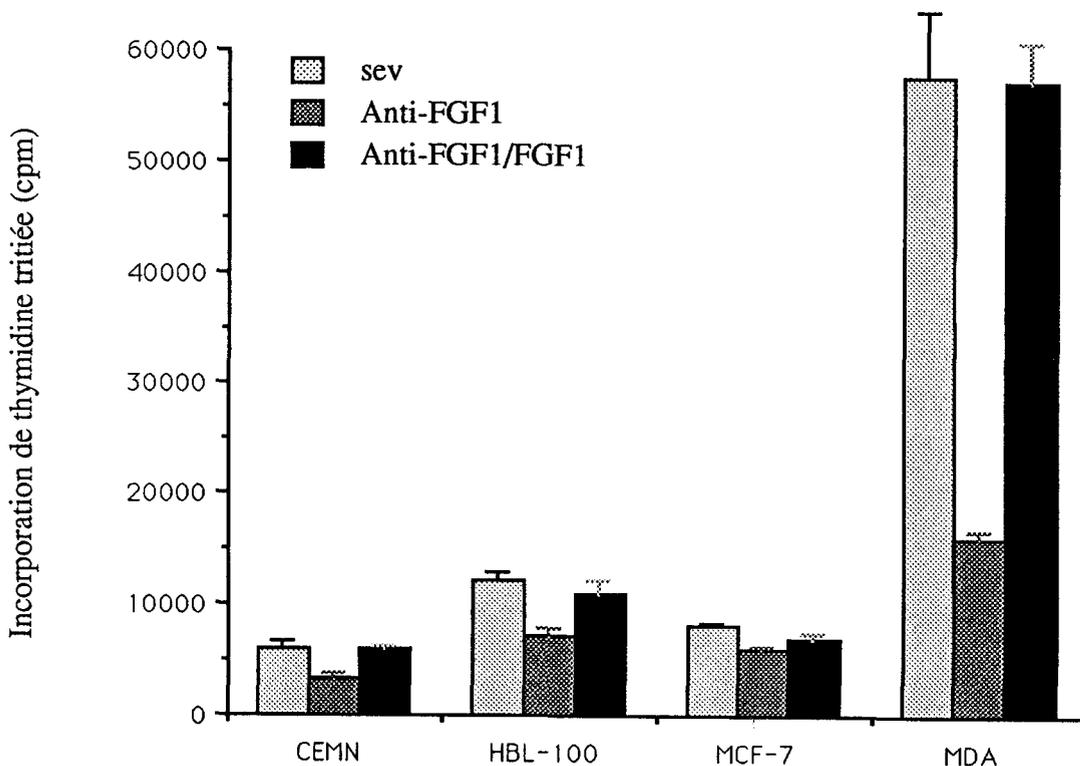


Figure 15. Activité du FGF1 endogène sur les cellules épithéliales mammaires.

Les cellules sont incubées en présence de l'anticorps anti-FGF1 neutralisant seul (anti-FGF1) ou avec l'anticorps et 12,5 ng de FGF1 (anti-FGF1/FGF1). Dans l'expérience témoin, les cellules sont cultivées en milieu de sevrage seul (sev.). La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

Ces résultats indiquent que les cellules épithéliales mammaires normales, transformées et cancéreuses produisent toutes la protéine FGF1 et que ce facteur est sécrété dans le milieu extracellulaire. Le FGF1 endogène est biologiquement actif et semble stimuler la prolifération des cellules mammaires selon une boucle autocrine externe.

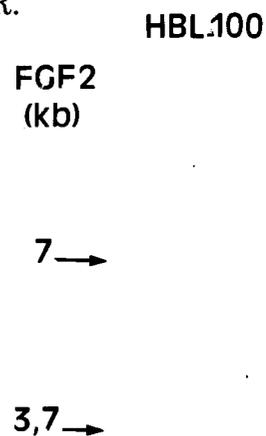
L'addition de l'anticorps anti-FGF1 neutralisant 3D12 diminue également la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales, transformées et cancéreuses MDA-MB-231 (non montré). Cependant, en comparaison avec l'anticorps anti-FGF1 47 α , le 3D12 est efficace à des doses élevées (32 $\mu\text{g}/250 \mu\text{l}$). L'utilisation de cet autre anticorps anti-FGF1 neutralisant met également en évidence la sécrétion de FGF1 par les cellules épithéliales mammaires et le mode d'action autocrine de ce facteur.

B. Les transcrits spécifiant les FGF1 et FGF2 (culture sans sérum)

1. Analyse par "Northern-blot"

Avant l'obtention des cellules normales (CEMN), 20 μg d'ARN total de cellules HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231 sont analysés pour l'expression d'ARNm de FGF1 et FGF2. Seule la sonde polynucléotidique FGF2 (1,4 kb) hybride deux transcrits FGF2 de 7 et 3,7 kb dans l'ARN total des cellules HBL-100 (Fig. 16). Il semblait donc que les niveaux d'expression de ces facteurs de croissance dans les autres lignées soient trop faibles pour être détectés dans les ARN totaux. L'analyse par "Northern-blot" d'ARN polyA aboutit au même résultat que celle des ARN totaux. Ceci nous a conduit à utiliser la RT-PCR pour analyser l'expression des transcrits FGF1 et FGF2 par le biais d'une amplification PCR.

Figure 16. Analyse par "Northern-blot" de l'expression des ARNm du FGF2 dans les cellules mammaires HBL-100.



2. Analyse par PCR

L'ARNm du FGF1 est amplifié dans les CEMN et les lignées HBL-100 et MDA-MB-231 (Fig. 17A, lignes 1, 2, 5). A 30 cycles, il n'y a pas d'amplification d'ARNm du FGF1 dans les lignées MCF-7 et BT-20 (Fig. 17A, lignes 3, 4). Les transcrits FGF1 dans ces 2 dernières lignées ont pu être amplifiés à 40 cycles (Fig. 17B, lignes 3, 4). L'ARNm du FGF1 est donc également présent dans les cellules MCF-7 et BT-20 mais à un taux beaucoup plus faible par rapport au niveau d'expression de ce transcrit dans les CEMN, les cellules HBL-100 et les MDA-MB-231. Après 30 cycles d'amplification PCR, l'ARNm du FGF2 est amplifié dans les CEMN et les cellules HBL-100 (Fig. 17A, lignes 1, 2) mais pas dans les lignées MDA-MB-231, BT-20 et MCF-7 (Fig. 17A, lignes 3, 4, 5). Cependant, après 40 cycles d'amplification, l'ARNm du FGF2 est détecté dans la lignée MDA-MB-231 (Fig. 17C, ligne 5) et très peu dans la lignée BT-20 (Fig. 17B, ligne 3). Même après 40 cycles de PCR, les cellules MCF-7 ne montrent aucune trace de transcrits FGF2 (Fig. 17, ligne 4). L'ARNm du FGF2 est donc présent essentiellement dans les cellules épithéliales mammaires normales et dans les cellules transformées HBL-100. Les lignées MDA-MB-231 et BT-20 en contiennent beaucoup moins.

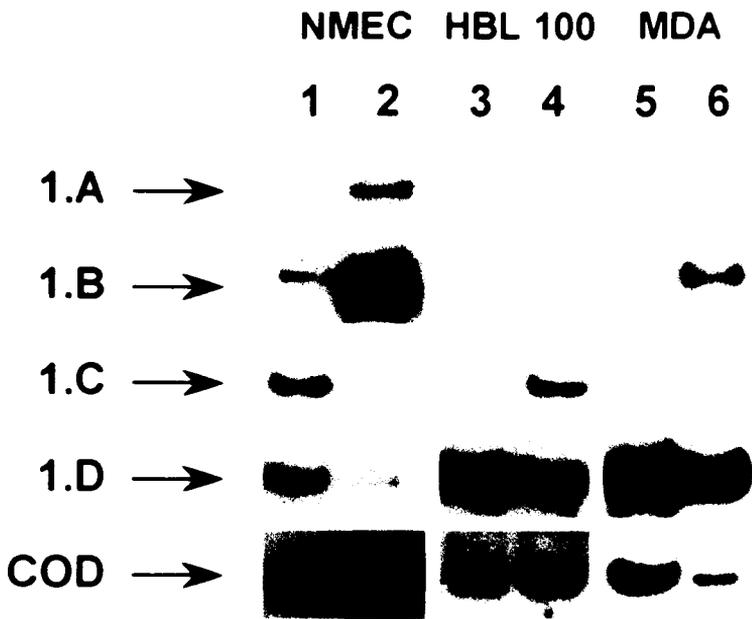
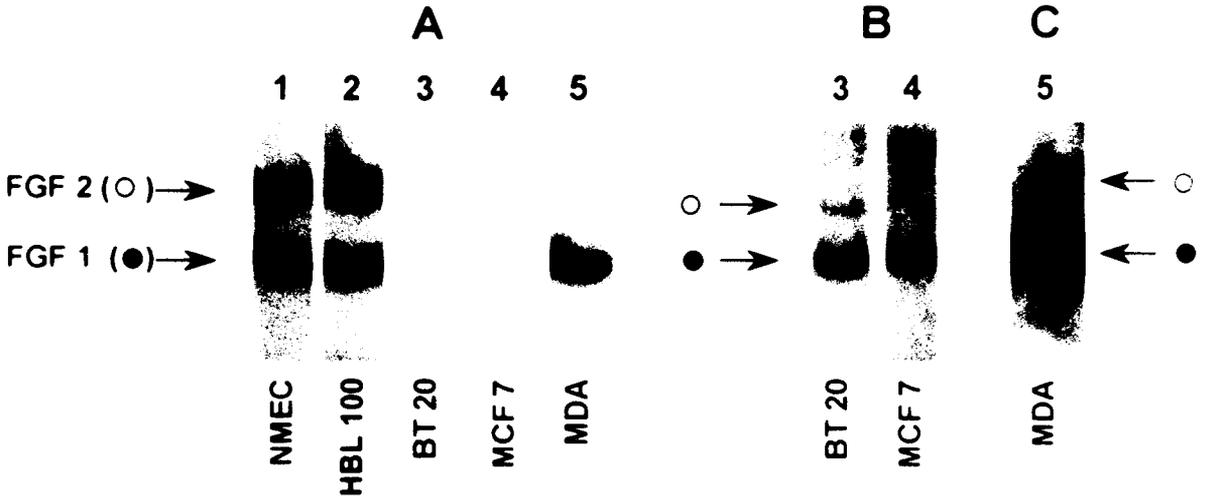
Le gène FGF1 humain (près de 120 kb) contient 3 exons codants et 6 exons non codants en amont de l'ATG (-1A, -1B, -1C, -1D, -1E, -1F). L'épissage alternatif des exons de la région 5' non codante au premier exon codant génère 7 transcrits FGF1 différents (1A, 1B, 1C, 1D, 1A'/F, 1A'/B et 1A'/E). Les 3 derniers transcrits viennent d'être décrits récemment (Voulgaropoulou *et al.*, 1994). Dans notre thèse nous avons analysé, par PCR, l'expression des transcrits alternativement épissés 1A, 1B, 1C et 1D dans les lignées mammaires. Les "patterns" d'expression diffèrent en fonction de la lignée cellulaire. Les cellules MCF-7 et les BT-20 n'expriment que le transcrit 1D mais très faiblement (non montré). Le transcrit 1A est détecté uniquement dans les cellules mammaires normales (CEMN) (Fig. 18, ligne 2). Le transcrit 1B est présent dans les CEMN et les MDA-MB-231 (Fig. 18, lignes 2, 6). Le transcrit 1C est présent dans les cellules HBL-100 et à un niveau plus faible dans les CEMN (Fig. 18, lignes 4, 2). Le transcrit 1D est présent dans les cellules MDA-MB-231 et les HBL-100 à un niveau beaucoup plus important que dans les cellules normales (Fig. 18, lignes 6, 4, 2).

Figure 17. Analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits FGF1 et FGF2.

A. Détection des transcrits FGF1 (●) et FGF2 (○) dans les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN), les cellules immortalisées HBL-100 et les cellules cancéreuses MCF-7, BT-20 et MDA-MB-231. **B.** Détection du FGF1 dans les cellules BT-20 et MCF-7 après 40 cycles d'amplification PCR. Un faible taux de transcrits FGF2 est détecté pour les cellules BT-20. **C.** Détection à 40 cycles de transcrits FGF2 dans la lignée MDA-MB-231.

Figure 18. Analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits alternativement épissés 1A, 1B, 1C et 1D du FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires.

Le transcrit 1A est spécifique des CEMN (ligne 2). Le transcrit 1B est exprimé dans les CEMN et les cellules MDA-MB-231 (lignes 2 et 6). Le transcrit 1C est exprimé dans les cellules HBL-100 (ligne 4) et très faiblement dans les CEMN (ligne 2). Le transcrit 1D est exprimé dans les cellules HBL-100 (ligne 4) et MDA-MB-231 (ligne 6) et très faiblement dans les CEMN.



En résumé, dans un milieu de culture dépourvu de sérum, les cellules épithéliales mammaires normales expriment les 4 types de transcrits FGF1. La lignée immortalisée HBL-100 exprime les 2 types C et D alors que la lignée cancéreuse MDA-MB-231 exprime les transcrits 1B et 1D. Les lignées cancéreuses MCF-7 et BT-20 expriment également le transcrit 1D mais très faiblement. Le transcrit 1A est spécifique des cellules normales. Le transcrit 1B représente la majorité des ARN FGF1 dans les CEMN. Dans les cellules immortalisées HBL-100 et dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231, c'est principalement le transcrit 1D qui représente la majorité des messagers.

III. DISCUSSION, CONCLUSIONS

Nos résultats d'immunodétection des protéines FGF1 et FGF2 montrent que les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN), les cellules transformées HBL-100 et les cellules cancéreuses MDA-MB-231 produisent du FGF1 et du FGF2. Comparativement, un taux faible de ces facteurs de croissance est exprimé dans la lignée MCF-7. D'après l'analyse "Western-blot", les protéines extraites des cellules mammaires semblent contenir du FGF1 et du FGF2 correspondant à la forme de poids moléculaire apparent de 18 kDa. Les tests biologiques sur cellules sensibles (CCL-39 et PC-12) nous ont permis de montrer que les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 produits par les cellules mammaires sont biologiquement actifs. L'utilisation d'anticorps neutralisants dans le milieu de culture (sans sérum) des cellules mammaires nous permet en plus de déduire que le facteur de croissance produit est sécrété dans le milieu extracellulaire et qu'il est capable de stimuler la prolifération de ces cellules selon une boucle autocrine externe.

En général, les résultats PCR corroborent ceux concernant l'expression des protéines FGF1 et FGF2. En effet, les cellules (CEMN, HBL-100 et MDA-MB-231) exprimant la protéine FGF1 contiennent des niveaux importants d'ARNm FGF1. La lignée MCF-7 contient peu de facteurs et moins de transcrits par rapport aux autres cellules. D'après les résultats EIA, la lignée cancéreuse la plus invasive MDA-MB-231 semble produire plus de facteur FGF1 que les cellules normales ou transformées. Cependant, la lignée cancéreuse invasive MCF-7 en contient beaucoup moins. Les résultats PCR montrent par contre une plus forte

transcription des ARNm FGF1 dans les cellules normales et transformées comparativement aux cellules cancéreuses MDA-MB-231. Ce paradoxe suggère une différence dans le contrôle de la traduction des transcrits FGF1 dans les différentes lignées et dans les cellules normales. Cette différence dans la traduction pourrait être due à l'expression différentielle des transcrits 1A, 1B, 1C et 1D. En effet, des travaux de plus en plus nombreux permettent de montrer le rôle important des séquences 5' et 3' non codantes des ARNm dans le contrôle de la traduction. Roy et collaborateurs (1992) ont montré qu'une séquence 5' non codante (NC), présente sur un transcrit chimère v/c-fos est nécessaire à l'activité déstabilisante de la séquence riche en A+U située en région 3' NC. En absence de ce déterminant, la demi-vie du messenger est augmentée. Les mêmes séquences 5' et 3' NC contrôlent une dégradation sélective des ARNm du GM-CSF (Shaw et Kamen, 1986).

Il a été montré que l'épissage alternatif peut également contrôler la stabilité des ARNm. Deux transcrits alternativement épissés du PDGF β /c-sis contiennent une région 5' NC plus ou moins longue. Les transcrits courts, traduits efficacement, sont plus rapidement dégradés que les transcrits longs, plus faiblement traduits (Fen et Daniel, 1991). On notera dans notre étude que les cellules normales expriment intensément les transcrits longs (1A, 1B) alors que les cellules cancéreuses MDA-MB-231 expriment davantage les transcrits courts 1D. Ceci pourrait donc expliquer le fait que le taux de traduction soit plus important dans les MDA-MB-231 par rapport aux CEMN.

Les régions 5' NC peuvent contrôler la traduction en contrôlant son initiation. Ainsi, Rao et collaborateurs (1988) ont montré que les 125 bases les plus en aval de la région 5' NC du PDGF-2/c-sis diminuaient, d'un facteur 40, l'efficacité de traduction du facteur de croissance. Cette atténuation de la traduction due aux structures secondaires a aussi été démontrée pour le TGF β 1. Par ailleurs, les séquences non codantes peuvent être impliquées dans la compartimentation des ARNm (Gottlieb, 1992) et même induire une suppression de tumeur dans des cellules spécialisées (Rastinejad *et al.*, 1993). L'expression du transcrit 1A spécifiquement dans les cellules normales pourrait donc jouer un rôle dans le maintien d'une prolifération normale de ces cellules. L'absence totale de ce transcrit dans les cellules transformées et cancéreuses, caractérisées par une croissance

illimitée, ajoute à la crédibilité de cette hypothèse. De plus, il a été montré récemment que la traduction des ARNm de l'IGF-II, qui diffèrent uniquement dans leur région 5' NC, est contrôlée par la prolifération cellulaire (Nielsen *et al.*, 1995). Ainsi, le transcrit de 4,8 kb (mineur) est engagé dans la synthèse du précurseur de l'IGF-II alors que le transcrit de 6,0 kb (majeur et ne semble pas être traduit) est sélectivement mobilisé et traduit dans les cellules en phase exponentielle de croissance. Il est possible que la région 5' NC des ARNm du FGF1 contribue à une ou à plusieurs de ces propriétés. L'expression différentielle des 4 types de transcrits FGF1 dans les cellules normales et les cellules cancéreuses de sein pourrait donc jouer un rôle clé dans le contrôle de la synthèse et de l'activité biologique du FGF1.

Le facteur de croissance FGF2 est produit davantage dans les cellules épithéliales mammaires normales que dans les cellules transformées ou cancéreuses. La technique PCR confirme ce résultat au niveau transcriptionnel: l'ARNm du FGF2 est plus abondant dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses et n'a pu être détecté dans la lignée MCF-7. Ces résultats sont en accord avec ceux montrant que le niveau des transcrits FGF2 est plus élevé dans les tissus mammaires humains normaux, néoplasiques bénins ou hyperplasiques que dans les tissus tumoraux de sein (Luqmani *et al.*, 1992 ; Anandappa *et al.*, 1994 ; Smith *et al.*, 1994 ; Penauld-Llorca *et al.*, 1995). Nous pouvons déduire des résultats obtenus que la production de FGF2 n'est pas liée directement à la tumorigenèse. Néanmoins, d'après notre étude sur la lignée MDA-MB-231 (El Yazidi et Boilly-Marer, 1995), le FGF2 est impliqué dans la stimulation de la prolifération de ces cellules selon une boucle autocrine externe. Cette autostimulation des cellules MDA-MB-231 pourrait donc expliquer leur croissance importante dans le milieu dépourvu de sérum et leur indépendance vis-à-vis du FGF exogène (Peyrat *et al.*, 1991). Si le FGF2 n'est pas directement lié à la tumorigenèse, ce facteur de croissance est néanmoins impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales mammaires.

Une autre protéine de 18 kDa affine pour l'héparine, HB-GAM/PTN ("heparin-binding growth associated molecule/pleiotrophin"), est sécrétée par les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Wellstein *et al.*, 1992). Une lignée cellulaire de carcinome rénal transfectée par l'ADNc de cette molécule devient

tumorigène dans la souris nude et sa prolifération devient indépendante de l'ancrage (Fang *et al.*, 1992). De plus, 62% des tumeurs mammaires, analysées dans cette étude, expriment de hauts niveaux d'ARNm de HB-GAM. Cette molécule pourrait donc stimuler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires de manière autocrine. Le rôle direct de HB-GAM dans la stimulation de la croissance tumorale a été démontré sur une lignée cellulaire de mélanome humain. Czubyko et collaborateurs (1994b) ont en effet montré que l'inhibition de la production de HB-GAM, dans les cellules transfectées par un ribozyme dirigé contre le messager de cette molécule, empêche la formation de colonies par ces cellules et leur croissance tumorale dans la souris.

Notre étude nous a également permis de montrer qu'il n'existe pas de corrélation entre l'expression du FGF1 et celle du FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires. En effet, les cellules normales (CEMN) et les HBL-100 expriment de hauts niveaux de FGF1 et peu de FGF2. Anandappa et collaborateurs (1994) ont constaté cette absence de relation entre l'expression de ces deux facteurs de croissance dans les tissus mammaires normaux et cancéreux.

Par ailleurs, si l'expression du FGF2 semble plutôt corrélée au statut normal des cellules, l'expression des transcrits FGF1 est aussi importante dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 et beaucoup plus faible dans les cellules cancéreuses MCF-7. Il semble donc ne pas exister de corrélation entre l'expression du FGF1 et l'état tumoral. Cependant, des résultats contradictoires ont été publiés. Smith et collaborateurs (1994) montrent que le FGF1 est plus exprimé dans les tissus tumoraux que dans les cancers bénins ou tissus normaux. Anandappa et collaborateurs (1994) montrent le contraire. Sur la base de l'expression globale du FGF1, nous ne pouvons conclure clairement sur une corrélation entre l'expression du FGF1 et le phénotype cellulaire (normal ou tumoral). La réponse pourrait résider dans la production différentielle des messagers FGF1 (1A, 1B, 1C et 1D) et dans le contrôle de la traduction du facteur par ces différents transcrits. L'épissage alternatif génère une diversité dans la région 5' NC susceptible de réguler la production protéique en contrôlant l'initiation et le taux de la traduction. Il a été montré, pour certains gènes, que ce mécanisme en contrôlant l'activité biologique de facteurs de croissance, intervient dans la

signalisation cellulaire. Le taux de traduction du FGF1 dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 est augmenté comparativement aux cellules normales. Cette répression de la synthèse de FGF1 dans les cellules normales pourrait être due à l'expression différentielle des transcrits FGF1 précédemment discutée. Les MCF-7, cellules cancéreuses et invasives, produisent cependant moins de facteur FGF1 que les cellules normales ; il ne peut donc être établi de corrélation entre la production de FGF1 et le statut tumoral des cellules.

Une différence dans la réceptivité des cellules vis-à-vis de ce facteur de croissance et dans son activité biologique pourrait également faciliter la compréhension du rôle du FGF dans la tumorigenèse mammaire. Une étude récente portant sur l'expression des 4 gènes connus spécifiant les récepteurs au FGF montre que les récepteurs FGF R1, R2 et R4 sont exprimés à différents niveaux dans les 103 carcinomes du sein étudiés (Penault-Llorca *et al.*, 1995). Le tissu normal exprime le FGF R1 (Jacquemier *et al.*, 1994). Sur les 103 carcinomes, le FGF R1 est amplifié dans 22% des cas ; ce résultat est conforme à ceux rapportés par d'autres équipes (Theillet *et al.*, 1993 ; Jacquemier *et al.*, 1994). Le FGF R2 est surexprimé dans seulement 4% des cas étudiés et le FGF R4 dans 32% des cas. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus par McLeskey et collaborateurs (1994) sur les lignées cellulaires de tumeur de sein et sur les tumeurs elles-mêmes (Luqmani *et al.*, 1992). L'étude des isoformes du FGF R1, générées par l'épissage alternatif du messager, montre que l'isoforme à deux boucles immunoglobuliniques (2-Ig) est la seule majoritairement exprimée dans les tumeurs mammaires (Luqmani *et al.*, 1992 ; Coombes *et al.*, 1994 ; Penault-Llorca *et al.*, 1995). L'isoforme à 3-Ig est mise en évidence dans seulement 14% des tumeurs (Penault-Llorca *et al.*, 1995). L'affinité des différentes isoformes de récepteurs FGF pour le ligand diffère en fonction de l'exon concerné (Yan *et al.*, 1993 ; Itoh *et al.*, 1994 ; Yamaguchi *et al.*, 1994). Les altérations structurales du récepteur au FGF et/ou l'expression différentielle de ses isoformes pourraient jouer un rôle important dans la tumorigenèse mammaire. L'épissage alternatif et l'activation des gènes FGF et FGF R dans les cellules épithéliales de carcinomes de la prostate sont impliqués dans l'indépendance de ces cellules vis-à-vis du stroma et dans leur malignité.

La tumorigenèse étant un processus multifactoriel, la compréhension du rôle exact du FGF dans le cancer du sein nécessite davantage d'informations. Pour comprendre le rôle de la production du FGF dans ce type de cancer et d'après les résultats obtenus dans notre étude, il serait important d'examiner l'expression des 3 transcrits FGF-1, A/B, 1.A/E et 1.A/F, et d'étudier le rôle biologique de l'épissage alternatif du messenger FGF1.

Chapitre II

REGULATION DU FGF1 ET DU FGF2 PAR LE SERUM

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis à publication dans *Biochem. Biophys. Res. Commun* sous le titre "Differential regulation by serum of the different FGF mRNA expression in mammary epithelial cells ". Renaud F., El Yazidi I., Boilly-Marer Y., Courtois Y., Laurent M.

I. INTRODUCTION

De nombreux travaux ont contribué à montrer que la production de facteurs de croissance régule la prolifération et/ou la différenciation des cellules productrices elles-mêmes (action autocrine) ou de cellules voisines (action paracrine). Par conséquent, l'altération de cette production ou de la réponse à ces facteurs de croissance pourrait constituer des événements importants à l'origine de pathologies multiples. L'élucidation des mécanismes qui régulent la synthèse des facteurs de croissance serait cruciale pour le développement de stratégies nouvelles pour le traitement de certaines maladies. Dans le cas du cancer, la croissance d'une tumeur solide suppose une prolifération cellulaire active et une néovascularisation tumorale importante. Pour leur activité mitogène et angiogène, les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 ont été parmi les premiers candidats suspectés comme ayant un rôle dans la tumorigenèse. Ce rôle fut largement démontré pour diverses tumeurs (voir chapitre sur les rôles biologiques des FGF). Dans ce contexte, il devient important de comprendre la régulation de l'expression génique des facteurs de croissance FGF1 et FGF2. Sous quelles conditions physiologiques les promoteurs de ces deux gènes sont-ils activés? C'est à cette question que ce chapitre tente de répondre dans le cas particulier du cancer du sein.

Le sérum est un milieu biologique complexe qui contient en particulier des facteurs de croissance et des hormones. Il a été montré que le sérum induit une augmentation de la quantité d'ARNm du FGF2 dans les fibroblastes en culture (Sternfeld *et al.*, 1988). En milieu dépourvu de sérum, le traitement de fibroblastes en croissance rapide par du sérum de veau fœtal induit une augmentation significative des transcrits FGF2 dès 2 heures de traitement (Cook *et al.*, 1990). Le messenger FGF1 est plus modestement induit dans ces conditions. Dans cette même

étude, la stimulation par le sérum de kératinocytes en prolifération n'a aucun effet sur les faibles niveaux de messagers FGF1 et FGF2 exprimés dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que des facteurs contenus dans le sérum peuvent induire l'expression de facteurs de croissance. Cette expression et sa régulation varient différemment dans des types cellulaires intimement associés *in vivo*. Les événements observés *in vitro* pourraient être le reflet de l'expression de ces gènes (FGF1 et FGF2) et de la réponse de différents types cellulaires aux facteurs de croissance libérés lors d'une blessure ou d'une tumeur *in vivo*.

Le FGF1 et le FGF2 sont deux facteurs angiogènes puissants (Folkman et Klagsbrun, 1987) dont la production par les cellules musculaires lisses de veine est fortement stimulée dans des conditions de culture hautement favorables (présence de sérum ou de facteurs de croissance) (Cook *et al.*, 1990 ; Winkles et Gay, 1991 ; Chotani *et al.*, 1995). Ces observations *in vitro* pourraient être le reflet d'une situation *in vivo* où la production de facteurs de croissance est augmentée et où des actions autocrines et/ou paracrines complexes contrôlent l'expression de gènes. Nous nous sommes posés la question de savoir si la tumeur mammaire ne correspondrait pas à cette situation où la surproduction de facteurs de croissance divers favoriserait l'expression des FGF1 et 2. La surproduction par la tumeur de facteurs mitogènes et angiogènes pourrait être activée *in vitro* par une stimulation par le sérum de veau fœtal. L'étude comparative de la régulation par le sérum de l'expression des gènes FGF1 et FGF2 entre les cellules épithéliales mammaires normales et les cellules cancéreuses pourrait être un élément de réponse clé pour la compréhension du rôle de ces facteurs dans le cancer du sein. Plus encore, cette comparaison pourrait nous permettre d'analyser des différences éventuelles dans le type de promoteur du gène FGF1 mis en jeu dans les conditions très favorables à la croissance. Pour cela, nous avons incubé les cellules épithéliales mammaires normales, les cellules transformées HBL-100 et les lignées cancéreuses en présence de 10% de sérum de veau fœtal après un sevrage de 24 heures. Pour chaque type cellulaire, le témoin consiste à maintenir les cellules dans du milieu dépourvu de sérum.

II. RESULTATS

A. Les protéines

La production des polypeptides FGF1 et FGF2 en présence ou non de 10% de sérum de veau foetal est analysée par dosage EIA. Nous constatons d'après la figure 19 qu'en présence de sérum la production de FGF1 dans les cellules normales (CEMN) et dans la lignée cancéreuse MCF-7 est diminuée de moitié par rapport à la quantité présente en absence de sérum. A l'inverse, la lignée transformée HBL-100 et la lignée cancéreuse MDA-MB-231 montrent une stimulation de la synthèse de ce facteur de croissance en présence de sérum (doublement et augmentation d'un tiers respectivement). Dans les deux cas, absence ou présence de sérum, la lignée cancéreuse la plus invasive MDA-MB-231 produit une quantité de FGF1 plus importante que les autres cellules. Cette production pourrait rendre compte de son caractère hautement prolifératif.

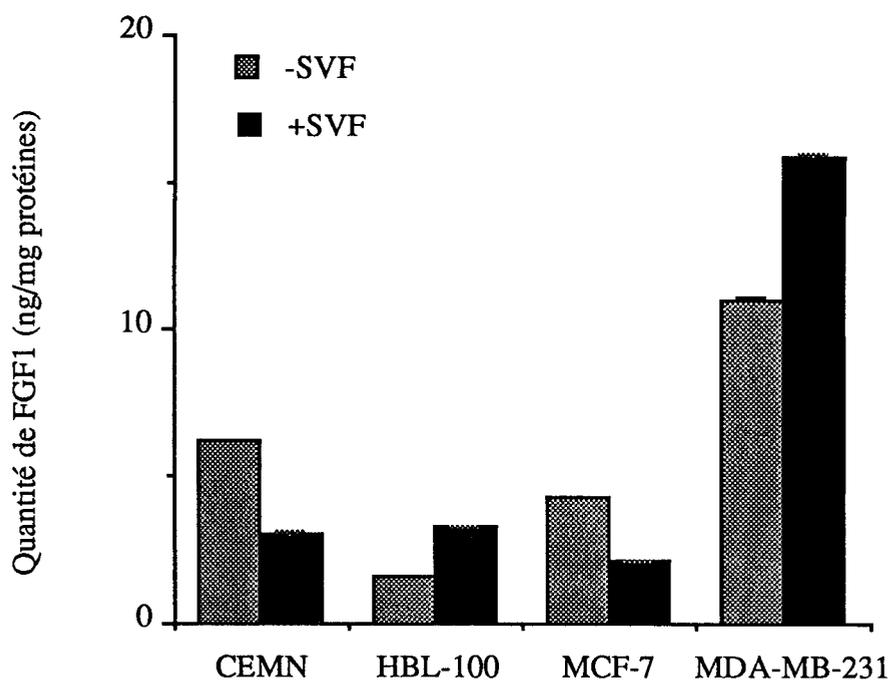


Figure 19. Etude de la régulation du FGF1 par le sérum dans les cellules épithéliales mammaires. Quantification par EIA.

Les cellules sont incubées en présence de 10% de sérum de veau foetal (SVF) ou sans (sevrage: sev.).

La comparaison de la régulation du FGF1 par le sérum permet de constater qu'en présence de sérum les cellules normales sont induites à diminuer la synthèse

de FGF1 alors que la lignée cancéreuse hautement métastatique MDA-MB-231 et la lignée transformée HBL-100 sont induites dans le sens d'une stimulation de cette synthèse. Nous sommes tentés, d'après ces résultats, de suggérer qu'en conditions physiologiques favorables à la prolifération cellulaire (présence de sérum), les cellules normales maintiennent l'homéostasie tissulaire en diminuant la production de facteurs mitogènes (dont le FGF1). A l'opposé, dans ces mêmes conditions les cellules transformées ou cancéreuses seraient induites à stimuler leur propre prolifération par une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance (autocrinie). L'analyse du résultat obtenu sur la lignée cancéreuse MCF-7 rendait impossible l'établissement d'une corrélation entre une surproduction de FGF1 et la tumorigenèse. A notre surprise, dans cette lignée cancéreuse, la présence de sérum régule négativement la synthèse de FGF1. Ce comportement, semblable à celui des cellules normales, nous permet de conclure que la régulation du facteur FGF1 par le sérum est cellule-spécifique et ne dépend pas uniquement du statut normal ou tumoral des cellules. Néanmoins, il est important de rappeler que la lignée cancéreuse MCF-7 est peu invasive et qu'elle produit peu de FGF1 comparativement à la lignée très invasive MDA-MB-231.

Les résultats de quantification EIA de la protéine FGF2 lors de ce test sont en moyenne de l'ordre de 0,2 ng de FGF2/mg de protéines. Ces quantités sont trop faibles pour être considérées comme significatives dans ce test de régulation par le sérum.

B. Les transcrits

La régulation par le sérum du taux de transcription du gène FGF1, dans les cellules épithéliales mammaires humaines normales, transformées ou cancéreuses, est analysée par RT-PCR parallèlement et dans les mêmes conditions que pour l'analyse de la régulation de la synthèse du FGF1. Après un sevrage de 24 h, les cellules sont incubées 24 h en présence ou non de 10% de sérum de veau fœtal. L'étude de ces régulations est réalisée pendant la phase exponentielle de l'amplification PCR (30 cycles) afin de pouvoir comparer les niveaux de transcrits dans les deux conditions du test. La constance de l'efficacité d'amplification PCR est contrôlée par la co-amplification d'un témoin externe: la nitrate réductase. Le taux d'ARNm du FGF1 est modulé par le sérum dans les cellules normales (CEMN), les

HBL-100 et les MDA-MB-231 (Fig. 20A). Le sérum induit une diminution du niveau des transcrits FGF1 dans les cellules normales CEMN et les cellules transformées HBL-100 (Fig. 20A, lignes 1, 3). Les cellules MDA-MB-231 montrent, quant à elles, une augmentation du taux d'ARNm du FGF1 après traitement par le sérum (Fig. 20A, ligne 5). Les taux d'ARNm du FGF1 en conditions de sevrage pour les CEMN, les HBL-100 et les MDA-MB-231 figurent sur les lignes 2, 4 et 6 de la figure 20A respectivement. Quarante cycles d'amplification PCR ont été nécessaires pour la détection des transcrits FGF1 dans les lignées cancéreuses MCF-7 et BT-20 et ce dans les 2 conditions du test (Fig. 20B). Le sérum induit une légère diminution du taux des messagers FGF1 dans la lignée MCF-7 (Fig. 20B, ligne 9). Aucune variation du taux de transcrits FGF1 n'est observée dans la lignée BT-20 après traitement au sérum (Fig. 20B, ligne 7). Les niveaux de messagers FGF1 en absence de sérum sont présentés dans la figure 20B, ligne 8 pour les BT-20 et ligne 10 pour les MCF-7. Cependant, les niveaux de messagers FGF1 dans ces 2 lignées sont trop faibles pour pouvoir affirmer que la modulation observée dans la lignée MCF-7 est significative. Les résultats RT-PCR obtenus dans l'étude de la régulation des transcrits FGF1 par le sérum confirment ceux enregistrés après dosage EIA de la protéine correspondante pour les CEMN et les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7. Par contre, la modulation négative du transcrit FGF1 dans la lignée HBL-100 va à l'encontre de la régulation positive de la protéine correspondante.

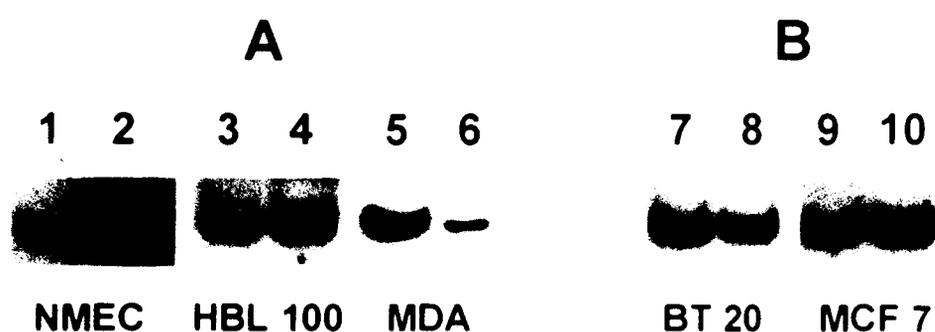


Figure 20. Analyse par RT-PCR de la régulation des transcrits FGF1 par le sérum.

A. Régulations observées à 30 cycles d'amplification PCR; les lignes 2, 4 et 6 représentent les expressions des transcrits FGF1 en absence de sérum de veau foetal. les lignes 1, 3 et 5 montrent les expressions des ARNm FGF1 en présence de 10% de sérum. **B.** L'expression du FGF1 dans les deux conditions de culture est détectée à 40 cycles dans les cellules BT-20 et MCF-7.

A 35 cycles d'amplification PCR, les cellules normales et les HBL-100 ne montrent pas de modification du taux des transcrits FGF2 après addition de sérum (Fig. 21, lignes 2 et 4 respectivement). Les taux de transcrits FGF2 en absence de sérum sont portés dans les lignes 1 et 3 de la figure 21. Les taux d'ARNm FGF2 dans les lignées MDA-MB-231, MCF-7 et BT-20 sont trop faibles (voire indétectables) et ne permettent pas d'analyser leur modulation par le sérum.

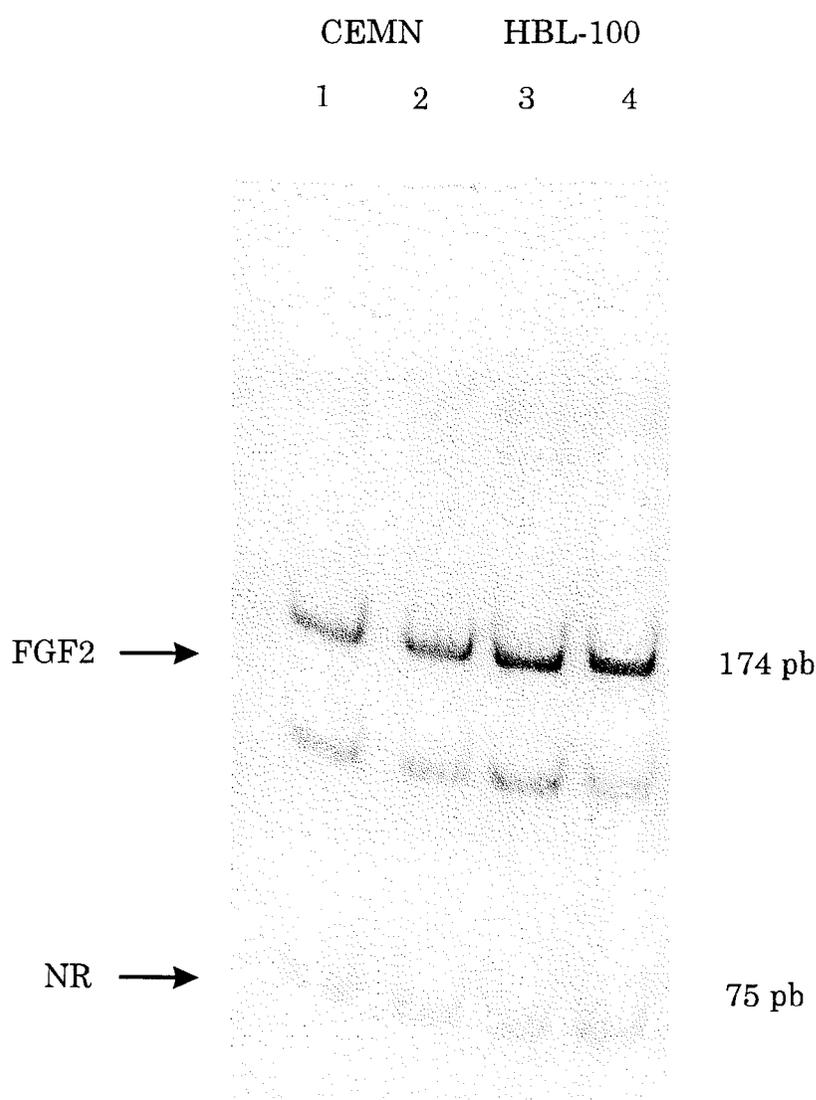


Figure 21. Analyse par RT-PCR de la régulation par le sérum des transcrits FGF2 dans les cellules mammaires normales (CEMN) et immortalisées (HBL-100).

Les lignes 1 et 3 représentent la culture en absence de sérum; les lignes 2 et 4 correspondent à la culture en présence de 10% de sérum de veau foetal.

Suite aux résultats obtenus (chapitre I) montrant l'expression différentielle des 4 transcrits contenant l'un des exons non codants (-1A, -1B, -1C ou -1D), nous étions tentés d'analyser la régulation par le sérum des 4 types de transcrits FGF1. Cette étude pouvait nous indiquer le ou les transcrits impliqués dans cette régulation et donc nous permettre de découvrir le promoteur du gène FGF1 sensible au sérum dans les différents types cellulaires. L'addition de sérum au milieu de culture des cellules normales induit la disparition des transcrits 1A, une diminution importante des transcrits 1B mais une augmentation des transcrits 1C et 1D (Fig. 18, ligne 1, CEMN, voir chapitre I). La comparaison des signaux des lignes 1 et 2 de la figure 18 permet de conclure que la diminution du taux de l'ensemble des transcrits FGF1 (COD) en présence de sérum est due, du moins en partie, à la diminution des transcrits 1A et 1B ; le transcrit 1B n'est encore que faiblement présent. En absence de sérum la lignée transformée HBL-100 exprime uniquement les transcrits 1C et 1D (Fig. 18, ligne 4). Le sérum module négativement le transcrit 1C alors que le transcrit 1D est légèrement augmenté (Fig. 18, ligne 3). Dans la lignée transformée HBL-100, la diminution du taux de l'ensemble des transcrits FGF1 (COD) est due, du moins en partie, à la disparition des transcrits 1C. En présence de sérum, les transcrits FGF1 (COD) présents dans les cellules HBL-100 seraient représentés par le type 1D. En absence de sérum, la lignée MDA-MB-231 exprime les transcrits 1B et 1D (Fig. 18, ligne 6). L'addition de sérum à une culture en sevrage des cellules MDA-MB-231 induit la disparition des messagers 1B mais une augmentation des transcrits 1C et 1D (Fig. 18, ligne 5). L'augmentation de tous les messagers FGF1 (COD) en présence de sérum serait due, du moins en partie, à l'apparition du type 1C et à l'augmentation du type 1D.

L'étude de la régulation par le sérum des 4 types de transcrits FGF1 a été également réalisée sur les lignées MCF-7 et BT-20 mais seul le transcrit 1D a été détecté à un très faible niveau (résultat non montré). Les taux d'expression des messagers FGF1 dans ces 2 lignées cellulaires sont très faibles. On ne peut cependant pas affirmer que les autres transcrits (1A, 1B et 1C) ne sont pas détectés parce qu'ils ne sont pas exprimés ; la méthode n'est peut-être pas assez sensible.

La comparaison de la régulation par le sérum de chaque type de messagers FGF1 entre les différentes lignées cellulaires (Fig. 18) met en évidence des

régulations différentielles. Seul le transcrit 1D est modulé dans le même sens (positif) dans toutes les cellules mammaires: normales, transformées et cancéreuses. Les transcrits 1B et 1C sont régulés dans le même sens dans les cellules normales et la lignée cancéreuse MDA-MB-231. Dans la lignée transformée HBL-100, le transcrit 1C montre une modulation inverse par rapport à celle observée dans les CEMN et les MDA-MB-231. Ces résultats mettent en évidence des régulations complexes dépendant du type de messenger FGF1 et du type cellulaire. Dans chaque type cellulaire, le sérum induit des régulations différentielles des 4 types de transcrits 1A, 1B, 1C et 1D.

III. DISCUSSION, CONCLUSIONS

Pour l'ensemble des cellules épithéliales mammaires étudiées (normales, transformées ou cancéreuses), le sérum n'induit aucune modulation de l'expression du gène FGF2. La quantité de la protéine correspondante étant relativement faible, aucune conclusion n'a pu être tirée quant à sa régulation par le sérum. Dans les cellules épithéliales mammaires humaines et indépendamment de l'état physiologique de la cellule (normale ou maligne), le gène FGF2 semble être insensible au sérum. Cependant, une régulation positive de ce gène par le sérum a été mise en évidence dans des fibroblastes de peau néonatale humaine (Cook *et al.*, 1990) et dans des cellules musculaires de vaisseaux sanguins humains (Winkles et Gay, 1991 ; Chotani *et al.*, 1995). L'activation du promoteur du gène FGF2 par le sérum semble dépendre du type cellulaire.

Les résultats RT-PCR obtenus dans l'étude de la régulation des messagers FGF1 par le sérum corroborent les résultats du dosage EIA de la protéine pour tous les types cellulaires sauf dans le cas de la lignée HBL-100. Dans la lignée transformée HBL-100, le sérum induit une diminution du taux de l'ensemble des transcrits FGF1 alors que la protéine est augmentée. Ce paradoxe pourrait être levé si l'on suppose une augmentation du taux de traduction du messenger induit par le sérum et en l'occurrence le messenger 1D. Cette traduction serait accrue par augmentation du taux de transcription et/ou de la stabilité du messenger.

Des régulations par le sérum de l'expression du FGF1 ont été observées dans plusieurs types cellulaires. Le sérum induit une augmentation du messenger FGF1

dans les fibroblastes de peau néonatale humaine (Cook *et al.*, 1990) et les cellules musculaires lisses de vaisseaux humains (Winkles et Gay, 1991 ; Chotani *et al.*, 1995). Winkles et Gay (1991) montrent que l'incubation des cellules musculaires lisses quiescentes en présence de sérum de veau foetal induit une augmentation de la production d'ARNm et de protéines FGF1 et FGF2 dans ces cellules. Ces augmentations sont équivalentes à celles obtenues lors de l'incubation des cellules en présence de différentes combinaisons de facteurs de croissance tels que le TGF β 1, l'EGF, l'IGF-I et le PDGF. Ces résultats indiquent que les facteurs de croissance contenus dans le sérum peuvent coopérer pour l'induction de l'expression des gènes FGF1 et FGF2. Par ailleurs, le traitement par le sérum en présence de cycloheximide n'altère pas l'augmentation des messagers FGF observée en présence de sérum seul. Cette expérience prouve que cette augmentation ne requiert pas de synthèse protéique active. Par conséquent, les gènes FGF1 et FGF2 pourraient être inclus dans la famille des gènes précoces de la réponse immédiate au sérum. De plus, l'augmentation des transcrits consécutive à l'addition de sérum n'est pas due uniquement à une stabilisation de messagers existants mais plutôt à une synthèse de novo d'ARNm: le traitement simultanément par le sérum et l'actinomycine D empêche l'augmentation du taux de transcrits observée en présence de sérum seul. Le gène FGF1 contient une séquence ADN de type élément de réponse au sérum (tableau XIII, chapitre 3) qui pourrait être la cible et l'activateur des promoteurs FGF1.

Pour le même type cellulaire, épithéliale mammaire humaine, nous avons caractérisé différentes régulations par le sérum de l'expression du gène FGF1. Alors qu'aucune modulation ne survient dans la lignée cancéreuse BT-20, une régulation positive est observée dans la lignée cancéreuse très invasive MDA-MB-231 et une régulation négative est observée dans les cellules normales, transformées ou cancéreuses MCF-7. Ces résultats montrent qu'il n'existe pas de corrélation directe entre l'influence du sérum sur l'expression du FGF1 et le caractère normal ou tumorigène des cellules. La modulation par le sérum du gène FGF1 semble être un phénomène complexe, mais il est peut-être important de noter que seule la lignée cancéreuse tumorigène très invasive MDA-MB-231 répond au sérum par une activation du gène FGF1. Il serait intéressant d'élargir ces études à d'autres lignées cancéreuses plus ou moins tumorigènes. Cela pourrait nous

permettre d'analyser une relation éventuelle entre la transformation cellulaire et la modification d'éléments régulateurs impliqués dans la régulation normale du gène FGF1. L'étude d'un large spectre de cellules obtenues par transformation ou cancérisation pourrait en plus constituer un support très approprié pour la caractérisation des éléments régulateurs.

Les résultats obtenus sur la régulation des différents transcrits FGF1 (1A, 1B, 1C et 1D) mettent en évidence des modulations fines et complexes du gène FGF1 par le sérum. En condition défavorable à la croissance (absence de sérum), les cellules épithéliales mammaires utilisent des promoteurs différents: les cellules normales utilisent préférentiellement les promoteurs 1A et 1B, les cellules transformées HBL-100 utilisent les promoteurs 1C et 1D et la lignée cancéreuse MDA-MB-231 utilise les promoteurs 1B et 1D. Nous sommes dès lors tentés d'admettre que l'usage alternatif des promoteurs du gène FGF1 dépend de l'état physiologique de la cellule (normale ou transformée). Le traitement par le sérum modifie l'usage alternatif des promoteurs du gène FGF1 pour toutes les cellules considérées. En condition favorable à la croissance (présence de sérum), les cellules normales utilisent les promoteurs 1B, 1C et 1D, les cellules transformées HBL-100 et les cellules cancéreuses MDA-MB-231 font quant à elles usage du promoteur 1D uniquement. Le promoteur 1D est particulièrement utilisé après traitement par le sérum de cellules épithéliales mammaires préalablement sevrées. Ce phénomène d'utilisation alternative de promoteurs FGF1 sous l'influence de sérum a été observé pour les cellules musculaires lisses de veines saphènes humaines (Chotani *et al.*, 1995). Les cellules musculaires lisses en croissance normale utilisent le promoteur 1D. Après sevrage, le traitement de ces cellules par le sérum induit l'activation du promoteur 1C. La comparaison du comportement des cellules musculaires lisses normales avec celui des cellules épithéliales mammaires normales semble indiquer que la régulation alternative des promoteurs du gène FGF1 par le sérum dépend du type cellulaire. Ceci n'est pas surprenant puisque l'épissage alternatif du transcrit FGF1 génère différents transcrits répartis de façon tissu- et cellule-spécifique (Philippe *et al.*, 1992 ; Myers *et al.*, 1993 ; Payson *et al.*, 1993).

Après addition de sérum, le taux de la protéine FGF1 est diminué dans les cellules épithéliales mammaires normales et augmenté dans les cellules transformées HBL-100 et cancéreuses MDA-MB-231. Ce contrôle différentiel de la traduction pourrait être dû, du moins en partie, à l'expression différentielle observée pour les 4 transcrits 1A, 1B, 1C et 1D du FGF1. En effet, les régions 5' non codantes sont impliquées dans le contrôle de la traduction en jouant un rôle dans la stabilité des messagers et dans l'initiation et l'efficacité de la traduction (Shaw et Kamen, 1986 ; Rao *et al.*, 1988 ; Roy *et al.*, 1992). Les séquences 5' non codantes partagent quelques caractéristiques communes telles que la haute teneur en G+C, de multiples codons ATG et des séquences capables de former des structures de boucle en épingle à cheveux. Il est à noter que l'exon -1A contient plusieurs codons ATG en amont de la région codante et des séquences capables de former ces structures de boucle en épingle à cheveux à deux endroits différents (Myers *et al.*, 1993). L'exon non codant -1B ne contient pas de codon ATG mais contient des structures pouvant former des boucles à deux endroits également, l'exon -1C contient un site d'initiation unique alors que l'exon -1D en contient plusieurs. Or il a été montré que la progression du ribosome lors du processus de la traduction peut être inhibée par des structures secondaires fortes de l'ARNm (Rao *et al.*, 1988). De même, l'existence de un ou plusieurs codons AUG en amont du codon d'initiation de la protéine codée par le transcrit diminue l'efficacité de la traduction. Plusieurs gènes régulent l'efficacité de traduction de leurs transcrits de cette façon, c'est le cas, par exemple, du facteur de croissance TGF β 3 (Arrick *et al.*, 1991). Les cellules épithéliales mammaires étudiées montrent des expressions et des régulations différentielles des transcrits FGF1 ainsi que des différences dans le contrôle de la traduction du FGF1. Du fait que ces différences puissent être liées à l'usage alternatif d'exons non codants, les cellules épithéliales mammaires humaines normales, transformées et cancéreuses pourraient constituer un système très intéressant pour l'étude des régulations du gène FGF1 et des éléments régulateurs cis et trans impliqués.

Le FGF1 est mitogène pour les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses de vaisseaux sanguins (Castellot *et al.*, 1989), elles-mêmes capables de produire ce facteur (Winkles *et al.*, 1987 ; Mansoon *et al.*, 1990 ;

Weich *et al.*, 1990). La régulation précise de l'expression génique du FGF1 serait donc un élément critique dans le contrôle de la croissance des cellules vasculaires. La néovascularisation requiert la prolifération des cellules endothéliales indispensable à la formation des capillaires. La dérégulation de l'expression du gène FGF1 et/ou la surproduction du facteur par les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses des vaisseaux et les cellules épithéliales de la tumeur pourraient donc favoriser la néovascularisation péri-tumorale.

Les études sur la régulation de l'expression du gène FGF1 trouveraient toute leur importance dans la compréhension et le traitement de la néovascularisation dans des pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension et la tumeur solide.

Chapitre III

REGULATION DES FGF1 ET FGF2 PAR LES OESTROGENES

Une partie des résultats exposés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication soumise à publication dans *Experimental Cell Research*, "Production and estrogen regulation of FGF1 and FGF2 in normal and cancer breast cells" El Yazidi I., Renaud F., Courtois Y., Boilly-Marer Y.

I. INTRODUCTION

Le développement normal de la glande mammaire résulte de diverses interactions entre le parenchyme et le stroma adjacent. La prolifération des cellules épithéliales mammaires est sous le contrôle d'hormones stéroïdes et de facteurs de croissance (Imagawa *et al.*, 1994a). L'EGF (Ethier *et al.*, 1990), le TGF α (Bates *et al.*, 1990), le FGF1 (Imagawa *et al.*, 1994b), le FGF2 (Takahashi *et al.*, 1989) et l'IGF-I (Braunrucker et Stemberger, 1989) promeuvent la prolifération des cellules épithéliales mammaires. La glande mammaire est elle-même capable de produire des facteurs de croissance: l'EGF et/ou le TGF α (Zajckowski *et al.*, 1988 ; Bates *et al.*, 1990), l'IGF-I et ses protéines de liaison (Yee *et al.*, 1989 ; Forsyth, 1989) ainsi que le FGF2 (Flamm *et al.*, 1989 ; Gomm *et al.*, 1991). De plus, la composante épithéliale de cette glande sécrète un facteur de croissance autocrine qui lui est propre, connu sous le nom de MDGF-I ("Mammary Derived Growth Factor-I") (Bano *et al.*, 1985). La croissance du tissu mammaire normal est limitée par la sécrétion de facteurs inhibiteurs de prolifération tels que le TGF β (Valverius *et al.*, 1989) et des facteurs inhibiteurs propres à la glande mammaire: la mammastatine (Ervin *et al.*, 1989) et le MDGI ("Mammary Derived Growth Inhibitor") (Böhmer *et al.*, 1987). Le contrôle de la croissance de la glande mammaire est un phénomène complexe qui implique des interactions mutuelles entre facteurs de croissance, facteurs inhibiteurs de prolifération et hormones. *In vitro* la progestérone et la prolactine stimulent de façon directe la prolifération des cellules épithéliales mammaires alors que les œstrogènes ne sont pas de véritables agents mitogènes pour ces cellules (Edery *et al.*, 1984 ; Gabelman et Emerman, 1992). En réalité, les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement de la glande mammaire. Ces hormones stimulent la sécrétion de la prolactine et la production

des récepteurs à la progestérone (Edery *et al.*, 1984) ainsi que celle de l'EGF et de son récepteur (Vonderhaar, 1984) et du TGF α et de son récepteur (Kidwell, 1987 ; Monaham *et al.*, 1987). Les œstrogènes sont également capables d'augmenter la sensibilité du tissu épithélial au facteur de croissance MDGF-I. Les œstrogènes contribuent donc indirectement à l'accélération de la croissance des cellules épithéliales mammaires en culture via la progestérone, la prolactine et les facteurs de croissance.

La perte du contrôle de la croissance cellulaire est l'une des nombreuses caractéristiques des cellules cancéreuses. Dans les cellules épithéliales de cancer du sein les œstrogènes induisent une augmentation de l'EGF (Dickson *et al.*, 1986), du TGF α (Bates *et al.*, 1988) et de l'IGF-II (Osborne *et al.*, 1989). A l'inverse, le TGF β , facteur inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales, est régulé négativement par les œstrogènes (Knabbe *et al.*, 1987 ; Arrick *et al.*, 1991). Les récepteurs de ces facteurs de croissance sont également régulés par les œstrogènes: EGF R (Mukku et Stancel, 1985), IGF-I R (Stewart *et al.*, 1990), IGF-II R (Mathieu *et al.*, 1991). Ces résultats semblent indiquer qu'une part importante de la stimulation de la prolifération induite par les œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires est due à la sécrétion de nombreux facteurs de croissance (EGF, TGF α , IGFs). Il importait donc de définir le rôle des œstrogènes dans la régulation de la production de FGF. L'étude comparative de la régulation par les œstrogènes du FGF1 et du FGF2 entre les cellules épithéliales mammaires humaines normales et cancéreuses pourrait fournir des informations précieuses quant à la relation entre ces régulations et le statut normal ou cancéreux des cellules.

La lignée cancéreuse hormono-dépendante MCF-7 est sujette, en culture, à des dérives phénotypiques et génotypiques de sorte que différentes souches ont été obtenues dans plusieurs laboratoires. Avant de procéder à l'étude de la régulation des FGF par les œstrogènes dans cette lignée, nous nous sommes assurés de son hormono-dépendance en vérifiant l'existence des récepteurs aux œstrogènes et la stimulation de la prolifération par ces hormones. Les récepteurs œstrogéniques ont été mis en évidence dans les cellules MCF-7 privées de sérum pendant 24 h par la méthode immunocytochimique du kit de détection (Abott) selon les instructions du

fabricant. Les cellules MCF-7 maintenues 48 h en milieu dépourvu de sérum et de rouge de phénol, afin d'éliminer toute trace d'œstrogène exogène, sont ensuite incubées en présence de 10^{-8} M de 17β -œstradiol. La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. La figure 22 nous permet de constater que la prolifération des MCF-7 est nettement activée par les œstrogènes.

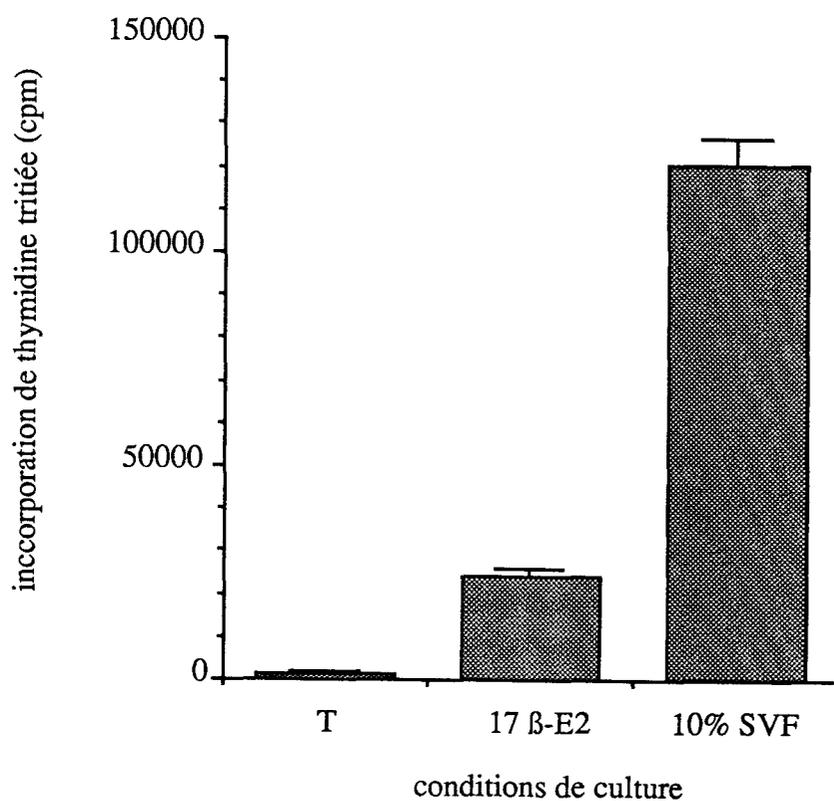


Figure 22. Test de prolifération de cellules MCF-7 en présence de 17β -œstradiol. Les cellules sont incubées ou non (T) de 10^{-8} M de 17β -œstradiol. La prolifération est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

II. RESULTATS

A. Les protéines

Les cellules épithéliales normales (CEMN) et la lignée cancéreuse MCF-7 sont hormono-dépendantes. La lignée cellulaire MDA-MB-231 et les cellules immortalisées HBL-100 sont quant à elles hormono-indépendantes. Dans le but d'analyser l'influence des œstrogènes sur les facteurs de croissance FGF1 et FGF2, les cellules mammaires sont préalablement incubées 48 h en milieu dépourvu de rouge de phénol et de sérum afin d'éliminer toute trace d'œstrogène dans les cellules. Les cellules sont ensuite incubées 24 h en présence de 10^{-8} M de 17β -œstradiol seul ou avec 10^{-6} M de Tamoxifène. Le témoin de l'expérience consiste en la culture des cellules sans œstradiol et sans Tamoxifène. Les quantités de FGF1 et FGF2 sont mesurées par dosage EIA dans les extraits cellulaires puis rapportées à la quantité de protéines totales. Dans l'ensemble des cellules mammaires considérées, la quantité de protéine FGF2 est trop faible et aucune variation significative n'a pu être mesurée.

Le 17β -œstradiol induit une augmentation significative (facteur 2) de la quantité de FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) et dans les cellules cancéreuses MCF-7 (Fig. 23, E2). Une augmentation légèrement supérieure (facteur 3) est observée dans la lignée immortalisée HBL-100. L'addition simultanée d'œstradiol et de Tamoxifène est sans effet sur le taux de FGF1 présent dans les cellules normales et les MCF-7 (Fig. 23, E2/Tam). La présence de Tamoxifène ne diminue que faiblement l'induction du FGF1 par l'œstradiol dans la lignée HBL-100.

Dans la lignée cancéreuse hormono-indépendante MDA-MB-231 considérée comme témoin de l'expérience, nous constatons avec surprise une augmentation importante du taux de FGF1 sous l'effet de l'œstradiol (Fig. 23). La valeur obtenue dans l'expérience témoin (absence d'œstradiol et de Tamoxifène) nous semble étonnamment faible par rapport à celle obtenue en milieu de sevrage avec rouge de phénol (11 ng FGF1/mg protéine). En effet pour les CEMN, les cellules HBL-100 et les MCF-7, les valeurs témoin du test au 17β -œstradiol sont relativement proches de celles obtenues en milieu de sevrage avec rouge de phénol (voir chapitre II).

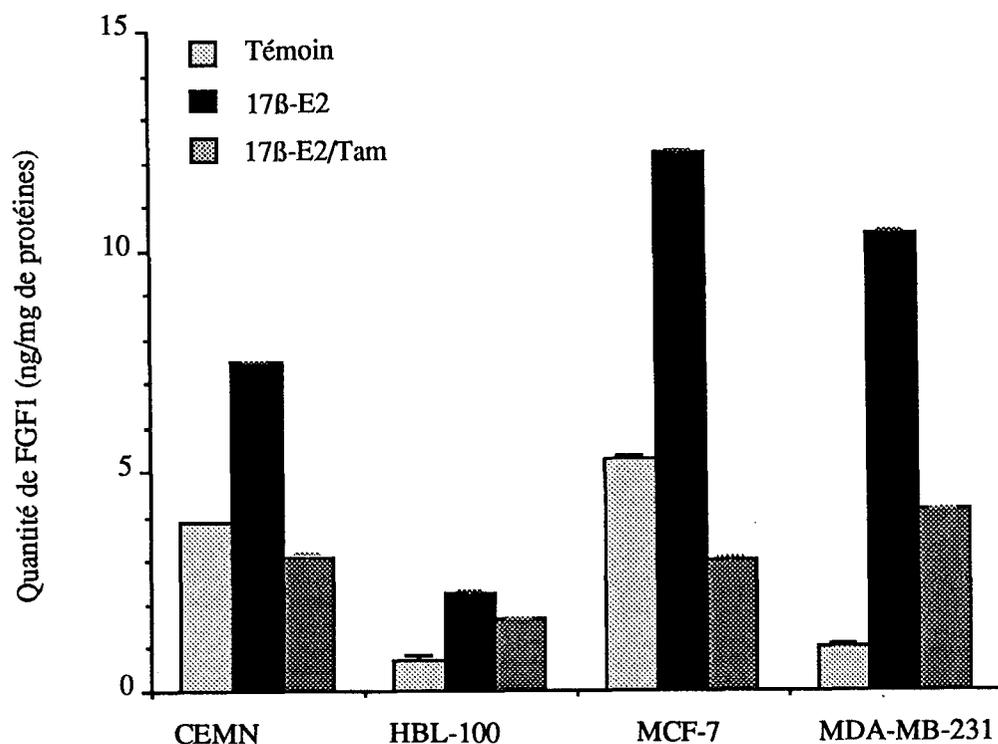


Figure 23. Etude de la régulation du FGF1 par le 17β-oestradiol dans les cellules épithéliales mammaires. Quantification par EIA.

Les cellules sont incubées en présence de 10^{-8} M de 17β-oestradiol seul (17β -E2) ou en présence de 17β-oestradiol et de tamoxifène (17β-E2/Tam). Dans l'expérience témoin, les cellules sont cultivées sans oestradiol ni tamoxifène (Témoin).

Des problèmes techniques relatifs au bon déroulement du dosage EIA (qualité du traceur) ont rendu impossibles de nouvelles mesures afin de vérifier le résultat obtenu. Nous avons alors procédé à la vérification de l'hormono-indépendance de la lignée MDA-MB-231. L'absence des récepteurs aux œstrogènes a été confirmée par la méthode immunocytochimique du kit (Abott). Le 17β-oestradiol (10^{-8} M) est sans effet sur la prolifération des cellules cancéreuses MDA-MB-231 (Fig. 24). La lignée MDA-MB-231 serait donc bien hormono-indépendante.

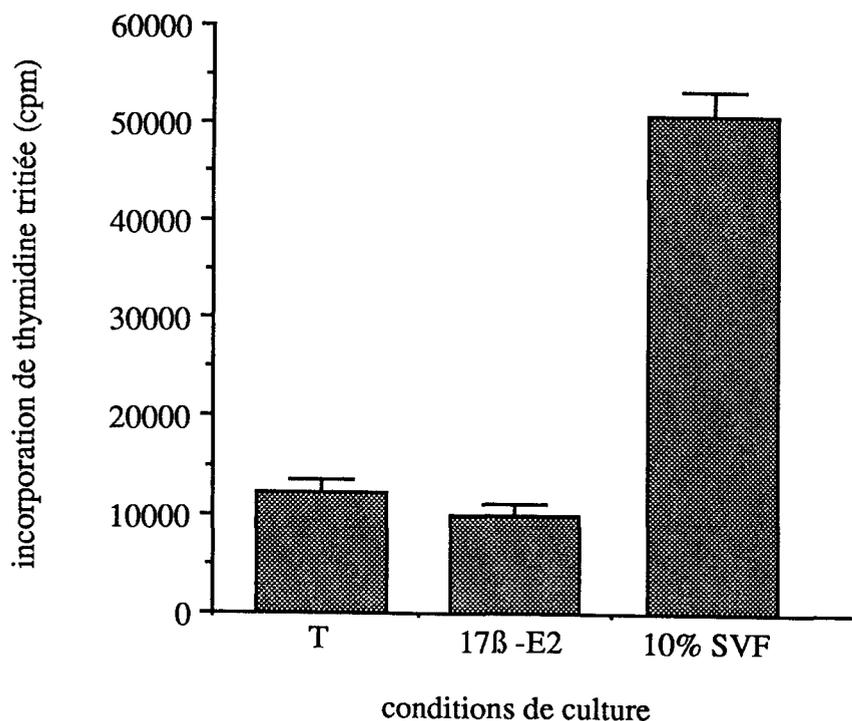


Figure 24. Test de prolifération de cellules MDA-MB-231 en présence de 17β-oestradiol.

Les cellules sont incubées ou non (T) en présence de 10^{-8} M de 17β-oestradiol (17β-E2). La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

B. Les transcrits

Un microgramme d'ARN totaux isolés des cellules mammaires normales, immortalisées ou cancéreuses (MCF-7 et MDA-MB-231) est soumis à la technique RT-PCR afin d'analyser la régulation par le 17β-œstradiol des transcrits FGF1 et FGF2. La régulation des transcrits FGF1 est analysée dans le détail de manière à étudier la régulation des 4 différents transcrits contenant l'un des exons non codants -1A, -1B, -1C ou -1D. La constance de l'efficacité de PCR est contrôlée grâce à la co-amplification de la nitrate réductase, ceci nous permet une mesure quantitative du taux de transcrits et la comparaison des résultats obtenus dans les conditions expérimentales (addition d'œstradiol: 17β-E2), le témoin (T) et la contre expérience (addition d'œstradiol et de Tamoxifène: E2/Tam) pour chaque type cellulaire.

En phase exponentielle de PCR (30 cycles), aucune modulation des transcrits FGF2 par l'œstradiol n'est observée dans les cellules épithéliales mammaires qu'elles soient normales, immortalisées (HBL-100) (Fig. 25). A trente cycles, les

qu'elles soient normales ou immortalisées (HBL-100) (Fig. 25). A trente cycles, les transcrits FGF2 ne sont pas amplifiés dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Fig. 25). A quarante cycles, le transcrit FGF2 est amplifié uniquement dans la lignée cancéreuse MDA-MB-231 mais ne montre aucune modulation par l'oestradiol.

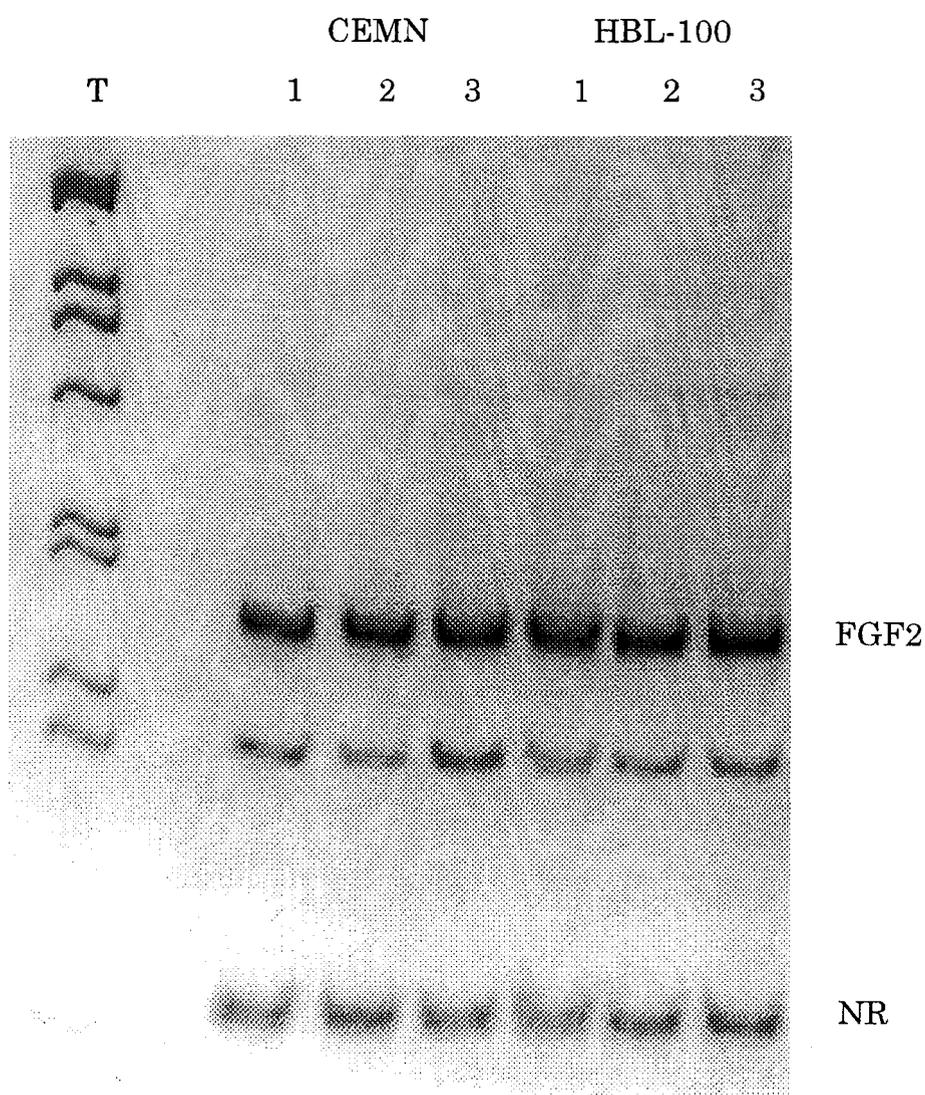


Figure 25. Analyse par RT-PCR de la Régulation par 17β -oestradiol des transcrits FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) et immortalisées HBL-100.

Les cellules sont incubées en présence de 10^{-8} M de 17β -oestradiol seul (lignes 2) ou en présence de 10^{-8} M de 17β -oestradiol et de 10^{-6} M de Tamoxifène (lignes 3). L'expérience témoin est représentée par les lignes 1.

En présence de 17β -œstradiol (10^{-8} M) nous observons, à trente cycles d'amplification PCR, une augmentation de l'ensemble des transcrits FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) hormono-dépendantes (Fig. 26A et 27, lignes 2). L'œstradiol n'a aucun effet sur le taux de transcrits FGF1 ni dans la lignée immortalisée hormono-dépendante HBL-100 (Fig. 26A) ni dans la lignée cancéreuse hormono-indépendante MDA-MB-231 (non montré). A quarante cycles d'amplification, le taux de transcrits FGF1 ne subit pas de variation sous l'influence d'œstradiol ni dans la lignée cancéreuse hormono-indépendante MDA-MB-231 (Fig. 26B, ligne 2), ni dans la lignée cancéreuse hormono-dépendante MCF-7 (Fig. 26B, ligne 2). Le traitement de l'ensemble des cellules épithéliales mammaires simultanément par le 17β -œstradiol et le Tamoxifène (10^{-6} M) n'induit pas de variation du taux des transcrits FGF1 (Fig. 26A, B et 27, lignes 3). L'augmentation des transcrits FGF1 observée dans les CEMN sous l'influence de l'œstradiol seul est inhibée lorsque du Tamoxifène est ajouté en même temps que l'hormone dans le milieu de culture (Fig. 26 et 27, lignes 3).

La régulation par l'œstradiol de chacun des transcrits FGF1, 1A, 1B, 1C et 1D est également analysée à 30 cycles d'amplification PCR. Dans les conditions expérimentales de l'étude de la régulation du FGF1 par l'œstradiol, le transcrit 1A n'est détecté dans aucun des types de cellules mammaires étudiés. Seule la lignée immortalisée HBL-100 exprime l'exon 1C mais aucune variation du taux de ce transcrit sous l'influence de l'œstradiol n'est observée (Fig. 28). Les CEMN et les MDA-MB-231 expriment très faiblement le transcrit 1C mais aucune variation n'est observée en présence d'œstradiol (non montré). Le transcrit 1D est exprimé uniquement dans les lignées HBL-100 et MDA-MB-231 ; mais l'œstradiol est sans effet sur son niveau d'expression dans ces lignées (Fig. 29). Dans les conditions expérimentales de ce test, seules les CEMN expriment le transcrit 1B, le taux de ce transcrit est diminué lorsque les cellules sont incubées en présence de 17β -œstradiol (Fig. 27, ligne 2). Cette régulation négative n'a plus lieu lorsque du Tamoxifène est ajouté en même temps que l'œstradiol au milieu de culture (Fig. 27, ligne 3).

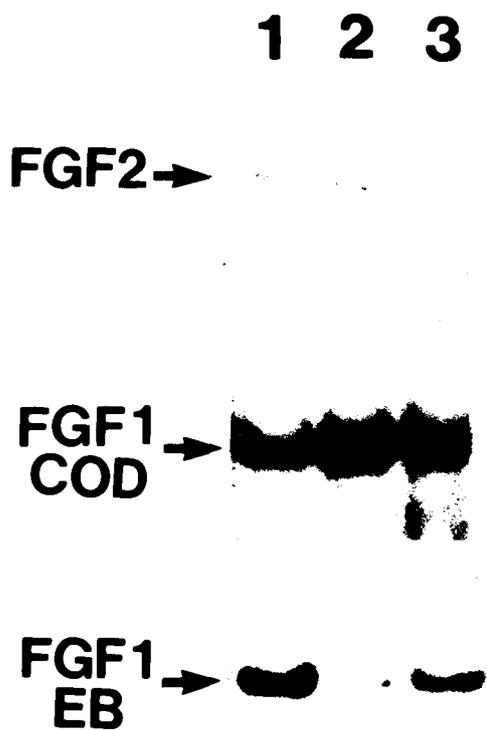
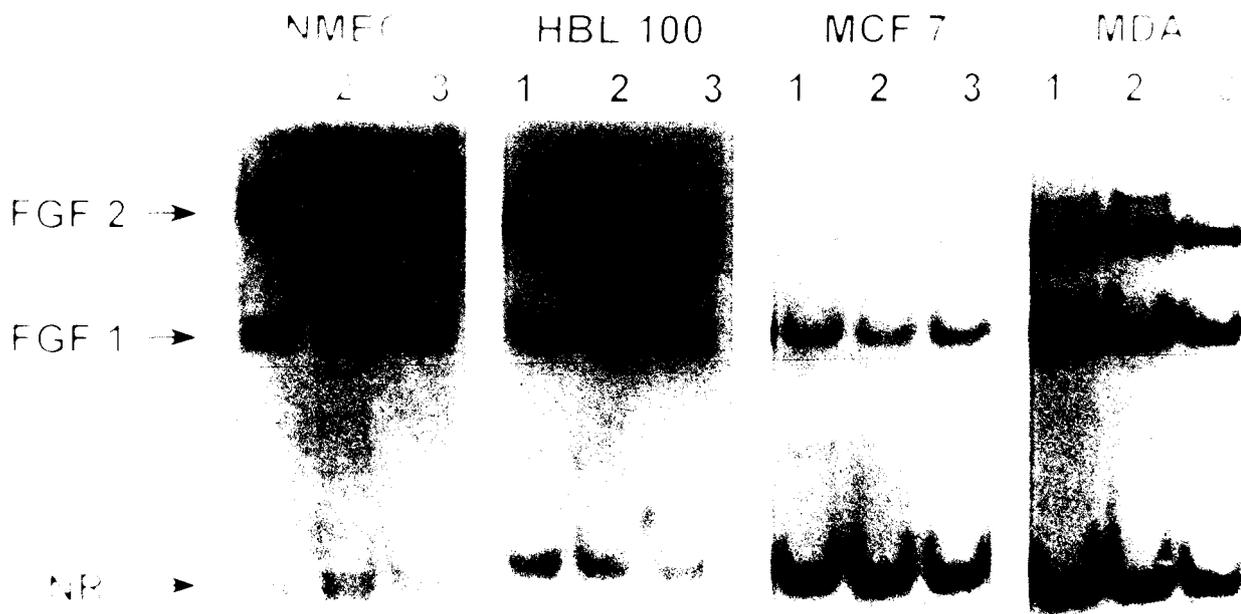
Figure 26. Analyse par RT-PCR de la régulation par le 17 β -oestradiol des transcrits FGF1 et FGF2.

A. Analyse à 30 cycles de la régulation par le 17 β -oestradiol des transcrits FGF1 et FGF2 dans les CEMN et les cellules HBL-100. Les lignes 1 indiquent l'expression témoin (absence d'oestradiol et de Tamoxifène), les lignes 2 représentent l'expression en présence de 10⁻⁸ M d'oestradiol, les lignes 3 l'expression en présence de 10⁻⁸ M d'oestradiol et de 10⁻⁶ M de Tamoxifène.

B. Les mêmes régulations sont analysées à 40 cycles pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

Figure 27. Analyse par RT-PCR de la régulation par le 17 β -oestradiol des transcrits FGF1 (FGF1 COD), FGF2 et des transcrits 1B du FGF1 (FGF1 EB) dans les cellules épithéliales mammaires normales.

La ligne 1 représente l'expérience témoin ; la ligne 2, la présence de 10⁻⁸ M de 17 β -oestradiol et la ligne 3 la présence simultanée de 10⁻⁸ M de 17 β -oestradiol et de 10⁻⁶ M de Tamoxifène.



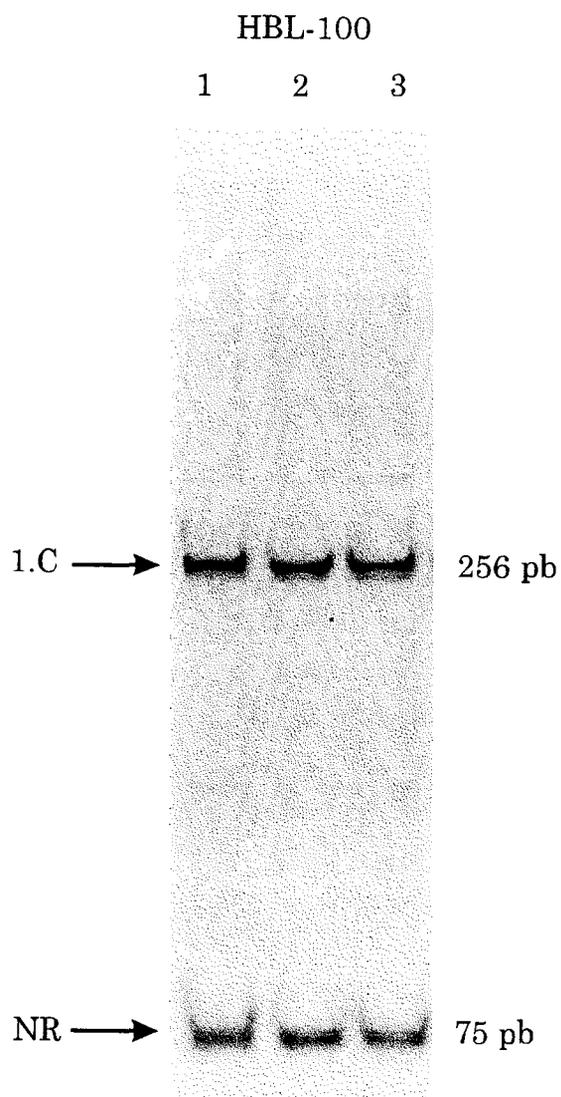


Figure 28. Analyse par RT-PCR de la régulation par le 17 β -oestradiol du transcrit FGF1-1C dans la lignée mammaire épithéliale immortalisée HBL-100.

Les cellules sont incubées en présence de 10⁻⁸ M de 17 β -oestradiol seul (ligne 2) ou en présence de 10⁻⁸ M de 17 β -oestradiol et de 10⁻⁶ M de Tamoxifène (ligne 3). L'expérience témoin est représentée par la ligne 1.

En résumé, l'œstradiol est sans effet sur l'expression du FGF2 dans l'ensemble des cellules mammaires étudiées. Seules les cellules épithéliales normales montrent une régulation positive des transcrits FGF1 en présence d'œstradiol. Aucun des transcrits 1A, 1B, 1C ou 1D ne semble être impliqué dans l'augmentation du taux de l'ensemble des transcrits FGF1. Le transcrit 1B est même réprimé par l'œstradiol.

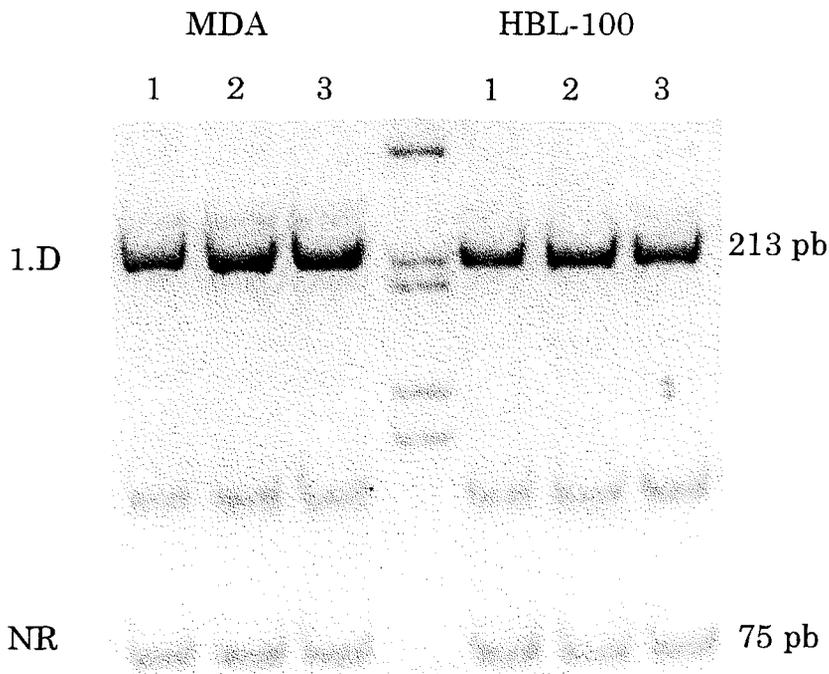


Figure 29. Analyse par RT-PCR de la régulation du transcrit FGF1-1D par le 17β -œstradiol dans les cellules mammaires MDA-MB-231 et HBL-100.

Les cellules sont incubées en présence de 10^{-8} M de 17β -œstradiol seul (lignes 2) ou en présence de 10^{-8} M de 17β -œstradiol et de 10^{-6} M de Tamoxifène (lignes 3). L'expérience témoin est représentée par les lignes 1.

III. DISCUSSION, CONCLUSIONS

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes synthétisées par l'ovaire et qui agissent sur les tissus cibles par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires. Il est bien établi que la participation de ces hormones est essentielle dans le déclenchement de la croissance de la glande mammaire. Le rôle direct des œstrogènes comme facteurs mitogènes pour les cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses fût très controversé. De multiples travaux ont confirmé le rôle indirect de ces hormones en montrant qu'elles stimulaient la prolifération des cellules épithéliales mammaires par activation de gènes de facteurs de croissance (EGF, TGF α , IGF).

A l'exception de la lignée MDA-MB-231 et des cellules HBL-100, les cellules épithéliales mammaires saines et les MCF-7 sont hormono-dépendantes. Cependant, les récepteurs aux œstrogènes n'ont pas été détectés dans les cellules HBL-100. L'étude de la sensibilité au 17 β -œstradiol des gènes FGF1 et FGF2, dans les cellules épithéliales mammaires, révèle que seul le gène FGF1 est sensible à cette hormone. L'analyse par EIA du taux de la protéine FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires normales, transformées ou cancéreuses mises en présence d'œstradiol ne montre aucune variation sous l'effet de cette hormone. Les résultats obtenus par RT-PCR sur la régulation des messagers FGF2 par l'œstradiol confirment ceux obtenus sur la protéine, donc l'insensibilité de l'expression du gène FGF2 aux œstrogènes. Dans la prostate hyperplasique bénigne humaine, le gène FGF2 est également insensible à la dihydrotestostérone (DHT) (Geller *et al.*, 1994). La croissance de la prostate est pourtant sous le contrôle de la DHT dont l'effet mitogène est modulé par plusieurs facteurs de croissance (Serio *et al.*, 1991). L'expression génique et la production protéique du FGF2 sont cependant stimulées par la FSH ("Follicule-Stimulating Hormone") dans les cellules de Sertoli de tubes séminifères de rat (Mullaney et Skinner, 1992). Cette étude suggère que le FGF2 pourrait être le médiateur de la stimulation indirecte par la FSH de la prolifération des cellules de Sertoli. Le gène FGF2 semble donc être régulé par des hormones stéroïdes de façon tissu-spécifique.

Le taux de protéine FGF1 est augmenté sous l'effet du 17 β -œstradiol dans l'ensemble des cellules épithéliales mammaires hormono-dépendantes mais également et curieusement dans les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231.

L'expression des messagers FGF1 est stimulée par l'œstradiol dans les cellules normales uniquement. La régulation du FGF1 par les œstrogènes dans les cellules épithéliales mammaires normales semble être une régulation transcriptionnelle. A l'opposé, elle serait une régulation traductionnelle dans les cellules transformées ou cancéreuses. Cependant, l'augmentation du taux de protéine et/ou des messagers sous l'effet des œstrogènes pourrait être le résultat d'une augmentation de leur stabilité dans le cytosol. La réalisation du test aux œstrogènes en présence d'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) ou de cycloheximide (inhibiteur de la traduction) indiquerait la bonne hypothèse.

Par ailleurs, dans l'étude de la régulation du FGF1 par les œstrogènes, d'importants niveaux de facteur se trouvent en présence de très faibles niveaux d'expression du gène dans la lignée cancéreuse MCF-7. Cette différence entre l'abondance des ARNm et de la protéine pourrait être le reflet d'une expression génique brève et/ou d'une dégradation rapide des messagers. Les contacts cellule-cellule et l'association à la matrice extracellulaire peuvent également réguler l'accumulation des ARNm FGF1 sous l'effet des androgènes dans des cultures asynchrones à haute densité cellulaire (Hall *et al.*, 1990). L'expression du gène FGF1 est également augmentée par l'hormone stéroïde testostérone dans les cellules tumorales hormono-dépendantes DDT-1 dérivées de muscle lisse de canaux déférents de hamster (Hall *et al.*, 1990). Le gène FGF1 est amplifié dans la lignée tumorale DDT-1 et pourrait jouer un rôle de facteur autocrine pour la prolifération de ces cellules (Bishop, 1987 ; Kolata, 1987). Dans cette lignée les androgènes régulent l'expression d'un autre gène de facteur de croissance, le gène *v-sis* spécifiant le PDGF (Syms *et al.*, 1984). L'expression du FGF8 est induite par la testostérone dans la lignée de tumeur mammaire de souris SC3 (Tanaka *et al.*, 1992). Le FGF7 est également induit par les androgènes dans le stroma de la vésicule séminale (Alarid *et al.*, 1994). Dans cette glande, le FGF7 dérive du stroma et stimule spécifiquement la croissance de l'épithélium adjacent. Par ailleurs, ce facteur est mitogène pour les cellules épithéliales isolées de la glande mammaire de souris (Imagawa *et al.*, 1994b) ; il est donc possible que son expression soit régulée par les hormones et qu'il soit un facteur mitogène paracrine pour les cellules épithéliales mammaires. L'injection de fortes doses de FGF7 chez des rates induit

une hyperplasie des canaux mammaires (Ulrich *et al.*, 1994). Le FGF7 pourrait donc être un facteur mammogène puissant pouvant jouer un rôle dans la tumorigenèse mammaire. Plusieurs facteurs de croissance de la famille du FGF sont mitogènes pour les cellules épithéliales mammaires, produits par ces cellules et régulés par les hormones stéroïdes. La perte du contrôle de l'expression et/ou de la régulation hormonale de ces facteurs pourrait être à l'origine d'une prolifération anarchique menant au cancer.

L'analyse de la régulation par le 17β -œstradiol des différents transcrits (1A, 1B, 1C ou 1D) du FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires humaines montre qu'à l'exception de la régulation négative du transcrit 1B dans les cellules normales, aucune autre modulation n'est induite. Les œstrogènes induisent une régulation différentielle des transcrits FGF1 dans les cellules normales. L'absence de modulation des différents transcrits FGF1 dans les cellules HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231 est conforme à l'absence de la modulation de l'ensemble des transcrits FGF. Dans les cellules épithéliales normales, l'augmentation du taux de l'ensemble des transcrits FGF1 sous l'effet de l'œstradiol n'est pas due à l'augmentation des transcrits 1A, 1C ou 1D. Cette régulation positive des messagers FGF1 ne serait pas due non plus au transcrit 1B puisqu'il est réprimé par les œstrogènes. Cependant, d'après les connaissances acquises sur le rôle régulateur de la transcription et de la traduction des régions 5' non codantes de plusieurs gènes, il est probable que la répression du transcrit 1B soit impliquée dans l'augmentation des ARNm du FGF1. Nous pourrions imaginer que le transcrit 1B contrôle négativement l'expression du gène FGF1 et que les œstrogènes par répression du promoteur 1B stimulent la transcription d'autres messagers FGF1. En effet, il a été récemment montré qu'une séquence exonique dans le pré-messager du FGF R2 réprime l'épissage alternatif de l'exon alternatif K-sam en faveur de l'exon bek (Del Gatto et Breathnach, 1995). Des séquences exoniques régulent leur propre expression et peuvent également réguler celle d'autres exons. Les messagers induits par les œstrogènes dans les cellules épithéliales mammaires pourraient être ceux récemment découverts par Voulgaropoulou et collaborateurs (1994) (1A', 1A'', 1A'/B, 1A'/E et 1A'/F) ou d'autres non encore découverts.

A l'aide d'expériences de transfection de cellules DDT-1 par des plasmides contenant différentes régions 5' NC du gène FGF1, mises à côté d'un gène rapporteur de l'activité chloramphénicol acetyl transférase, Hall et collaborateurs (1993) ont mis en évidence deux régions promotrices impliquées dans la réponse à la testostérone. Ces régions promotrices sont localisées dans les séquences 5' NC-1645/-392 et -392/-4 du gène FGF1 et sont tissu- et cellule-spécifiques. Il existe donc entre les nucléotides -1645 et -4 des éléments (ADN) de réponse à la testostérone dans le gène FGF1. Cette réponse pourrait être directe ou indirecte et assurée ou non par une séquence ADN spécifique de réponse à la testostérone. Plusieurs éléments peuvent être candidats (tableau XIII). Les résultats de Hall et collaborateurs (1993) sur la régulation du FGF1 par la testostérone dans un tissu également régulé par les hormones sexuelles confortent nos résultats concernant la sensibilité du gène FGF1 aux œstrogènes dans la glande mammaire humaine. De plus, l'existence de régions promotrices 5' NC impliquées dans la réponse à la testostérone du gène FGF1 semble conforter notre hypothèse sur le rôle des exons de la région 5' NC dans la régulation transcriptionnelle du gène FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires.

Tableau XIII. Eléments ADN de la région 5' du FGF1 susceptibles d'être impliqués dans la réponse au sérum et aux oestrogènes.

Elément	Sequence
1. ARE/PRE/GRE 1/2 sites	AGAACA AGGACA
2. Nur77/COUP-like RE	<u>TGACCTTTGA</u> <u>CTGACCTGTCAG</u>
3. Pu-Py Tract	[TG] ₃₄
4. SRE-like	<u>TGTAGTGG(A/T)₆GCCTTACA</u>
5. Zif 268/Egr-1 RE	GCGTGGAAG GTGGGGAGG GAGGGAAG
6. AP-1 RE	2 x TGAGTCA GAGTCA GAGTCAC
7. CRE	GACGTCA

Nos résultats montrent en outre que la régulation par les œstrogènes des messagers FGF1 dépend pour un même type cellulaire de l'état physiologique de la cellule (normale ou cancéreuse). Le transcrit 1B est modulé uniquement dans les cellules normales. Les résultats obtenus dans l'étude de la régulation du facteur de croissance FGF1 et des transcrits FGF1 par les œstrogènes suggèrent l'existence d'une coordination entre la prolifération induite par ces hormones et l'augmentation du FGF1. L'augmentation du taux de FGF1 est plus importante dans les cellules cancéreuses MCF-7 que dans la lignée transformée HBL-100 ou dans les cellules normales. L'altération des régulations géniques dépendant des hormones stéroïdes pourrait être un événement important dans le développement des cancers hormono-dépendants. Ainsi, l'absence de la régulation transcriptionnelle du gène FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires transformées ou cancéreuses pourrait être analysée comme étant une perte d'un contrôle génique important de la prolifération cellulaire. La régulation du gène FGF1 est un phénomène complexe et la limite des connaissances actuelles dans ce domaine ne permettent pas de comprendre la signification biologique de la régulation positive par les œstrogènes du gène FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires normales. De même, il est actuellement impossible d'expliquer le paradoxe soulevé par la régulation positive du FGF1 dans la lignée cancéreuse hormono-indépendante MDA-MB-231. Cependant, l'analyse de 10 sous-clones cellulaires isolés, par culture continue, d'une lignée parentale hormono-indépendante MDA-MB-231 a montré que 8 d'entre eux ont acquis le récepteur haute affinité des œstrogènes (RE) (Crépin *et al.*, 1990). Par ailleurs, Camby et Kiss (1994) ont montré que l'addition d'œstradiol au milieu de culture de cellules MDA-MB-231, décrite comme étant RE-, est sans effet sur la prolifération de cette lignée et que, par contre, l'addition d'un anticorps neutralisant anti-œstradiol diminue fortement cette prolifération. Selon ces auteurs, cet anticorps a neutralisé l'action stimulatrice d'œstradiol provenant du sérum ajouté au milieu de culture ou produit par les cellules elles-mêmes. Dans ce dernier cas, l'œstradiol endogène agirait de façon autocrine et/ou intracrine sur les cellules MDA-MB-231. Les récepteurs aux œstrogènes étant occupés par l'œstradiol endogène, les méthodes classiques de dosage des récepteurs aux œstrogènes (RE) (immunocytochimie et déplacement du radiomarquage) ne permettraient pas leur mise en évidence. En

conclusion, selon Camby et Kiss (1994), la lignée MDA-MB-231 ne serait pas hormono-indépendante. De plus, le fait que la prolifération des cellules MDA-MB-231 ne soit pas stimulée par de l'œstradiol exogène, mais inhibée par un anti-œstradiol neutralisant, semble confirmer l'hypothèse de la boucle auto-et/ou intracrine.

Le problème posé par l'hormono-dépendance ou -indépendance de la lignée cellulaire MDA-MB-231 pourrait être résolu par l'utilisation de radiotraceurs constitués par des dérivés de l'œstradiol plus affins pour les récepteurs que l'œstradiol lui-même (Souttou *et al.*, 1993).

Une étude *in vitro* visant à prédire la sensibilité de cellules de cancer du sein à l'œstradiol a montré que 6 sur 19 cas d'un groupe négatif pour le RE sont stimulés par l'œstradiol (Matsuoka *et al.*, 1994). Dans notre étude de la régulation des gènes FGF1 et FGF2 par les œstrogènes, nous avons vérifié que l'action de l'œstradiol est réellement assurée par le récepteur aux œstrogènes par l'utilisation du Tamoxifène. Le Tamoxifène est un anti-œstrogène, il bloque l'action des œstrogènes sur leur récepteur. Dans les cellules épithéliales mammaires normales, l'augmentation du taux de transcrits FGF1 et du taux de FGF1 par les œstrogènes est inhibée en présence de Tamoxifène. Cet anti-œstrogène se fixant aux récepteurs œstrogéniques des cellules normales bloque l'action de l'œstradiol. Le même blocage est observé dans la lignée cancéreuse MCF-7. Le Tamoxifène induit une inhibition modérée dans la lignée transformée HBL-100 non hormono-dépendante en comparaison avec les CEMN et MCF-7. Ceci pourrait être le reflet d'une différence dans l'affinité des œstrogènes pour leur récepteur entre les cellules épithéliales mammaires étudiées. La lignée MDA-MB-231 répond à l'addition de Tamoxifène par une baisse du taux de FGF1. Cet effet reste inexpliqué du fait de l'hormono-indépendance de cette lignée. Un résultat similaire est obtenu avec un autre anti-œstrogène, le ICI 164384, sur des cellules MDA-MB-231 ER⁻ (Coradini *et al.*, 1994). Nous rappelons cependant que la non détection des RE dans la lignée MDA-MB-231 peut être un artéfact technique dû à la limite de détection des méthodes classiquement utilisées.

L'action des œstrogènes sur le gène FGF1 dans les cellules épithéliales mammaires humaines est médiée par leur récepteur. Les œstrogènes, une fois fixés

sur leurs récepteurs nucléaires, agiraient directement ou indirectement sur le gène FGF1. Les œstrogènes augmentent la synthèse d'autres facteurs de croissance tels que l'EGF, le TGF α , le PDGF et les IGFs dans les cellules épithéliales de cancer du sein. Le Tamoxifène inhibe fortement la prolifération des MCF-7 stimulées par l'EGF et l'IGF-I (Wosikowski *et al.*, 1993). Pour son effet anti-œstrogénique, le Tamoxifène est commercialisé et proposé dans l'hormonothérapie adjuvante du cancer du sein depuis plus de 15 ans. Il a été montré que le 4-hydroxy-Tamoxifène induit l'apoptose des cellules MCF-7 par inhibition du mécanisme de signalisation dépendant des œstrogènes (Welsh, 1994). L'implantation de MCF-7 dans la souris "nude" puis le traitement par le Tamoxifène montrent que cet anti-œstrogène induit d'une façon concomitante un arrêt de la prolifération de la tumeur et une inhibition de la croissance des cellules endothéliales. Le Tamoxifène induirait la régression de la tumeur en inhibant également l'angiogenèse péri tumorale (Haran *et al.*, 1994)..

En raison du rôle crucial des œstrogènes dans le développement normal et cancéreux de la glande mammaire, l'étude des régulations géniques contrôlées par ces hormones serait un élément-clé pour la compréhension de leurs mécanismes d'action. La compréhension de ces mécanismes pourrait être elle-même à l'origine de stratégies antitumorales nouvelles.

Discussion générale

Les facteurs de croissance, et plus particulièrement, le FGF1 et le FGF2 sont des protéines ubiquitaires et multifonctionnelles qui interagissent avec des récepteurs membranaires à activité tyrosine-kinase. Ces molécules sont impliquées dans la communication et la signalisation cellulaires assurant ainsi d'importants mécanismes de régulation. Elles contrôlent différents processus tels que la croissance et la différenciation cellulaires, le développement embryonnaire et la réparation tissulaire. La production des FGF doit donc être non seulement modulable en réponse à des signaux moléculaires multiples, mais surtout strictement régulée. Les altérations géniques ou les modifications de la transcription des gènes codant ces facteurs de croissance ou leurs récepteurs peuvent conduire à la tumorigenèse.

Les mécanismes d'action des FGF dans la cellule normale commencent à être bien compris ; par contre, les régulations de leur expression sont encore peu connues. La dépendance des facteurs extérieurs est une caractéristique de la cellule normale dans son environnement sain. La relative indépendance de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires vis-à-vis de l'addition de sérum ou de FGF suggérerait que ces cellules étaient capables par elles-mêmes de produire ce facteur. Les FGF pourraient donc intervenir, initialement ou secondairement, avec d'autres facteurs de croissance, dans la progression tumorale. Dans le but d'analyser cette hypothèse, nous avons recherché la production des facteurs de croissance FGF1 et FGF2 dans les cellules normales et cancéreuses du sein. Les cellules mammaires étudiées, qu'elles soient normales, transformées ou cancéreuses, produisent la forme 18 kDa du FGF1 et du FGF2. Le dosage par EIA des FGF1 et FGF2 montre que les cellules épithéliales mammaires normales, les cellules transformées HBL-100 et les cellules cancéreuses MCF-7 produisent des taux équivalents de ces facteurs. Il n'a donc pas pu être établi de corrélation directe entre la production des FGF et le phénotype cancéreux. Cependant, la lignée cancéreuse la plus invasive MDA-MB-231 produit davantage de facteur FGF1, ce qui expliquerait qu'elle prolifère de façon plus active en comparaison avec les autres lignées cellulaires (Delehedde *et al.*, 1995).

L'addition de fractions éluées de l'héparine-Sepharose, à partir de milieu conditionné ou de lysats de cellules mammaires, induit une stimulation de la prolifération de cellules CCL-39 et la différenciation de cellules PC-12. D'autre part, l'addition d'anticorps anti-FGF neutralisants au milieu de sevrage des cellules épithéliales mammaires étudiées diminuent de façon significative la prolifération de ces cellules. Ces résultats montrent que le FGF1 et le FGF2 produits par les cellules épithéliales mammaires sont biologiquement actifs et qu'ils sont sécrétés. Les facteurs de croissance FGF produits seraient donc impliqués dans la stimulation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales, transformées et cancéreuses selon une boucle autocrine externe. De nombreux travaux ont montré que ces cellules produisent d'autres facteurs de croissance capables de les stimuler de façon autocrine tels que l'EGF, le TGF α et les IGF. La perte de contrôle de l'expression de ces facteurs de croissance pourrait ainsi favoriser la progression tumorale.

L'analyse par PCR de l'expression des ARNm du FGF1 et du FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires montre que cette expression diffère en fonction de l'état physiologique de la cellule (normale, transformée ou cancéreuse). Les cellules normales et immortalisées expriment davantage de transcrits FGF2 et des taux équivalents de transcrits FGF1 en comparaison avec la lignée cancéreuse MDA-MB-231. La lignée cancéreuse MCF-7 exprime peu d'ARNm du FGF1 ; les transcrits sont indétectables même à un niveau élevé de cycles PCR. Ces résultats confortent ceux obtenus pour les protéines et montrent également que l'expression du FGF1 ne peut être corrélée au phénotype tumoral des cellules. L'expression des transcrits FGF2 est quant à elle plus importante dans les cellules normales ou transformées que dans les cellules cancéreuses. Ceci suggère que l'expression du FGF2 serait liée au caractère normal des cellules. Certaines études portant sur la mise en évidence du FGF1 et du FGF2 dans les tissus mammaires humains sains et cancéreux corroborent les résultats que nous avons obtenus sur les cellules normales en culture et les lignées cancéreuses. Cependant, des résultats contradictoires ont été également publiés. Ces contradictions rendent difficile la compréhension du rôle des FGF dans le développement normal et tumoral du sein. L'analyse *in vitro* de la régulation des FGF dans les cellules normales et cancéreuses pourrait contribuer à la compréhension de ce rôle.

Les mécanismes de régulation de l'expression des FGF1 et FGF2 sont encore largement méconnus. Cependant, depuis 1990 quelques travaux ont montré que les régions 5' et 3' non codantes, de certains gènes de facteurs de croissance dont le FGF1, sont impliquées dans le contrôle de la transcription et de la traduction protéique. Les régions 5' et 3' non codantes du gène FGF1 sont étendues, complexes et bien conservées chez les mammifères. Ces caractéristiques suggéraient à elles seules un rôle pour ces régions non traduites dans la régulation de l'expression du gène FGF1. A ce jour, le FGF1 est décrit comme étant un gène de plus de 120 kb dont seulement 35 kb constituent la région codante. La région 5' non codante contient 6 exons non traduits dont l'épissage alternatif avec le premier exon codant génère 9 transcrits différents spécifiant tous la même protéine. Ces transcrits sont exprimés de façon cellule- et tissu-spécifiques et leur expression est régulée par les hormones stéroïdes dans des cellules tumorales hormono-sensibles de tube séminifère et de prostate. Dans le but d'analyser l'expression, la régulation et le rôle des transcrits alternativement épissés du FGF1 dans le contrôle de la traduction du FGF1 dans la glande mammaire, une méthode PCR semi-quantitative a été employée en parallèle de la quantification de la protéine. Des expressions différentielles des transcrits 1B, 1C et 1D ont été mises en évidence dans les cellules épithéliales mammaires étudiées. En particulier, le transcrit 1A semble être spécifique des cellules normales. Cette expression spécifique du transcrit 1A pourrait avoir une signification biologique dont l'analyse serait d'importance pour la compréhension des mécanismes de régulation et d'action du FGF1. Le décryptage du rôle biologique du transcrit 1A dans les cellules mammaires pourrait contribuer à la découverte et à la compréhension de l'altération de ces mécanismes dans les cellules tumorales.

Dans les cellules épithéliales mammaires étudiées, l'expression et la traduction des messagers FGF1 ne sont pas régulées seulement de façon cellule-spécifique mais également en fonction de l'environnement cellulaire. Dans des conditions favorables à la prolifération telle que la présence de sérum, les cellules mammaires étudiées présentent des régulations différentielles des transcrits et de la protéine FGF1. L'analyse de la régulation des transcrits FGF1 alternativement épissés montre également des régulations différentielles par le sérum. En considérant les connaissances acquises sur le rôle des régions 5' NC dans le contrôle

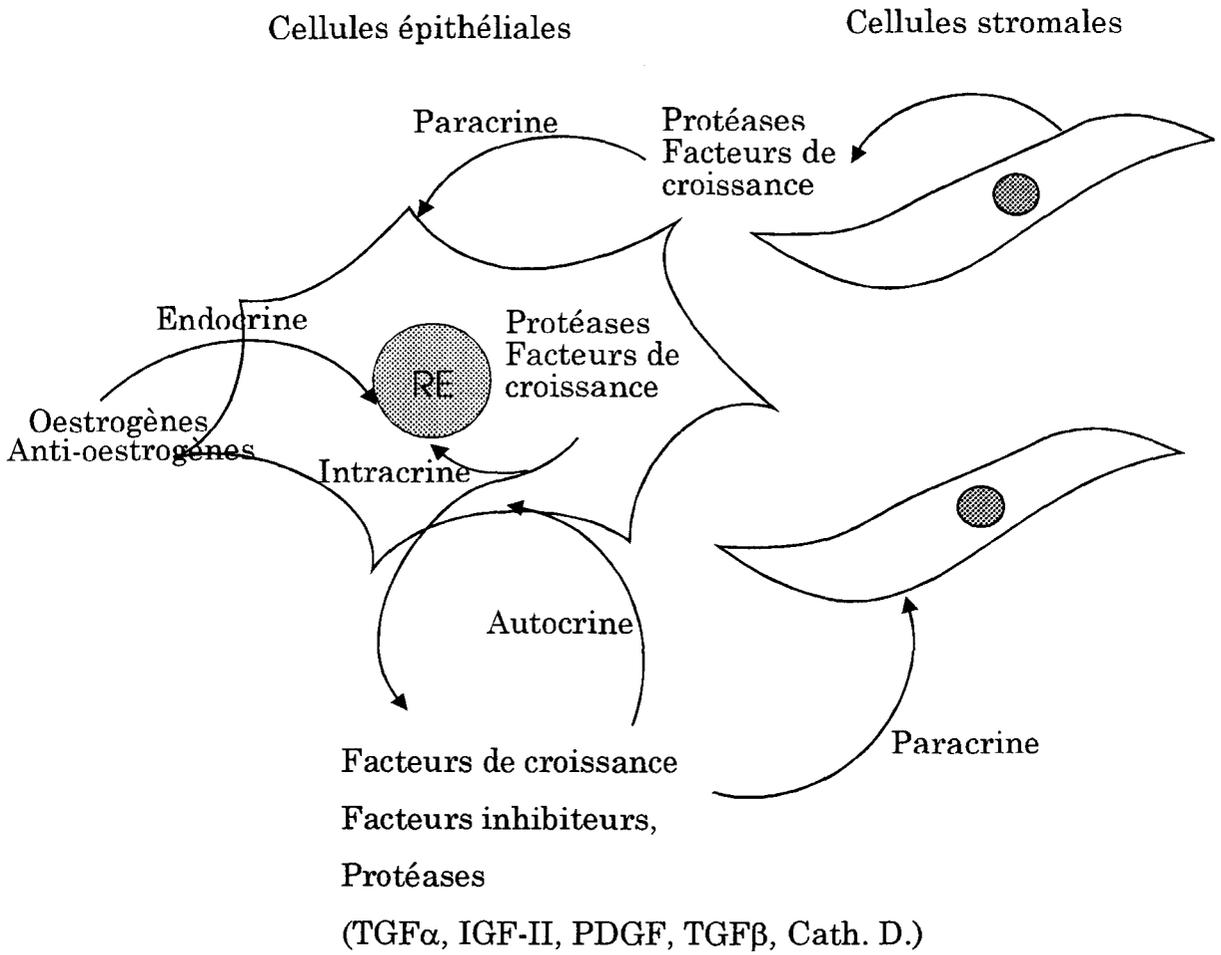


Figure 30. Les différentes voies de régulation de la croissance de tumeur du sein.

D'après Freiss et al., 1993.

de l'expression et de la traduction géniques, il apparaît à travers les résultats obtenus que ces régions sont impliquées dans le contrôle de la production du FGF1 par les cellules épithéliales mammaires. Ce contrôle semble être transcriptionnel ou traductionnel en fonction du type cellulaire. Il existe dans le gène FGF1 une séquence ADN assimilée à un élément de réponse au sérum susceptible d'être la cible de facteurs sériques.

Les cellules épithéliales mammaires humaines normales et tumorales répondent aux œstrogènes par une augmentation de la prolifération (Lippman *et al.*, 1976). Cette réponse fait intervenir de nombreux intermédiaires dont des facteurs de croissance. Certains de ces facteurs agiraient selon une boucle de stimulation autocrine sur les cellules épithéliales possédant les récepteurs adéquats (Osborne et Arteaga, 1990), alors que d'autres agiraient sur les cellules du stroma, qui en retour produiraient des facteurs de croissance capables de générer un contrôle paracrine sur les cellules épithéliales (Fig. 30). Les cellules épithéliales mammaires cancéreuses possédant des récepteurs aux œstrogènes (RE+) traitées, *in vitro*, par cette hormone, régulent finement la synthèse des facteurs stimulateurs et inhibiteurs de croissance. La production de nombreux facteurs de croissance est augmentée par les œstrogènes, alors que celle des facteurs inhibiteurs se trouve réprimée.

L'interaction entre les œstrogènes et les FGF dans les cellules épithéliales mammaires n'était, par contre, pas analysée. La comparaison du rôle des œstrogènes dans la production du FGF par les cellules normales et les cellules cancéreuses du sein pourrait révéler le rôle du FGF dans la tumorigenèse mammaire. Les résultats obtenus montrent que ces hormones augmentent le taux de FGF1 dans les cellules normales et cancéreuses. Cette production est cependant stimulée davantage dans les cellules cancéreuses. L'analyse en parallèle des transcrits FGF1 montre une augmentation de ces transcrits uniquement dans les cellules normales. La régulation de l'expression du gène FGF1 semble être transcriptionnelle dans les cellules normales et traductionnelle dans les cellules cancéreuses. Les transcrits alternativement épissés du FGF1 sont régulés différemment dans les cellules mammaires étudiées. Il serait donc intéressant de

chercher si une éventuelle relation existe entre la régulation des transcrits FGF1 et le contrôle de la traduction de ce facteur.

L'étude de la régulation du FGF2 par le sérum et les œstrogènes dans les cellules épithéliales mammaires ne montre aucune modulation des transcrits dans les deux cas. Le taux de protéine FGF2 étant relativement faible, aucune modulation n'a pu être observée.

Le FGF1 produit par les cellules épithéliales mammaires est régulé par les hormones et le sérum en fonction du phénotype et stimule la prolifération de ces cellules. Ces caractéristiques seules ne permettent pas d'établir une relation directe entre le FGF1 et la tumorigenèse mammaire. Il faudrait prendre également en considération l'activité du FGF1. Cette activité dépend non seulement du type cellulaire mais également de l'environnement de la cellule. Les protéoglycanes sont des constituants de la matrice extracellulaire capables de moduler l'activité du FGF (Ruoslahti et Yamaguchi, 1991 ; Mali *et al.*, 1993). Ils jouent le rôle de molécule de séquestration du FGF, ils sont impliqués selon un complexe ternaire dans la présentation et l'activation du récepteur tyrosine kinase du FGF et sont enfin des transporteurs du FGF du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Des différences dans la constitution de la matrice extracellulaire pourrait donc contribuer à moduler différemment la biodisponibilité et l'activité du FGF sur les cellules normales et cancéreuses.

D'autres éléments, tels que des protéases, interviennent, selon différents modes d'action, dans les multiples voies de régulation de la prolifération tumorale. Ainsi, des enzymes protéolytiques agissent selon un mode autocrine ou paracrine sur les cellules épithéliales et les fibroblastes du stroma (Fig. 30) et permettent ainsi l'essaimage des cellules tumorales par dégradation du stroma environnant la tumeur. De même, comme il est résumé dans cette figure, les facteurs de croissance produits par les cellules épithéliales agiraient également par voie autocrine ou paracrine sur les fibroblastes dans le sens d'une stimulation de synthèse de protéases. La surproduction de la cathepsine D, régulée par les hormones, favorise davantage le phénotype malin et le potentiel métastatique des cellules transformées. Il apparaît à travers ce langage moléculaire complexe que les altérations présentes dans une cellule cancéreuse peuvent affecter de nombreux systèmes. Ces

altérations étant de mieux en mieux connues, des traitements adaptés à chaque cas de prolifération tumorale sont en cours de réalisation. L'interruption d'une boucle de stimulation peut se faire à l'aide d'anticorps et de toxines ciblées sur un récepteur. Des séquences nucléotidiques de synthèse, complémentaires à l'ARNm cible, peuvent bloquer sa traduction. A l'inverse, des agonistes des facteurs de croissance hématopoïétiques peuvent être utilisés pour augmenter les défenses immunitaires. Des agonistes des facteurs de croissance inhibiteurs de la prolifération peuvent être utilisés pour freiner la prolifération, induire la différenciation ou l'apoptose des cellules malignes. Dans ce contexte, il serait intéressant d'analyser l'action de facteurs inhibiteurs de la prolifération tels que le TGF β , l'acide rétinoïque et la lactoferrine sur la production du FGF1 et du FGF2 dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses.

Enfin, des stratégies plus ambitieuses, impliquant la thérapie génique ou la stimulation d'une immunité spécifique, sont également en cours de réalisation.

Annexe technique

Produits et tampons concernant la détection des protéines FGF

Tampon de Laemmli

Solution stock I: 5 ml de Tris/HCl 2 M, pH 8,8, 0,1% de bleu de bromophénol(10 ml), 60 ml de glycérol, eau mQ qsp 100 ml.

Solution stock II: SDS 20% (900 µl), 5% de β-mercaptoéthanol.

Le tampon d'échantillon est obtenu en mélangeant 800 µl de la solution I et 200 µl de solution II.

Gel d'acrylamide 18%

Solution stock A, pH 8,8: 18,17 g Tris (Trizma base, Sigma), 4 ml de SDS 10% ; ajuster à pH 8,8 avec une solution d'HCl 6 N (environ 5 ml) ; qsp 100 ml avec de l'eau.

Protogel ultrapur: 30% acrylamide/0,8% bisacrylamide (Prolabo). Pour 15 ml de gel à 18% d'acrylamide: 3,75 ml de solution I, 2,25 ml d'eau, 9 ml de protogel, 100 µl de persulfate d'ammonium 10%, 10 µl de temed.

Gel de concentration

Solution stock B, pH 6,8: 6 g de Tris, 4 ml de SDS 10% ; ajuster à pH 6,8 en ajoutant environ 7 ml d'HCl 6 N, qsp 100 ml avec de l'eau.

Pour 10 ml de gel de concentration: 2,5 ml de solution B, 1 ml de protogel, 6,5 ml, 60 µl de persulfate d'ammonium 10%, 10 µl de temed.

Tampon d'électrophorèse de protéines

6 g/l de Tris (Sigma), 28,8 g/l de glycine (Merck), 10 ml/l de SDS 10%.

Tampon de transfert de protéines

Pour 1 litre de tampon: 5,81 g de Tris, 2,93 g de glycine, 3,75 ml de SDS 10%, 200 ml de méthanol.

Coloration au chloronaphtol

Après "Western-blot", les bandes de protéines témoins sont révélées dans la solution suivante: à une solution stock de 6 mg de chloronaphtol et 2 ml de méthanol froid maintenue à l'obscurité sont ajoutés 10 ml de tampon PBS et 10 µl d'H₂O₂. La membrane de transfert est incubée dans cette solution pendant 10 à 30 min puis la réaction de coloration est arrêtée à l'eau.

Réactifs d'immunocytochimie

Solution de paraformaldéhyde à 4%: 0,8 g de paraformaldéhyde est mis dans 10 ml d'eau de qualité de qualité mQ puis la solution est chauffée au bain-marie 60°C sous une hotte. Quelques gouttes de NaOH 1 N sont ajoutées pour faciliter la dissolution. Après refroidissement, la solution de paraformaldéhyde est complétée par 10 ml de tampon PBS concentré 2 fois (la solution ne se conserve pas).

Tampons et réactifs du dosage EIA

Tampon EIA: tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 contenant 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA.

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

Réactif Ellman: tampon Na-phosphate 0,01 M, pH 7,4 contenant $7,5 \cdot 10^{-4}$ M acétylthiocholine et $2,5 \cdot 10^{-4}$ M d'acide dithionitrobenzoïque.

Tampons et réactifs pour l'extraction et l'électrophorèse des ARN

Tampon guanidinium: guanidine thiocyanate (Fluka) 5,2 M, citrate de sodium 25 mM, pH 6,5, β -mercaptoéthanol 100 mM, sarcosinate de sodium 0,5%. Dissoudre le thiocyanate de guanidinium dans un minimum d'eau (autoclavée 1 h à 130°C) sur un agitateur une nuit à température ambiante. La solution est légèrement chauffée (55°C) le lendemain avant d'ajouter le citrate de sodium, le β -mercaptoéthanol. Le sarcosinate de sodium est ajouté en dernier puis la solution complétée à l'eau autoclavée. Cette solution se conserve à 4°C à l'abri de la lumière.

Coussin de chlorure de césium (ClCs)

Solution stock A: acétate de sodium 2 M, pH 5,5 autoclavée.

Solution stock B: EDTA 0,5 M, pH 8 autoclavée.

Pour 100 ml de solution de chlorure de césium: 99,6 g de ClCs, 2,5 ml de solution A, 2 ml de solution B, qsp 100 ml avec de l'eau autoclavée.

Tampon acétate de sodium 0,1 M, β -mercaptoéthanol 0,01 M, sarcosyl 0,5%.

Solution stock A: acétate de sodium 3 M, pH 5,5.

Solution stock B: β -mercaptoéthanol 14,3 M.

Solution stock C: sarcosyl 20%, pH 6,1.

Pour 100 ml de solution: 3,33 ml de solution A, 70 µl de solution B, 2,5 ml de solution C, qsp 100 ml avec de l'eau de qualité mQ autoclavée.

Tampon TE: Tris/HCl 10 mM, pH 7, 1 mM EDTA.

Tampon de dénaturation d'ARN : (tampon d'échantillon) Pour 50 µl: 25 µl de formamide (Fluka) (désionisé), 8 µl de formaldéhyde (désionisé), 10 µl de tampon MOPS 5x, 7 µl d'eau.

Bleu de charge

Pour 1 ml: 625 µl de glycérol, 20 µl d'EDTA 1 mM, pH 8, 4 mg de bleu de bromophénol, 4 mg de xylène cyanol, 355 µl d'eau.

Gel d'agarose 1,5% dénaturant: pour 200 ml de gel, 3 g d'agarose (Appligène) dissous dans 124 ml d'eau mQ autoclavée contenant 124 µl de DEPC (soit 0,1%) sous agitation magnétique. La solution est ensuite autoclavée et laissé à refroidir jusqu'à 60°C. 40 ml de tampon de migration 5x (MOPS) et 36 ml de formaldéhyde 37% sont ajoutés (soit en concentrations finales: 1x et 2,2 M respectivement).

Tampon MOPS 5x (tampon de migration 5x): 0,2 M MOPS, pH 7 (Sigma), 40 mM d'acétate de sodium, 5 mM d'EDTA, pH 8.

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

Tampon de préhybridation: solution de Denhardt 5x, SSC 6x, 200 µg/ml d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 min à 100°C puis sur la glace.

Tampon d'hybridation: 50% formamide, SSC 6x, 10% sulfate de dextran, 200 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Dissoudre d'abord le sulfate de dextran dans le formamide par petites doses, ajouter le SSC puis le SDS et enfin l'eau (sur agitateur pendant longtemps).

Milieu de culture de bactéries et solutions d'extraction de plasmides

Milieu de culture LB: 10 g/l de bactotryptone (Difco), 5 g/l d'extrait de levure (Difco), 5 g/l de NaCl, pH ajusté à 7,4 avec NaOH. Le milieu est stérilisé par un autoclave à 120°C pendant 45 min.

Tampon GTE: Tris 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, glucose 50 mM.

Tampon KAc: acétate de potassium 3 M, acide acétique 2 M, pH 4,8.

Tampon TBE 10x: acide borique 900 mM, Tris/HCl 1 M, EDTA 20 mM, pH 8.

Solutions et tampons d'électrophorèse d'ADN: "Southern-blot"

Gel de polyacrylamide 10%, pour 30 ml de gel: 8 ml d'une solution d'acrylamide à 30% (29% acrylamide, 1% bisacrylamide), 1,5 ml de tampon TBE 20x, 250 µl de persulfate d'ammonium 10%, qsp 20,5 ml avec de l'eau mQ. La solution est dégazée puis 10 µl de temed sont ajoutés.

Bleu de charge: 100 µl de bleu Maniatis type 3 X 6X, 300 µl de glycérol, 300 µl d'eau.

Tampon de préhybridation et d'hybridation avec les sondes polynucléotidiques

Pour 20 ml de solution: 2 ml de formamide 100%, 6,9 ml d'eau, 1 ml de SDS 10%, 2 ml de tampon phosphate 0,5 M, pH 7, 0,2 ml d'EDTA 200 mM, 3,3 ml de dextran sulfate 20%, 0,8 ml de solution Denhardt 50x, 3,6 ml de NaCl 5 M, 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon. La solution est dénaturée (100°C puis glace), avant utilisation.

Tampon de préhybridation et d'hybridation avec les sondes oligonucléotidiques

Pour 100 ml: 50 ml de formamide, 25 ml de tampon SSC 20x, 10 ml d'une solution phosphate de sodium 1 M, 5 ml de solution Denhardt 100x, 0,5 ng d'ADN de sperme de saumon (dénaturé préalablement 3 min à 95°C puis sur de la glace).

Bibliographie

- Abraham J.A., Mergia A., Whang J.L., Tumolo A., Friedman J., Hjerrild K.A., Gospodarowicz D. & Fiddes J.C. (1986a).** Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*, 233: 545-548.
- Abraham J.A., Whang T.L., Tumolo A., Mergia A., Friedman J., Gospodarowicz D. & Fiddes J.S. (1986b).** Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*, 5: 2523-2528.
- Acland P., Dixon M., Peters G. & Dickson C. (1990).** Subcellular fate of the *int-2* oncoprotein is determined by choice of initiation codon. *Nature*, 343: 662-665.
- Adelaide J., Mattei M.G., Marics I., Raybaud F., Plancke J., de Lapeyrière O. & Birnbaum D. (1988).** Chromosomal localization of the *hst* oncogene and its coamplification with *int-2* in human melanoma. *Oncogene*, 2: 413-416.
- Adnane J., Gaudray P., Dionne C.A., 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.
- Aebischer P., Salessiotis A.N. & Winn S.R. (1989).** Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. *Neuro. Sci. Res.*, 23: 282-289.
- Ago H., Kitagawa Y., Fujishima A., Matsuura Y. & Katsube Y. (1991).** Crystal structure of basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution. *J. Biochem. (Tokyo)*, 110: 360-363.
- Alarid E.T., Rubin J.S., Young P., Chedid M., Ron D., Aaronson S.A. & Cunha G.R. (1994).** Keratinocyte growth factor functions in epithelial induction during seminla vesicle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1074-1078.
- Alberts G.F., Hsu D.K.W., Peifley K.A. & Winkles J.A. (1994).** Differential regulation of acidic and basic fibroblast growth factor gene expression in fibroblast growth factor-treated rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 75: 261-267.
- Allen L.E. & Maher P.A. (1993).** Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in an invasive bladder carcinoma cell line. *J. Cell Physiol.*, 155: 368-375.
- Allen R.E., Dodson M.W. & Luiten L.S. (1984).** Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation by bovine pituitary fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.* 152: 154-160.
- Allouche M., Bayard F., Clamens S., Fillola G., Sié P. & Amalric F. (1995).** Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGF-receptors in human leukemic cells. *Leukemia*, 9: 77-86.
- Alterio J., Courtois Y., Robelin J., Bechet D. & Martelly I. (1990).** Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are expressed by skeletal muscle satellite cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166: 1205-1212.
- Anandappa S.Y., Winstanley J.H.R., Leinster S., Green B., Rudland P.S. & Barraclough R. (1994).** Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease. *Br. J. Cancer*, 69: 772-776.

- Anderson K.J., Dam D., Lee S. & Cotman C.W.** (1988). Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons *in vivo*. *Nature*, London, 332: 360-361.
- Andres J.L., De Falcis D., Noda M. & Massague J.** (1992). Binding of two growth factors families to separate domains of proteoglycan Betaglycan. *J. Biol. Chem.*, 267: 5927-5930.
- Armelin H.A.** (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2702-2706.
- Arrick B.A., Korc M. & Derynck R.** (1990). Differential regulation of expression of three transforming growth factor β species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res.*, 50: 299-303.
- Arrick B.A., Lee A.L., Grendell R.L. & Derynck R.** (1991). Inhibition of translation of transforming growth factor- β 3 mRNA by its 5' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4306-4313.
- Arteaga C.L., Tandon A.K., Von Hoff D.D. & Osborne C.K.** (1988). Transforming growth factor β : potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 48: 3898-3904.
- Arteaga C.L., Carty-Dugger T., Moses H.L., Hurd D. & Pietenpol J.A.** (1993). Transforming growth factor β 1 can induce estrogen-independent tumorigenicity of human breast cancer cells in athymic mice. *Cell Growth and Differentiation*, 4: 193-202.
- Asai T., Wanaka A., Kato H., Masana Y., Seo M. & Tohyama M.** (1993). Differential expression of two members of the FGF receptor gene family FGFR-1 and FGFR-2 mRNA, in the adult rat central nervous system. *Mol. Brain Res.*, 17: 174-178.
- Assouline M., Hutchinson C., Morton K., Mascarelli F., Jeanny J.C., Fayein N., Pouliquen Y. & Courtois Y.** (1989). *In vivo* binding of topically applied human bFGF on rabbit corneal epithelial wound. *Growth Factors*, 1: 251-261.
- Baird A. & Ling N.** (1987). Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells *in vitro*: implication for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem. Biophys. Res.*, 142: 428-435.
- Baird A. & Walicke P.A.** (1989). Fibroblast growth factors. *British medical bulletin*, 45: 438-452.
- Baird A., Culler F., Jones K.L. & Guillemin R.** (1985a). Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet*, 2: 563.
- Baird A., Esch F., Bohlen P., Ling N. & Gospodarowicz D.** (1985b). Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. *Regul. Pept.*, 12: 201-213.
- Baird A., Esch F., Gospodarowicz D. & Guillemin R.** (1985c). Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors : partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem.*, 24: 7855-7860.

- Baird A., Schubert D., Ling N. & Guillemin R.** (1988). Receptor and heparin binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2324-2324.
- Baldin V., Roman A.M., Bosc-Bierne I., Amalric F. & Bouché G.** (1990). Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J.*, 9: 1511-1517.
- Bano M., Salomon D.S. & Kidwell W.R.** (1985). Purification of mammary-derived Growth Factor from human milk and human mammary tumors. *J. Biol. Chem.*, 260: 5745-5752.
- Barotte C., Eclander F., Ebel A., Labourette G., Sensenbrenner M. & Will B.** (1989). Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on choline acetyl transferase activity and astroglial reaction in adult rats after partial fimbria transection. *Neurosci. Letters*, 101: 197-202.
- Barraclough R., Fernig D.G., Rudland P.S. & Smith J.A.** (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 C.M., Folkman J. & Vlodavsky I.** (1989). Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparanase and heparin-like molecules. *Biochemistry*, 28: 1737-1743.
- Bashkin P., Neufeld G., Gitay-Goren H. & Vlodavsky I.** (1992). Release of cell surface-associated basic fibroblast growth factor by glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Cell. Physiol.*, 151: 126-137.
- Basilico C., Curatola A.M., Newman K., Talarico D., Mansukhani A., Ittmann M., Veleich A. & Delli-Bovi P.** (1989). Expression and properties of the growth factor encoded in the K-fgf oncogene. *J. Cell. Biochem. (Suppl. 13b)*, 78.
- Basilico C. & Moscatelli D.** (1992). The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.*, 59: 115-165.
- Bates S.E., Davidson N.E., Valverius E.M., Freter C.E., Dickson R.B., Tam J.P., Kudlow J.E., Lippman M.E. & Salomon D.S.** (1988). Expression of transforming growth factor a and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible significance. *Mol. Endocrinol.*, 2: 543-555.
- Bates S., Valverius E., Ennis B., Bronzert D.A., Sheridan J.P., Stampfer M.R., Mendelsohn J., Lippman M.E. & Dickson R.B.** (1990). Expression of the TGF- α /TGF α receptor pathway in normal human breast epithelial cells. *Endocrinology*, 126: 596-607.
- Becker D., Meier C.B. & Herlyn M.** (1989). Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *EMBO J.*, 8: 3685-3691.
- Becker D., Lee P., Rodeck U. & Herlyn M.** (1992). Inhibition of the fibroblast growth factor receptor (FGF-R1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene*, 7: 2303-2313.

- Becks G.P., Logan A., Phillips I.D., Wang J.F., Smith C., Desousa D. & Hill D.** (1994). Increase of basic fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor messenger RNA during rat thyroid hyperplasia: temporal changes and cellular distribution. *J. Endocrin.*, 142: 325-338.
- Bellot F., Crumley G., Kaplow J.M., Schlessinger J., Jaye M. & Dionne C.A.** (1991). Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J.*, 10: 2849-2854.
- Benharroch D. & Birnbaum D.** (1990). Biology of the fibroblast growth factor gene family. *Isr. J. Med. Sci.*, 26: 212-219.
- Bernfield M., Kokennyesi R., Kato M., Hinkes M.T., Spring J., Gallo R. & Lose E.J.** (1992). Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulphate proteoglycans. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 8: 365-398.
- Bikfalvi A., Dupuy E., Inyang A.L., Fayein N., Leseche G., Courtois Y. & Tobelem G.** (1989). Binding internalization, and degradation of basic fibroblast growth factor in human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*, 181: 75-84.
- Bikfalvi A., Sharon K., Pintucci G., Quarto N. & Mignatti P.** (1995). Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J. Cell Biol.*, 129: 233-243.
- Birnbaum D.** (1995). Transduction anormale du signal et cancer. *La revue du praticien*, 45: 1881-1887.
- Bishop J.M.** (1987). The molecular genetics of cancer. *Nature*, 235: 305-311.
- Blam S.B., Mitchell R., Tisher E., Rubin J.S., Silua M., Silver S., Fiddes J.C., Abraham J.A. & Aaronson S.A.** (1988). Addition of growth hormone secretion signal to basic fibroblast growth factor results in cell transformation and secretion of aberrant forms of the protein. *Oncogene*, 3: 129-136.
- Blam S.B., Tisher E., Abraham J.A. & Aaronson S.A.** (1989). Expression of acidic fibroblast growth factor in NIH/3T3 cells with and without the addition of a secretion signal sequence. *J. Cell Biochem (Suppl. 13 b)* 152.
- Böhlen P., Baird A., Esch F., Ling N. & Gospodarowicz D.** (1984). Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5364-5368.
- Böhlen P., Baird A., Esch F. & Gospodarowicz D.** (1985). Acidic fibroblast growth factor (FGF) from bovine brain: amino-terminal sequence and comparison with basic FGF. *EMBO J.*, 4: 1951-1956.

- Böhmer F.D., Kraft R., Otto A., Wernstedt C., Hellman U., Kurtz A., Muller T., Rodhi K., Etzold G. & Lehmann W.** (1987). Identification of a polypeptide growth inhibitor from bovine mammary gland. *J. Biol. Chem.*, 262: 15137-15143.
- Boilly B., Cavanaugh C., Thomas D., Hondermarck H., Bryant S. & Bradshaw R.** (1990). Presence of acidic FGF and its binding sites in the axololt regeneration blastema. *Developmental Biology*, 145 : 183-187.
- Borg A., Sigurdsson H., Tandon A.K., Clark G.M., Ferno M., Killander D. & Mc Guire W.L.** (1989). Proto-oncogene amplification in human breast cancer. Abstract Nordic Cancer Union Symposium, Stockholm.
- Bouché G., Gas N., Prats H., Baldin V., Tauber J.P., 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.
- Bradshaw R.A., Fujii R., Hondermarck H., Raffioni S., Wu Y. & Yarski M.A.** (1994). Polypeptide growth factors: structure, function and mechanism of action. *Pure & Appl. Chem.*, 66: 9-14.
- Braumrucker C. & Stemberger B.** (1989). Insulin and insulin-like growth factor I stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue *in vitro*. *J. Animal Sci.*, 67: 3503-3514.
- Bresciani F.** (1968). Topography of DNA synthesis in the mammary gland of the C3H mouse and its control by ovarian hormones: an autoradiographic study. *Cell Tissue Kinet.*, 1: 51-63.
- 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.
- Brookes S., Smith R., Casey G., Dickson C. & Peters G.** (1989). Sequence organization of the human int-2 gene and its expression in teratocarcinoma cells. *Oncogene*, 4: 429-436.
- Brünner N., Boysen B., Romer J. & Spang-Thomsen M.** (1993). The nude mouse as an *in vivo* model for human breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 24: 257-264.
- Buckley-Sturrock A., Woodward S.C., Senior R.M., Griffin G.L., Klagsbrun M. & Davidson J.M.** (1989). Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J. Cell Physiol.*, 138: 70-78.
- Bugler B., Amalric F. & Prats H.** (1991). Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell Biol.*, 11: 573-577.
- Bunnag P., Waddell K.S., Varban M.L. & Chiu I.M.** (1991). Transformed phenotype conferred to NIH/3T3 cells by ectopic expression of heparin-binding growth factor 1/acidic fibroblast growth factor. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 27: 89-96.

- Buntrock P., Buntrock M., Marx I., Kranz D., Jentzsch K.D. & Eder G.** (1984). Stimulation of wound healing using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. *Exp. Pathol.*, 26: 247-254.
- Burgess W.H.** (1993). Structure-function analysis of fibroblast growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor). *In: Growth factors, peptides and receptors*, ed. T.W. Moody, Plenum Press, N.Y. pp 297-308.
- Burgess W.H. & Maciag T.** (1989). The heparin binding fibroblast growth factor family of proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 575-606.
- Burgess W.H., Mehlman T., Marshak D.R., Fraser B.A. & Maciag T.** (1986). Structural evidence that endothelial cell growth factor beta is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7216-7220.
- Burgess W.H., Dionne C.A. & Kaplow J.** (1990). Characterization and cDNA cloning of phospholipase C γ , a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 4770-4777.
- Burrus L.W., Lieder K.W., Zuber M.E., Lueddecke B.A., Anderson I. & Olwin B.B.** (1991). Association of 45 and 70 kDa polypeptides with a putative non-tyrosine kinase FGF receptor. The New York Academy of Sciences "The FGF family".
- Cailleau R., Young R., Olive M. & Reeves W.J.** (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.*, 53: 661-674.
- Camby I. & Kiss R.** (1993). *In vitro* estradiol-sensitivity characterization of the MCF-7, ZR-75, MDA-MB-231 and T47-D human breast neoplastic cell lines. *Anticancer Res.*, 13: 2355-2360.
- Carey B.M., Dooley M., Weedle R. & Clynes M.** (1993). Production of autostimulatory growth factors by the human carcinoma line, RPMI 2650. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29A: 153-160.
- Caron de Fromental C., Nardeux P.C., Soussi T., Laviaille 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.
- Casey G., Smith R., McGillivray D., Peters G. & Dickson C.** (1986). Characterization and chromosome assignment of the human homology of int-2, a potential proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 502-510.
- Castellot J.J. Jr., Pukac L.A., Caleb B.L., Wright T.C. Jr. & Karnosky M.** (1989). Heparin selectively inhibits a protein kinase C-dependent mechanism of cell cycle progression in calf aortic smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, 109: 3147-3155.
- Champion-Arnaud P., Ronsin C., Gilbert E., Gesnel M.C., Houssaint E. & Breathnach R.** (1991). Multiple messenger RNAs code for proteins related to the BEK fibroblast growth factor receptor. *Oncogene*, 6: 979-987.
- Chavan A.J., Haley B.E., Volkin D.B., Marfia K.E., Verticelli A.M., Bruner M.W., Draper J.P., Burke C.J. & Middaugh C.R.** (1994). Interaction of

nucleotides with acidic fibroblast growth factor (FGF-1). *Biochemistry*, 33: 7193-7202.

- Chellaiah A.T., McEwen D.G., Werner S., Xu J. & Ornitz D.M.** (1994). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. *J. Biol. Chem.*, 269: 11620-11627.
- Cheon H.G., Laroche W.J., Bottaro D.P., Burgess W.H. & Aaronson S.A.** (1994). High-affinity binding sites for related fibroblast growth factor ligands reside within different receptor immunoglobulin-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 989-993.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., Mc Donald R.J. & Rutter W.J.** (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18: 5294-5299.
- Chiu I.M., Wang W.P. & Lehtoma K.** (1990). Alternative splicing generates two forms of mRNA coding for human heparin binding growth factor 1. *Oncogene*, 5: 755-762.
- Chodak G.W., Shing Y., Borge M., Judge S.M. & Klagsbrun M.** (1986). Presence of heparin binding growth factor in mouse bladder tumors and urine from mice with bladder cancer. *Cancer Res.*, 46: 5507-5510.
- Chodak G.W., Hospelhorn V., Judge S.M., Mayforth R., Koeppen H. & Sasse J.** (1988). Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney carcinoma. *Cancer Res.*, 48: 2083-2088.
- Chotani M.A., Payson R.A., Winkles J.A. & Chiu I.-M.** (1995). Human fibroblast growth factor 1 gene expression in vascular smooth muscle cells is modulated via an alternate promoter in response to serum and phorbol ester. *Nucleic Acids Res.*, 23: 434-441.
- Chua C.C., Barritault D., Geiman D.E. & Ladda R.L.** (1987). Induction and suppression of type I collagenase in cultured human cells. *Coll. Relat. Res.*, 7: 277-284.
- Cirillo A., Arruti C., Courtois Y. & Jeanny J.C.** (1990). Localization of basic fibroblast growth factor binding sites in the chick embryonic neural retina. *Differentiation*, 45: 161-167.
- Clegg C.H., Linkhart T.A., Olwin B.B. & Hauschka S.D.** (1987). Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.*, 105: 949-956.
- Coffey R.J., Leof E.B., Shipley G.D. & Moses H.L.** (1987). Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J. Cell Physiol.*, 132: 143-148.
- Coleman-Krnacik S. & Rosen J.** (1994). Differential temporal and spatial gene expression of fibroblast growth factor family members during mouse mammary gland development. *Molecular Endocrinology*, 8: 218-229.
- Constantopoulos G., Rees S., Cragg B.G., Barranger J.A. & Brady R.O.** (1983). Suramin-induced storage disease: mucopolysaccharidosis. *Am. J. Pathol.*, 113: 266-268.

- Cook P.W., Coffey R.J. Jr., Magun B.E., Pittelkow M.R. & Shipley G.D.** (1990). Expression and regulation of mRNA coding for acidic and basic fibroblast growth factor and transforming growth factor α in cells derived from human skin. *Mol. Endocrinol.*, 4: 1377-1385.
- Coombes R., Gomm J., Luqmani Y., Johnson C., Bansal G., Yiangou C., Coope R., Browne P. & Mason R.** (1994). Acidic and basic FGF and their receptors in normal and malignant breast cells. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 35: 259.
- Cooper D.N.W. & Barondes S.H.** (1990). Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretion mechanism. *J. Cell Biol.*, 110: 1681-1691.
- Copeland R.A., Ji H., Halfpenny A.J., Williams R.W., Thompson K.C., Herber W.K., Thomas K.A., Bruner M.W., Ryan J.A. & Marquis-Omer D.** (1991). The structure of human acidic fibroblast growth factor and its interaction with heparin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 289: 53-61.
- Coradini D., Biffi A., Capelletti V. & Di Fronzo G.** (1994). Activity of Tamoxifen and new antiestrogens on estrogen receptor positive and negative breast cancer cells. *Anticancer Research*, 14: 1059-1064.
- Cordeiro P.J., Seckel B.R., Lipton S.A., D Amore P.A., Wagner J. & Madison R.** (1989). Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration *in vivo*. *Plast. Recons. Surg.*, 83: 1013-1019.
- Corin S.J., Chen L.C. & Hamburger A.W.** (1990). Enhancement of anchorage-independent growth of a human adrenal carcinoma cell line by endogenously produced basic fibroblast growth factor. *Int. J. Cancer*, 46: 516-521.
- Couderc B., Prats H., Bayard F. & Amalric F.** (1991). Potential oncogenic effects of basic fibroblast growth factor requires cooperation between CUG and AUG-initiated forms. *Cell Regulation*, 2: 709-718.
- Coughlin S.R., Barr P.J., Cousens L.S., Fretto L.T. & Williams L.T.** (1988). Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 263: 988-993.
- Coulier F., Batoz M., de Lapeyrière O. & Birnbaum D.** (1991). Putative structure of the FGF6 gene product and role of the signal peptide. *Oncogene*, 6: 1437-1444.
- Coulier F., Pizette S., Batoz M. & Birnbaum D.** (1992). Les récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes: une famille qui s'agrandit. *Médecine/Sciences*, 8: 811-888.
- Coulier F., de Lapeyrière O. & Birnbaum D.** (1993). Complexité de la famille des facteurs de croissance FGF: la preuve par 9. *Medecine/Sciences*, 9: 1113-1115.
- Courty J., Chevallier B., Moenner M., Loret C., Lagente O., Böhlen P., Courtois Y. & Barritault D.** (1985). Evidence for FGF-like growth factor in adult bovine retina: analogies with EDGF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136: 102-108.

- Courty J., Loret C., Chevallier B., Moenner M. & Barritault D. (1987).** Biochemical comparative studies between eye and brain derived growth factors. *Biochimie*, 69: 511-516.
- Courty J., Dauchel M.C., Mereau A., Badet J. & Barritault D. (1988).** Presence of basic fibroblast growth factor receptors in bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.*, 263: 11217-11220.
- Crepin M., Salle V., Raux H., Berger R., Hamelin R., Brouty-Boyé D. & Israel L. (1990).** Steroid hormone receptors and tumorigenicity of sublines from breast tumor metastatic MDA-MB-231 cell line. *Anticancer Res.*, 10: 1661-1666.
- Crossley P.H. & Martin G.R. (1995).** The mouse *FGF8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, 121: 439-451.
- Crumley G.M., Dionne C.A. & Jaye M. (1989).** The gene for human acidic fibroblast growth factor encodes two upstream exons alternatively spliced to the first coding exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171: 7-13.
- Crumley G.R., Howk R., Ravera M.W. & Jaye M. (1990).** Multiple polyadenylation sites downstream from the human aFGF gene encoding acidic fibroblast growth factor. *Gene*, 85: 489-497.
- Cuevas P., Carcella F., Baird A. & Guillemin R. (1988).** Basic fibroblast growth factor (bFGF) increases peripheral nerve regeneration rate. Seventh general meeting of the society of neurochemistry, June 12-17 (Abstract).
- Czubayko F., Riegel A.T. & Wellstein A. (1994a).** Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth. *J. Biol. Chem.*, 269: 21358-21363.
- Czubayko F., Smith R.V., Chung H.C. & Wellstein A. (1994b).** Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J. Biol. Chem.*, 269: 28243-28248.
- Dabin I. & Courtois Y. (1991).** Acidic fibroblast growth factor overexpression in corneal epithelial wound healing. *Growth Factors*, 5: 129-139.
- Danielsen N., Pettman B., Vahlsing H.L., Manthorpe M. & Varon S. (1988).** Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J. Neurosci. Res.* 20: 320-330.
- David G., Lories V., Decock B., Marynen P., Casiman J.J. & 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.
- Dawson E.K. (1934).** A histological study of the normal mammal in relation to tumor growth. *Edinburg Med. J.*, 41: 653-682.
- De Lapeyrière O., Rosnet O., Benharroch D., Raybaud F., Marchetto S., Planche J., Galland F., Mattei M.G., Copeland N., Jenkins N., Coulier F. & Birnbaum D. (1990).** Structure chromosome mapping and expression of the murine FGF gene. *Oncogene*, 5: 823-831.
- Del Gatto F. & Breathnach R. (1995).** Exon and intron sequences, respectively, repress and activate splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 4825-4834.

- Delaunoy J.P., Langui D., Ghangour S., Labourette G. & Sensenbrenner M.** (1988). Influence of basic fibroblast growth factor on carbonic anhydrase expression by rat glial cells in primary culture. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 6: 129-136.
- Delehedde M., Boilly B. & Hondermarck H.** (1995). Differential responsiveness of human breast cancer cells to basic fibroblast growth factor. A cell kinetics study. *Oncology Research*, 7: 399-407.
- Dell K.R. & Williams L.T.** (1992). A novel form of fibroblast growth factor receptor 2, alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. *J. Biol. Chem.*, 267: 21225-21229.
- Delli-Bovi P., Curatola A.M., Kern F.G., Greco A., Ittmann 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: 730-737.
- Delli-Bovi P., Curatola A.M., Newman K.M., Sato Y., Moscatelli D., Hewick R.M., Rifkin D.B. & Basilico C.** (1988). Processing, secretion and biological properties of a novel growth factor of the fibroblast growth factor family with oncogenic potential. *Mol. Cell Biol.*, 8: 2933-2941.
- Dib A., Adelaide J., Courjal F., Courseaux A., Jacquemier J., Gaudray P., Theillet C., Pebusque M.J. & Birnbaum D.** (1994). Co-amplification in human breast tumors and physical linkage at chromosomal band 12p13, of *CCND2* and *FGF6* genes. *International Journal of Oncology*, 5: 1375-1378.
- Dickson C.** (1990). Role of INT-genes in murine mammary tumor development and implications for human breast cancer. *Int. J. Cancer, Suppl.*, 5: 51-54.
- Dickson C. & Peters G.** (1987). Potentiel oncogene product related to growth factors. *Nature*, 326: 833-835.
- Dickson C., Smith R., Brookes S. & Peters G.** (1984). Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the commun integration region int-2. *Cell*, 37: 529-536.
- Dickson R.B., Huff K.K., Spencer E.M. & Lippman M.E.** (1986). Induction of epidermal growth factor-related peptides by 17 β -estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology*, 118: 138-142.
- Dickson R.B., Thompson E.W. & Lippman M.E.** (1990). Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 37: 305-316.
- Dickson R.B., Johnson M.D., Bano M., Shi E., Kurebayashi J., Ziff B., Martinez-Lacaci I., Amundadottir L. & Lippman M.E.** (1992). Growth factors in breast cancer : mitogenesis to transformation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 43: 69-78.
- Dionne C. Crumley G., Bellot F., Kaplow J.M., Searfoss G., Ruta M., Burgess W.H., Jaye M. & Schlessinger J.** (1990). Cloning and expression of two distincts high affinity receptors cross reacting with acidic and basic fibroblast growth factor. *EMBO J.*, 9: 2685-2692.
- Dixon M., Deed R. & Acland P.** (1989). Detection and characterization of the fibroblast growth factor-related oncoprotein INT-2. *Mol. Cell Biol.*, 9: 4896-4902.

- Duan D.S.R., Werner S. & Williams L.T.** (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.
- Eccleston P.A. & Silberberg D.H.** (1985). Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes *in vitro*. *Dev. Brain Res.*, 21: 315-318.
- Ederly M., Mc Grath M., Larson L. & Nandi S.** (1984). Correlation between *in vitro* growth and regulation of estrogen and progesterone receptors in rat mammary epithelial cells. *Endocrinology*, 115: 1691-1697.
- Eisemann A., Ahn J.A., Graziani G., Tronick S.T. & Ron D.** (1991). Alternative splicing generates at least five different isoforms of the human basic-FGF receptor. *Oncogene.*, 6: 1195-1202.
- 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: 783-790.
- Emoto N., Isozaki O., Ohmura E., Ito F., Tsushima T., Shizume K., Demura H. & Toma H.** (1994). Basic fibroblast growth factor (FGF-2) in renal cell carcinoma, which is indistinguishable from that in normal kidney, is involved in renal cell carcinoma growth. *J. Urol.*, 152: 1626-1631.
- Engel L.W. & Young N.A.** (1978). Human breast carcinoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*, 38: 4327-4339.
- Ervin P.R.J., Kaminski M.S., Cody R.L. & Wicha M.S.** (1989). Production of mammatatin, a tissue-specific growth inhibitor, by normal human mammary cells. *Science*, 244: 1585-1587.
- Ethier S.P., Summerfelt R.M., Cundiff K.C. & Asch B.B.** (1990). The influence of growth factors on the proliferative potential of normal and primary breast cancer-derived human breast epithelial cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 17: 221-230.
- Fang W., Hartmann N., Chow D.T., Riegel A.T. & Wellstein A.** (1992). Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J. Biol. Chem.*, 267: 25889-25897.
- Fantl V., Brookes S., Smith R., Casey G., Barnes D., Johnstone G., Peters G. & Dickson C.** (1989). Characterization of the proto-oncogene int-2 and its potential for the diagnosis of human breast cancers. *Cancer cells*, 7: 283-287.
- Faucheux B., Dupuis C., Cohen S.Y., Tourbah A., Jonet I., Raulais D., Vigny M., Courtois Y. & Jeanny J.C.** (1991). Acidic fibroblast growth factor (aFGF)-like immunoreactivity was examined in the optic nerve. *Neurosci. Lett.*, 134: 118-121.
- Feige J.J. & Baird A.** (1988). Glycosylation of the basic fibroblast growth factor receptor. The contribution of carbohydrate to receptor function. *J. Biol. Chem.*, 263: 14023-14029.
- Feige J.J. & Baird A.** (1989). Basic fibroblast growth factor is substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3174-3178.

- Feige J.J., Bradley J.D., Fryburg K., Farris J., Cousens L.C., Barr P.J. & 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.
- Feinberg A.P. & Vogelstein B.** (1984). A technique for radio-labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 137: 266-267.
- Fen Z. & Daniel T. O.** (1991). 5' untranslated sequences determine degradative pathway for alternate PDGF B/c-sis mRNA's. *Oncogene*, 6: 953-959.
- Fernig D.G. & Gallagher J.T.** (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.*, 5: 353-377.
- Fernig D.G., Smith J.A. & Rudland P.S.** (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 D.G., Smith J.A. & Rudland P.S.** (1991). Relationship of growth factors and differentiation in normal and neoplastic development of the mammary gland. *Cancer Treat. Res.*, 53: 47-78.
- Fernig D.G., Rudland P.S. & Smith J.A.** (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 D.G., Barraclough R., Rudland P.S., Wilkinson M.C. & Smith J.A.** (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 tumors. *Int. J. Cancer*, 54: 629-635.
- Ferrara N., Sweigener L., Neufeld G., Mitchell R. & Gospodarowicz D.** (1987). Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 5773-5777.
- Finch P.W., Rubin J.S., Miki T., Ron D. & Aaronson S.A.** (1989). Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, 245: 752-755.
- Flamm S.L., Wellstein A., Lupu R., Kern F., Lippman M.E. & Gelmann E.P.** (1989). Expression of fibroblast growth factor peptides in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 30: 71 (Abstr. 278).
- Flaumenhaft R., Moscatelli D., Saksela O. & Rifkin D.B.** (1989). Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor : matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J. Cell Physiol.*, 140: 75-81.
- Florkiewicz R.Z. & Sommer A.** (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non AUG codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3978-3981.
- Florkiewicz R.Z., Baird A. & Gonzales A.M.** (1991). Multiple forms of bFGF : differential nuclear and cell surface localization. *Growth Factors*, 4: 265-275.

- Florkiewicz R.Z., Majack R.A., Buechler R.D. & Florkiewicz E.** (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell. Physiol.*, 162: 388-399.
- Foekens J.A., Sheuwerets A.M., Stuurman-Smeets E.M.J., Dorssers L.C.J., Berns E.M.J.J. & Klun J.G.M.** (1992). Pleiotropic actions of suramin on the proliferation of human breast-cancer cells *in vitro*. *Int. J. Cancer*, 51: 439-444.
- Folkman J. & Cotran R.** (1976). Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 16: 207-248.
- Folkman J. & Klagsbrun M.** (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235: 442-447.
- Folkman J. & Shing Y.** (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 267: 10931-10934.
- Folkman J., Klagsbrun M., Sasse J., Wadzinski M.G., Ingber D. & Vlodavsky I.** (1988). A heparin-binding angiogenic protein basic fibroblast growth factor is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.*, 130: 393-400.
- Forough R., Zhan X., MacPhee M., Friedman S., Engleka K.A., Sayers T., Wiltrout R.H. & Maciag T.** (1993). Differential transforming abilities of human fibroblast growth factor-1. *J. Biol. Chem.*, 268: 2960-2968.
- Forsyth I. A.** (1989). Growth factors in mammary gland development. *J. Reprod. Fer.*, 85: 759-770.
- Fredj-Reygrobellet, Plouet J., Delayre T., Baudouin F. & Lapalus P.** (1987). Effects of a FGF and bFGF on wound healing in rabbit cornea. *Curr Eye Res.*, 6: 1205-1209.
- Freiss G., PrÈbois C. & Vignon F.** (1993). Control of breast cancer cell growth by steroids and growth factors: interaction and mechanisms. *Breast Cancer Res. Treat.*, 27: 57-68.
- Friedl A. & Jordan V.C.** (1994). Oestradiol stimulates growth of oestrogen receptor-negative MDA-MB-231 breast cancer cells in immunodeficient mice by reducing cell loss. *European J. Cancer*, 30(A): 1559-1564.
- Friesel R., Burgess W.H. & Maciag T.** (1989). Heparin binding growth factor stimulates tyrosine phosphorylation in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.*, 9: 1857-1865.
- Friesel R., Burgess W.H., Mehlman T. & Maciag T.** (1986). The characterization of the receptor for the endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. *J. Biol. Chem.*, 261: 7581-7584.
- Fujimoto K., Ichimori Y., Yamaguchi H., Arai K., Futami T., Ozono S., Hirao Y., Kakizoe T., Terada M. & Okajima E.** (1995). Basic fibroblast growth factor as a candidate tumor marker for renal cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 86: 182-186.
- Fujita H., Ohta M., Kawasaki T. & Itoh N.** (1991). The expression of 2 isoforms of the human fibroblast growth factor receptor (flg) is directed by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174: 946-951.
- Gabelman B. M. & Emerman J. T.** (1992). Effects of estrogen, epidermal growth factor, and transforming growth factor- α on the growth of human breast epithelial cells in primary culture. *Exp. Cell. Res.*, 201: 113-118.

- Gadjusek C.M. & Carbon S.** (1989). Injury- induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J. Cell Physiol.*, 139: 570-579.
- Gallagher J.T.** (1994). Heparan sulphates as membrane receptors for Fibroblast growth factors. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 32: 239-247.
- Gallagher J.T., Lyon M. & Steward W.P.** (1986). Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.*, 236: 313-325.
- Gannoun-Zaki L., Pierri I., Badet J., Moenner M. & Barritault.** (1991). Internalization of basic fibroblast growth factor by chinese hamster lung fibroblast cells: involvement of several pathways. *Exp. Cell Res.*, 197: 272-279.
- Gautschi-Sova P., Jiang Z.P., Frater-Schroder M. & Bohlen P.** (1987). Acidic fibroblast growth factor is present in nonneural tissue: isolation and chemical characterization from bovine kidney. *Biochemistry*, 26: 5844-5847.
- Geller J., Sionit L.R., Baird A., Kohls M., Hoffman R. & Connors K.** (1994). *In vivo* and *in vitro* effects of androgen on FGF2 concentrations in the human prostate. *Prostate*, 25: 206-209.
- Gensburger C., Labourdette G. & Sensenbrenner M.** (1987). Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells *in vitro*. *Febs Lett.*, 217: 1-5.
- Gimenez-Gallego G., Rodkey J., Bennett C., Rios-Candelore M., DiSalvo J. & Thomas K.** (1985). Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science*, 230: 1385-1388.
- Gimenez-Gallego G., Conn G., Hatcher V.B. & Thomas K.A.** (1986). The complete amino acid sequence of human brain-derived acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 611-617.
- Gleizes P.-E., Noaillac-Depeyre J., Amalric F. & Gas N.** (1995). Basic fibroblast growth factor (FGF-2) internalization through the heparan sulfate proteoglycans-mediated pathway: an ultrastructural approach. *Eur. J. Cell Biol.*, 66: 47-59.
- Goldfarb M.** (1990). The fibroblast growth factor family. *Cell Growth & Diff.*, 1: 439-445.
- Gomm J.J., Smith J., Ryall G.K., Baillie R., Turnbull L. & Coombes R.C.** (1991). Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor b1 in the human mammary gland. *Cancer Res.*, 51: 4685-4692.
- Goodrich S.P., Yan G.C., Bahrenburg K. & Mansson P.E.** (1989). The nucleotide sequence of rat heparin binding growth factor 1 (HBGF-1). *Nucleic Acids Res.*, 17: 2867.
- Gordon P.B., Choi H.U., Conn G., Ahmed A., Ehrmann B., Rosenberg L. & Hatcher V.B.** (1989). Extracellular matrix heparan sulfate proteoglycans modulate the mitogenic capacity of acidic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.*, 140: 584-592.
- Gospodarowicz D.** (1974). Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, 249: 123-129.
- Gospodarowicz D.** (1975). Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, 250: 2515-2520.

- Gospodarowicz D.** (1976). Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing and neoplastic growth. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 9: 1-19.
- Gospodarowicz D. & Mescher A.L.** (1981). Fibroblast growth factor and vertebrate regeneration. *In: Riccardi V. M., Mulvihill J.J. (eds) Advances in neurology: neurofibromatosis.* Raven, New York, pp 149-171.
- Gospodarowicz D. & Cheng J.** (1986). Heparin protects basic and acidic fibroblast growth factor from inactivation. *J. Cell. Physiol.*, 128: 475-484.
- Gospodarowicz D., Wesnmen J., Moran J.S. & Lindstrom J.** (1976). Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J. Cell Biol.*, 70: 395-405.
- Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G.M., Baird A. & Böhlen P.** (1984). Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6963-6967.
- Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G.M., Baird A., Esch F. & Böhlen P.** (1985). Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117: 2383-2391.
- Gospodarowicz D., Baird A., Cheng J., Lui G.M., Esch F. & Böhlen P.** (1986). Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland: physicochemical and biological characterization. *Endocrinology*, 118: 82-90.
- Gospodarowicz D., Neufeld G. & Schweigerer L.** (1987). Fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Endocrin.*, 46: 187-204.
- Gottlieb E.** (1992). The 3'untranslated region of localized maternal messages contains a conserved motif involved in mRNA localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7164-7168.
- Gross J.L., Herblin W.F., Dusak B.A., Czerniak P., Diamond M.D., Sun T., Eidsvoog K., Dexter D.L. & Yayon A.** (1993). Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 121-131.
- Grosse R. & Langen P.** (1990). Mammary-derived growth inhibitor. *In: Sporn, M.B.; Roberts, A.B., eds. Peptide growth factors and their receptors.* Springer Verlag, Berlin, pp 247-265.
- Guimond S., Maccarana M., Olwin B.B., Lindahl U. & Rapraeger A.C.** (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.
- Halaban R., Ghosh S. & Baird A.** (1987). bFGF is a putative natural growth factor for human melanocytes. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 23: 47-52.
- Halaban R., Kwon B.S., Ghosh S., Delli Bovis P. & Baird A.** (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.*, 3: 177-186.
- Hall J.A., Harris M.A., Malark M., Mansson P.-E., Zhou H. & Harris S.E.** (1990). Characterization of the Hamster DDT-1 cell aFGF / HBGF-I Gene and cDNA and its Modulation by steroids. *J. Cell. Biochem.*, 43: 17-26.

- Hall J.A., Harris M.A., Intres R. & Harris S.E.** (1993). Acidic fibroblast growth factor gene 5' non-coding exon and flanking region from hamster DDT1 cells: identification of the promoter region and transcriptional regulation by testosterone and aFGF protein. *J. Cell. Biochem.*, 51: 116-127.
- Halley C., Alterio J., Brou C., Fayen N., Jacquemin E., Raulais D., Vigny M., Hartman M.P., Laurent M., Jeanny J.C. & Courtois Y.** (1988b). FGF expression and receptors in developing retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29: 241.
- Halley C., Courtois Y. & Laurent M.** (1988a). Nucleotide sequence of acidic fibroblast growth factor cDNA. *Nucleic Acids Res.*, 16: 10913.
- Halperin J.A. & Lobb R.R.** (1987). Effect of heparin-binding growth factors on monovalent cation transport in Balb/C 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144: 115-122.
- Hanneken A., Ying W., Ling N. & Baird A.** (1994). Identification of soluble forms of the fibroblast growth factor receptor in blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9170-9174.
- Haran E.F., Maretzek A.F., Goldberg I., Horowitz A. & Degani H.** (1994). Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res.*, 54: 5511-5514.
- Harper J.W. & Lobb R.R.** (1988). Reductive methylation of lysine residues in acidic growth factor: effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry*, 27: 671-678.
- Hasegawa Y., Takada M., Yamamoto M. & Saitoh Y.** (1994). The gradient of basic fibroblast growth factor concentration in human pancreatic cancer cell invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200: 1435-1439.
- Haslam S.Z. & Nummy K.A.** (1992). The ontogeny and cellular distribution of estrogen receptors in normal mouse mammary gland. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 42: 589-595.
- 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.
- Hauschka P.V., Mavrakos A.E., Iafrati M.D., Doleman S. & Klagsbrun M.** (1986). Growth factors in bone matrix isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.*, 261: 12665-12674.
- Hawker Jr. J.R. & Granger H.J.** (1992). Internalized basic fibroblast growth factor translocates to nuclei of venular endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 262: H1525-H1537.
- Hayek A., Cueller F.L., Beattie G.M., Lopez A.D., Cuevas P. & Baird A.** (1987). An *in vivo* model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147: 876-880.
- Hébert J.M., Basilico C., Goldfarb M., Haub O. & Martin G.R.** (1990). Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and

- characterization of their expression patterns during embryogenesis. *Dev. Biol.*, 138: 454-463.
- Hicks D. & Courtois Y.** (1992). Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation *in vitro*. *J. Neurosci.*, 12: 2022-2033.
- Hicks K., Friedman B.A. & Rich Rosner M.** (1989). Basic and acidic fibroblast growth factors modulate the epidermal growth factor receptor by a protein kinase C-independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 796-803.
- Hondermarck H. & Boilly B.** (1990). Characterization of fibroblast growth factor binding in regenerating limb blastemas of axolotl. European conference on tissue and post-traumatic regeneration. Geneva.
- Hondermarck H., Courty I., Ledoux D., Blanckaert V., Barritaud D. & Boilly B.** (1990). 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 M.C.D. & Boilly B.** (1992). High and low affinity membrane binding sites for fibroblast growth factors in the developing chick brain. *Neuroscience Lett.*, 134: 247-252.
- Hori A., Sasada R., Matsutami E., Naito K., Sakura Y., Fujita T. & Kozai Y.** (1991). Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.*, 51: 6180-6184.
- Hosang M.** (1985). Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. *J. Cell Biochem.*, 29: 265-273.
- Hou J., Kan M., McKeehan K., McBride G., Adams P. & McKeehan W.L.** (1991). Fibroblast growth factor receptors from liver vary in three structural domains. *Science*, 251: 665-668.
- Hou J., McKeehan K., Kan M., Carr S.A., Huddleston M.J., Crabb J.W. & McKeehan W.L.** (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.
- Houdebine L.-M.** (1993). Action des hormones dans le développement de la glande mammaire. *Reproduction humaine et hormones*, volume VI- n° 9, pp 483-494.
- Houssaint E., Blanquet P.R., Champion-Arnaud P., Gesnel M.C., Torriglia A., Courtois Y. & Breathnach R.** (1990). Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8180-8184.
- Huang S.S. & Huang J.S.** (1986). Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 261: 9568-9571.
- Hughes S.E. & Hall P.** (1993). *Laboratory Investigation*, 69: 173-182.
- Imagawa W., Yang J., Guzman R. & Nandi S.** (1994a). Control of mammary gland development. *In* : Knobil E and Neill J D, eds. *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, pp 1033-1063.

- Imagawa W., Cunha G.R., Young P. & Nandi S. (1994b).** Keratinocyte growth factor and acidic fibroblast growth factor are mitogens for primary cultures of mammary epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204: 1165-1169.
- Imamura T., Engleka K., Zhan X., Tokita Y., Forough R., Roeder D., Jackson A., Maier J. A., Hla T. & Maciag T. (1990).** Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science*, 249: 1567-1570.
- Isaacs H.V., Tannahill D. & Slack J.M.W. (1992).** Expression of novel FGF in the *Xenopus* embryo. A new candidate inducing factor for mesoderm formation and anteroposterior specification. *Development*, 114: 711-720.
- Itoh H., Hattorei Y., Sakamoto H., Kishi T., Sasaki H., Yoshida T., Kono 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.
- Izumi T., Shida J.I., Jingushi S., Hotokebuchi T. & Sugioka Y. (1995).** Administration of growth hormone modulates the gene expression of basic fibroblast growth factor in rat costal cartilage, both *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 112: 95-99.
- Jaakkola S., Salmikangas P., Nylund S., Partanen J., Armstrong E., Pyrhonen S., Lehtovirta P. & Nevanlinna H. (1993).** Amplification of fgfr4 in human breast and gynecological cancers. *Int. J. Cancer*, 54: 378-382.
- Jacquemier J., Adelaide J., Parc P., Penault-Llorca F., Planche J., DeLapeyrière O. & Birnbaum D. (1994).** Expression of the FGFR1 gene in human breast-carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 59: 373-378.
- Jacquemin E., Halley C., Alterio J., Laurent M., Courtois Y. & Jeanny J.C. (1990).** Localization of acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA in mouse and bovine retina by *in situ* hybridization. *Neurosci. Lett.*, 116: 23-28.
- Jacquemin E., Jonet L., Oliver L., Bugra K., Laurent M., Courtois Y. & Jeanny J.C. (1993).** Developmental regulation of acidic fibroblast growth factor (aFGF) expression in bovine retina. *Int. J. Dev. Biol.*, 37: 417-423.
- Jakobovits A., Shackelford G.M., Varmus H.E. & Martin G. (1986).** Two proto-oncogenes implicated in mammary carcinogenesis, int-1 and int-2, are independently regulated during mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 78106-78110.
- Jaye M., Howk R., Burgess W., Ricca G.A., Chiu I.M., Ravera M.W., O'Brien S.J., Modi W.S., Maciag T. & Drohan W.N. (1986).** Human endothelial cell growth factor : cloning, nucleotide sequence, and chromosomal localization. *Science*, 233: 541-545.
- Jaye M., Lyall R. M., Mudd R., Schlessinger J. & Sarver N. (1988).** Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J.* 7: 963-969.
- Jaye M., Schlessinger J. & Dionne C.A. (1992).** Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases-molecular analysis and signal transduction. *Biochem. Biophys. Acta*, 1135: 185-199.

- Jeanny J.C., Fayein N., Moenner M., Chevallier B., Barritault D. & Courtois Y.** (1987). Specific fixation of bovine brain and retinal acidic and basic fibroblast growth factors to mouse embryonic eye basement membranes. *Exp. Eye Res.*, 171: 63-75.
- Jiang W.G., Puntis C.A. & Hallett M.B.** (1994). Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis : implications for treatment. *Br. J. Surg.*, 8: 1576-1590.
- Johnson D.E. & Williams L.T.** (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.*, 60: 1-41.
- Johnson D.E., Lu J., Chen H., Werner S. & Williams L.T.** (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.
- Johnston C.L., Cox H.C., Gomm J.J. & Coombes R.C.** (1995). bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement. *Biochem. J.*, 306: 609-616.
- Joshi K., Smith J.A., Perusinghe N. & Monaghan P.** (1986). Cell proliferation in the human mammary epithelium. *Am. J. Pathol.*, 124: 199-206.
- Jouanneau J., Gavrilovic J., Caruelle D., Jaye M., Moens G., Caruelle J.P. & Thiery J.P.** (1991). Secreted or non secreted forms of acidic and basic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2893-2897.
- Kan M., Huang J., Manson P.E., Yasimitsu H., Carr B. & Mc Keehan W.** (1989). Heparin binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7432-7436.
- Kardami E., Spector D., & Strohman R.C.** (1985). Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8044-8047.
- Karey K.P. & Sirbasku D.A.** (1988). Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47-D to growth factors and 17 β -estradiol. *Cancer Res.*, 48: 4083-4092.
- Kawamoto K., Yamaguchi T., Watanabe S. & Uchida K.** (1992). An androgen-dependent subclone derived from a mouse mammary tumor, Shionogi carcinoma 115, secretes a heparin-binding growth factor having an apparent molecular weight of 31000 in response to androgen. *Biochim. Biophys. Acta*, 1134: 183-188.
- Ke Y.Q., Fernig D.G., Smith J.A., Wilkinson M.C., Anandappa S.Y., Rudland P.S. & Barraclough R.** (1990). High-level production of human acidic fibroblast growth factor in *E.coli* cells: inhibition of DNA synthesis in rat mammary fibroblasts at high concentrations of growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171: 963-971.
- Ke Y.Q., Fernig D.G., Wilkinson M.C., Winstanley J.H.R., Smith J.A., Rudland P.S. & 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.

- Keegan K., Johnson D.E., Williams L.T. & Hayman M.J.** (1991). Isolation of an additional member of fibroblast growth factor receptor family, FGF-R3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1095-1099.
- Kidwell W.R.** (1987). Growth Factor production by mammary tumor cells. *In* : Medina D., Kidwell WR., Heppner G., Anderson E., eds. Cellular and molecular biology of mammary cancer. New York, Plenum, pp 239-252.
- Kiefer M.C., Stephans J.-C., Crawford K., Okino K. & Barr P.-J.** (1990). Ligand-affinity cloning and structure of a cell surface heparan sulfate proteoglycan that binds basic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6985.
- Kiefer M.C., Ishihara M., Swiedler S.J., Crawford K., Stephans J.C. & Barr P.J.** (1991). The molecular biology of heparan sulfate fibroblast growth factor receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 638: 167-176.
- Kiefer P., Acland P., Pappin D., Peters G. & Dickson C.** (1994). Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *EMBO J.*, 13: 4126-4136.
- Kimelman D. & Kirschner M.** (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF- β and the identification of an mRNA codon for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell*, 51: 869-877.
- Kimelman D., Abraham J. A., Haaparanta T., Palisi T. M. & Kirschner M.W.** (1988). The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: its role as a natural mesoderm inducer. *Science*, 242: 1053-1056.
- Kishi T., Yoshida T. & Terada M.** (1994). A soluble form of K-sam/FGFR2 protein in the culture medium of human gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202: 1387-1394.
- Kjellen L. & Lindahl U.** (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 443-475.
- Klagsbrun M.** (1989). The Fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog. Growth Factor. Res.*, 1: 207-235.
- Klagsbrun M. & Baird A.** (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell.*, 67: 229-231.
- Klagsbrun M. & Beckoff M.C.** (1980). Purification of cartilage-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, 255 : 10859-10866.
- Klagsbrun M., Sasse J., Sullivan R. & Smith J.A.** (1986). Human tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2448-2452.
- Knabbe C., Lippman M.E., Wakefield L.M., Flanders K.C., Kasid A., Derynck R. & Dickson R.B.** (1987). Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell.*, 48: 417-428.
- Knabbe C., Zugmaier G., Dickson R.B. & Lippman M.E.** (1988). Transforming growth factor β and other growth inhibitory polypeptides in human breast cancer. *Progress in Cancer Research and Therapy*, 35: 234-237.

- Knee R.S., Pitcher S.E. & Murphy P.R.** (1994). Basic fibroblast growth factor sense (FGF) and antisense (*GFG*) RNA transcripts are expressed in unfertilized human oocytes and in differentiated adult tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 577-583.
- Kniss D.A. & Burry R.W.** (1988). Serum and fibroblast growth factor stimulate quiescent astrocytes to re-enter the cell cycle. *Brain Research*, 439: 281-288.
- Knusel B., Michel P.P., Schwaber J.S. & Hefti F.** (1990). Selective and non selective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.*, 10: 558-570.
- Kobrin M., Yamanaka Y., Friess H., Lopez M. & Korc M.** (1993). Aberrant expression of type 1 fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 53: 4741-4744.
- Koch C.A., Anderson D., Moran M.F., Ellis C. & Pawson T.** (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, 252: 668-678.
- Kolata G.** (1987). Oncogenes give breast cancer prognosis. *Science*, 235: 160-161.
- Koos R.D., Banks P.K., Inkster S.E., Yue W. & Brodie A.M.H.** (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.
- Kouhara H., Kasayama S., Saito H., Matsumoto K. & Sato B.** (1991). Expression cDNA cloning of fibroblast growth factor (FGF) receptor in mouse breast cancer cells: a variant form in FGF-responsive transformed cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 31-37.
- Kouhara H., Koga M., Kasayama S., Tanaka A., Kishimoto T. & Sato B.** (1994). Transforming activity of a newly cloned androgen-induced growth factor *Oncogene*, 9: 455-462.
- Kremer N.E., D'Arcangelo G., Thomas S.M., De Marco M., Brugge J.S. & Halegoua S.** (1991). Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of src and ras actions. *J. Cell Biol.*, 115: 808-819.
- Küng W., David F., Langen H., Weyer K.A., Schlaeger E.J., Lahm H.W., 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.
- Kuramoto H.** (1972). Studies of the growth and cytogenic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta Obstet. Gynaecol. Jpn.*, 19: 47-58.
- Kurebayashi J., McLesley S.W., Johnson M.D., Lippman M.E., Dickson R.B. & Kern F.G.** (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.
- Landshman N., Belkin M., Ben-Hanan I., Be-Chaim O., Assia E. & Savion N.** (1987). Regeneration of cat corneal endothelium induced *in vivo* by fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.*, 45:805-811.
- La Rocca R.V., Meyers C.E., Stein C.A., Cooper M.R. & Uhritch M.** (1990). Effect of suramin in patients with refractory modular lymphomas requiring systemic therapy. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 9: 1041-1041.
- Lazkovits L., Torday C., Labourdette G., Pettmann B. & Sensenbrenner M.** (1988). Sodium and potassium uptake in primary cultures of proliferation rat astroglial cells induced by short-term exposure to an astroglial growth factor. *Neurochem. Res.*, 13: 837-848.
- 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 MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 50: 598-603.
- Leung H.Y., Gullick W.J. & Lemoine N.R.** (1994a). Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, 59: 667-675.
- Leung H.Y., Hughes C.M., Klöppel G., Williamson R.C.N. & Lemoine N.R.** (1994b). Localisation of expression of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic adenocarcinoma by *in situ* hybridisation. *Int. J. Oncol.*, 4: 1219-1223.
- Levay-Young B.K., Imagawa W., Wallace D.R. & 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 S. & Shipley G.D.** (1991). Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells in culture. *Cell Growth Different.*, 2: 195-202.
- Li X., Nagayasu H., Hamada J.I., Hosokawa M. & Takeichi N.** (1993). Enhancement of tumorigenicity and invasion capacity of rat mammary adenocarcinoma cells by epidermal growth factor and transforming growth factor- β . *Jpn. Cancer Res.*, 84: 1145-1149.
- Li Y., Basilico C. & Mansukhani A.** (1994). 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 I.U.** (1988). Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res.*, 2: 285-291.
- Lippman M.E. & Dickson R.B.** (1989). Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Progr. Horm. Res.*, 45: 383-440.

- Lippman M.E., Bolan G. & Huff K.** (1976). The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.*, 36: 4595-4601.
- Liscia D.S., Merlo G.R., Garrett C., French D., Mariane-Costantini R. & Callahan R.** (1989). Expression of *int-2* mRNA in human tumors amplified at the *int-2* locus. *Oncogene*, 4: 1219-1224.
- Liscia D.S., Merlo G., Ciardiello F., Kim N., Smith G.H., Callahan R. & Salomon D.** (1990). Transforming growth factor- α messenger RNA localization in the developing adult rat and human mammary gland by *in situ* hybridization. *Developmental Biology*, 140: 123-131.
- Lobb R.R.** (1988a). Clinical applications of heparin-binding growth factor. *European Journal of Clinical Investigation*, 18: 321-336.
- Lobb R.R.** (1988b). Thrombin inactivates acidic fibroblast growth factor but not basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 27: 2572-2578.
- Lobb R.R. & Fett J.W.** (1984). Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry*, 23: 6295-6299.
- Lobb R.R., Alderman E. M. & Fett J. W.** (1985). Induction of angiogenesis by bovine brain derived class 1 heparin binding growth factor. *Biochemistry*, 24: 4969-4973.
- Lobb R.R., Harper J. W. & Fett J. W.** (1986). Purification of heparin-binding growth factors. *Anal. Biochem.*, 154: 1-14.
- Lorenzi M.V., Long J.E., Miki T. & Aaronson S.A.** (1995). Expression cloning, developmental expression and chromosomal localization of fibroblast growth factor-8. *Oncogene*, 10: 2051-2055.
- Luqmani Y.A., Graham M. & Coombes R.C.** (1992). Expression of basic fibroblast growth, FGFR-1 and FGFR-2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer*, 66: 273-280.
- Lykkesfeldt A.E., Larsen J.K. & Cristensen I.J.** (1986). Cell cycle analysis of estrogen stimulation and antiestrogen inhibition of growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res. Treatment*, 7: 83-90.
- Mac Callum J., Bartlett J.M.S., Thompson A.M., Keen J.C., Dixon J.M. & Miller W.R.** (1994). Expression of transforming growth factor beta mRNA isoforms in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 69: 1006-1009.
- MacArthur C., Shankar D.B. & Shackelford G.M.** (1995). FGF-8, activated by proviral insertion, cooperates with the *wnt-1* transgene in murine mammary tumorigenesis. *Journal of Virology*, 69: 2501-2507.
- Machotka S.V., Garrett C.T., Schwartz A.M. & Callahan R.** (1989). Amplification of the proto-oncogenes *int-2*, *c-erb B-2* and *c-myc* in human breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 184: 207-218.
- Maciag T., Mehlman T., Friesel R. & Schreiber A.B.** (1984). Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal mitogen in bovine brain. *Science*, 225: 932-935.

- Magnaldo I., L'Allemain G., Chambard J.-C., Moenner M., Barritauld D. & Pouyssegur J.** (1986). The mitogenic signaling pathway of fibroblast growth factor is not mediated through phosphoinositides hydrolysis and protein kinase C activation in Hamster. *J. Biol. Chem.*, 261: 16916-16922.
- Makris A., Ryan K.J., Yasumizu T., Hill C.L. & Zetter B.R.** (1984). The nonluteal porcine ovary as a source angiogenic activity. *Endocrinology*, 115 : 1672-1677.
- Mali M., Elenius K., Miettinen H.M. & Jalkanen M.** (1993). Inhibition of basic fibroblast growth factor-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1. *J. Biol. Chem.*, 268: 24251-24262.
- Mansour S.L. & Martin G.R.** (1988). Four classes of mRNA are expressed from the mouse in-2 gene, a member of the FGF gene family. *EMBO J.*, 7: 2035-2041.
- Mansson P., Malark M., Sawada H., Kan M. & McKeehan W.L.** (1990). Heparin-binding (fibroblast) growth factors type one and two genes are co-expressed in proliferating normal vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 26: 209-212.
- Mansukhani A., Dell'Era P., Moscatelli D., Kornbluth S., Hanafusa H. & Basilico C.** (1992). Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3305-3309.
- Marcum J.A., Atha D.H., Fritze L.M.S., Nawroth P., Stern D. & Rosenberg R.D.** (1986). Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, 261: 7507-7517.
- Marics I., Adelaide J., Raybaud F., Mattei M.G., Coulier F., Planche J., De Lapeyriere O. & Birnbaum D.** (1989). Characterization of the hst-related FGF6 gene, a new member of the fibroblast growth factor gene family. *Oncogene*, 4: 335-340.
- Marshall C.J.** (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion Genetics Development*, 4: 82-89.
- Mascarelli F., Raulais D., Counis M.F. & Courtois Y.** (1987). Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 478-486.
- Mascarelli F., Fuhrmann G. & Courtois Y.** (1993). aFGF binding to low and high affinity receptors induces both aFGF and aFGF receptors dimerization. *Growth Factors*, 8: 211-233.
- Mason I.J., Fuller-Pace F., Smith R. & Dickson C.** (1994). FGF-7 (Keratinocyte growth factor) expression during mouse development suggests roles in myogenesis, forebrain regionalization and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech. Dev.*, 45: 15-30.
- Mathieu M., Vignon F., Capony F. & Rochefort H.** (1991). Estradiol down-regulates the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor gene and induces cathepsin D in breast cancer cells: a receptor saturation mechanism to increase the secretion of lysosomal proenzymes. *Mol. Endocrinol.*, 5: 815-822.
- Matsuoka H., Nakamura Y., Ueo H., Sugimachi K., Tomoda H., Saito T. & Seo Y.** (1994). Interrelationship between estradiol and Tamoxifen responses for

clinical breast carcinoma cells cultured on contact-sensitive plates. *Jpn. J. Cancer Res.*, 85: 619-625.

Mayer B. & Baltimore D. (1993). *Trends Cell Biol.*, 3: 8-13.

McAndrew J., Fernig D.G., Rudland P.S. & Smith J.A. (1994). Secretion of transforming growth factor alpha and expression of its receptor in human mammary cell lines. *Growth Factors*, 10: 281-287.

McCarty L.P., Karr S.M., Harris B.Z., Michelson S.G. & Leith J.T. (1995). Comparison of basic fibroblast growth factor levels in clone A human colon cancer cells *in vitro* with levels in xenografted tumours. *Br. J. Cancer*, 72: 10-16.

McLeskey S.W., Kurebayashi J., Honig S.F., Zwiebel J., Lippman M.E., Dickson R.B. & Kern F.G. (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.

McLeskey S.W., Ding I.Y.F., Lippman M.E. & Kern F.G. (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.

Mergia A., Eddy R., Abraham J.A., Fiddes J.C. & Shows T.B. (1986). The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 644-651.

Mergia A., Tischer E., Graves D., Tumolo A., Miller J., Gospodarowicz D., Abraham J.A., Shipley G. & Fiddes J.C. (1989). Structural analysis of the gene for human acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 1121-1129.

Meyers S.L. & Dudley J.P. (1992). Sequence analysis of the *int-2/fgf-3* gene in aggressive human breast carcinomas. *Mol. Carcinog.*, 6: 243-251.

Mignatti P., Morimoto T. & Rifkin D.B. (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J. Cell Physiol.*, 151: 81-93.

Miki T., Flemming T.P., Bottaro D.P., Rubin J.S., Ron D. & Aaronson S.A. (1990). *Science*, 251: 72-75.

Miki T., Bottaro D.P., Fleming T.P., Smith C.L., Burgess W.H., Chan A.M.L. & Aaronson S.A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing. Two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 246-250.

Mills G.B., Zhang N., May C., Hill M. & Chung A. (1990). Suramin prevents binding of interleukin 2 to its cell surface receptor: a possible mechanism for immunosuppression. *Cancer Res.*, 50: 3036-3042.

Mira-y-Lopez R., Joseph-Silverstein J., Rifkin D.B. & Ossowski L. (1986). Identification of a pituitary factor responsible for enhancement of plasminogen activator activity in breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7780-7784.

- 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.
- Miyashita S., Hirota M., Yamamoto T., Shiroyama C., Furukawa Y. & Hayashi K.** (1994). Effect of basic fibroblast growth factor on synthesis/secretion of pS2 protein by human breast cancer cells (MCF-7). *Eur. J. Biochem.*, 225: 1041-1046.
- Mizukami Y., Nonomura A., Yamada T., Kurumaya H., Hayashi M., Koyasaki N., Taniya T., Noguchi M., Nakamura S. & Matsubara F.** (1990). Immunohistochemical demonstration of growth factors, TGF- α , TGF- β , IGF-I and *neu* oncogene product in benign and malignant human breast tissues. *Anticancer Res.*, 10: 1115-1126.
- Moenner M., Chevallier B., Badet J. & Barritault D.** (1986). Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor, on bovine epithelial lens cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5024-5028.
- Moenner M., Badet J., Chevallier B., Tardieu M., Courty J. & Barritault D.** (1987). Eye-derived fibroblast growth factor: receptors and early events studies. *In: Angiogenesis: mechanisms and pathology. Current communications in molecular biology.* Eds Rifkin D.B., Klagsbrun M. Cold Spring Harbor, New York, pp 52-57.
- Mohammadi M., Honegger A.M. & Rotin D.** (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C β 1. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 5068-5078.
- Mohammadi M., Dionne C., Li W., Li N., Spivak T., Honegger A.M., Jaye M. & Schlessinger J.** (1992). Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature*, 358: 681-684.
- Monahan S., Salomon D.S. & Kidwell W.R.** (1987). Substratum modulation of epidermal growth factor expression by normal mammary cells. *J. Dairy Sci.*, 71: 1507-1514.
- 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 tumour virus. *EMBO J.*, 5: 919-924.
- Mormède P., Baird A. & Pidgeon P.** (1985). Immunoreactive fibroblast growth factor (FGF) in rat tissues: molecular weight forms and effects of hypophysectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128: 1108-1113.
- Morrison R.S., Giordano S., Yamaguchi F., Hendrickson S., Berger M.S. & Palczewski K.** (1993). Basic fibroblast growth factor expression is required for clonogenic growth of human glioma cells. *J. Neurosciences Res.*, 34: 502-509.
- 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. & Quarto N.** (1989). Transformation of NIH 3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the *hst/K-fgf* oncogene causes down regulation of the fibroblast growth factor receptor: reversal of morphological changes and restoration of receptor number by suramin. *J. Cell Biol.*, 109: 2519-2527.
- Moscatelli D., Presta M., Joseph-Silverstein J. & Rifkin D.B.** (1986). Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J. Cell Physiol.*, 129: 273-276.
- Moscatelli D., Joseph-Silverstein J., Manejias R. & Rifkin D.B.** (1987). Mr 25,000 heparin-binding protein from guinea pig brain is a high molecular weight form of basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5778-5782.
- Motoo Y., Sawabu N., Yamaguchi Y., Terada T. & Nakanuma Y.** (1993). Sinusoidal capillarization of human hepatocellular carcinoma: possible promotion by fibroblast growth factor. *Oncology*, 50: 270-274.
- Mukku V.R. & Stancel G.M.** (1985). Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J. Biol. Chem.*, 260: 9820-9825.
- Mullaney B.P. & Skinner M.K.** (1992). Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology*, 131: 2928-2934.
- Müller G., Behrens J., Nussbaumer U., Böhlen P. & Birchmeier W.** (1987). Inhibition action of transforming growth factor b on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5600-5604.
- Müller R., Bravo R. & Burckhardt J.** (1984). Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*, 312: 716-720.
- Muller W.J., Lee F.S., Dickson C., Peters G., Pattengale P. & Leder P.** (1990). The *int-2* gene product acts as an epithelial growth factor in transgenic mice. *EMBO J.*, 9: 907-913.
- Mummery C.L., van Rooyen M., Bracke M., van den Eijnden-van Raaij J., van Zoelen E.J. & Alitalo K.** (1993). Fibroblast growth factor-mediated growth regulation and receptor expression in embryonal carcinoma and embryonic stem cells and human germ cell tumours. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191: 188-195.
- Munaim S.I., Klagsbrun M. & Toole B.P.** (1988). Developmental changes in fibroblast growth factor in the chicken embryo limb bud. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8091-8093.
- Murdoch A.D., Dodge G.R., Cohen I., Tuan R.S. & Iozzo R.V.** (1992). Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 267: 8544-8557.

- Murphy P.R. & Knee R.S.** (1994). Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol. Endocrinol.*, 8: 852-859.
- Myers C.E., La Rocca R.V., Stein C.A., Cooper M.R., Dawson N., Choyke P., Linehan M. & Uhrich M.** (1990). Treatment of hormonally refractory prostate cancer with suramin. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 9: 133-133.
- Myers R.L. , Payson R.A., Chotani M.A., Deaven L.L. & Chiu I.-M.** (1993). Gene structure and differential expression of acidic fibroblast growth factor mRNA : identification and distribution of four different transcripts. *Oncogene*, 8: 341-349.
- Myoken Y., Kan M. , Chen J. , McKeehan W. L. , Sato G. H. & Sato J. D.** (1993). Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor-1: neutralizing of biological activity and recognition of specific amino-acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197.
- Nader H.B., Dietrich C.P., Buonassisi V. & Colburn P.** (1987). Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3565-3569.
- Neufeld G. & Gospodarowicz D.** (1986). Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J. Biol. Chem.*, 261: 5631-5637.
- Neufeld G., Gospodarowicz D., Dodge L. & Fujii D.** (1987). Heparin modulation of the neurotrophic effects of acidic and basic fibroblast growth factors and nerve growth factor on PC12 cells. *J. Cell. Physiol.*, 131: 131-140.
- Nielsen F.C., Ostergaard L., Nielsen J. & Christiansen J.** (1995). Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature*, 377.
- Nieuwkoop P.D.** (1969). The formation of mesoderm in urodeleon amphibidus. I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux'Arch. EntwMech. Org.*, 162: 341-373.
- Nugent M. & Edelman E.R.** (1992). Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry*, 31: 8876-8883.
- Ogi K.I.** (1967). Determination in the development of the amphibian embryo. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol)*, 33: 239-247.
- Ogi K.I.** (1969). Regulative capacity in the early amphibian embryo. *Res. Bull. Depr. Gen. Ed. Nagoya Univ.*, 13: 31-40.
- Oliver L., Raulais D. & Vigny M.** (1992). Acidic fibroblast growth factor (aFGF) in developing normal and dystrophic (mdx) mouse muscles. Distribution in degenerating and regenerating mdx myofibers. *Growth Factors*, 7: 97-106.
- Olwin B.B. & Hauschka S.D.** (1986). Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. *Biochemistry*, 25: 3487-3492.
- Olwin B.B. & 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.

- Ornitz D.M. & Leder P.** (1992). Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-3. *J. Biol. Chem.*, 267: 16305-16311.
- Ornitz D.M., Yayon A., Flanagan J.G., Svahn C.M., 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., Givol D., Yayon A., Yarden Y. & Lonai P.** (1991). Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors flg and gek. *Development*, 113: 1419-1434.
- Orr-Urtreger A., Bedford M.T., 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 (FGFR2). *Developmental Biology*, 158: 475-486.
- Osborne C.K. & Arteaga C.L.** (1990). Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer: clinical implications. *Breast Cancer Res. Treat.*, 15: 3-11.
- Osborne C.K., Coronado E.B., Kitten L.J., Arteaga C.I., Fuqua S., Ramasharma K., Marshall M. & Li C.H.** (1989). Insulin-like growth factor-II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol. Endocrinology*, 3: 1701-1709.
- Otto D., Frotsher M. & Unsicker K.** (1989). Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection. *J. Neurosci. Res.*, 22: 83-91.
- Owens P.C., Gill P.G., De Young N.J., Weger M.A., Knowles S.E. & Moyse K.J.** (1993). Estrogen and progesterone regulate secretion of insulin-like growth factor binding proteins by human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 193: 467-473.
- Panet R., Amir I. & Atln H.** (1986). Fibroblast growth factor induces a transient net K⁺ influx carried by the bumetanide-sensitive transporter in quiescent Balb/C 3T3 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 859: 117-121.
- Partanen J., Mäkelä T.M., Eerola E., Korkkonen J., Hirvonen H., Claesson-Welsh I. & Alitalo H.** (1991). FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with distinct expression pattern. *EMBO J.*, 10: 1347-1354.
- Paterno G.D., Gillepsie L.L., Dixon M.S., Slack J.M.W. & Heath J.K.** (1989). Mesoderm inducing properties of int-2 and kFGF: two oncogene encoded growth factors related to FGF. *Development*, 106: 79-83.
- Patstone G., Pasquale E.B. & Maher P.A.** (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.
- Payson R.A., Halit Canatan, Chotani M.A., Wang W.-P., Harris S., Meyers R.L. & Chiu I.-M.** (1993). Cloning of two novel forms of acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 21: 489-495.
- Penault-Llorca F., Bertucci F., Adelaide J., Parc P., Coulier F., Jacquemier J., Birnbaum D. & DeLapeyrière O.** (1995). Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 61: 170-176.

- Pesenti E., Sola F., Mongelli N., Grandi M. & Spreafico F.** (1992). Suramin prevents neovascularisation and tumour growth through blocking of basic fibroblast growth factor activity. *Br. J. Cancer*, 66: 367-372.
- Peters G., Brookes S., Smith R., Placzek M. & Dickson C.** (1989). The mouse homolog of the *hst/k-FGF* gene is adjacent to *int-2* and is activated by proviral insertion in some virally induced mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5678-5682.
- Peters K.G., Marie J., Wilson E., Ives H.E., Escobedo J., Rosario M., Mirda D. & Williams L.T.** (1992). Point mutation of FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca^{2+} flux but not mitogenesis. *Nature*, 358: 678-681.
- Pettmann B., Weibel M. & Sensenbrenner M.** (1985). Purification of two astroglial growth factors from bovine brain. *FEBS Lett.*, 189: 102-108.
- Peyrat J.P., Bonnetterre J., Vennin P.H., Jammes H., Beuscart R., Hecquet B., Dijane J., Lefebvre J. & Demaille A.** (1990). Insulin-like growth factor 1 receptors (IGF1-R) and IGF1 in human breast tumors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 37: 823-827.
- Peyrat J.P., Hondermarck H., Louchez M.M. & Boilly B.** (1991). Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer Comm.*, 3: 323-329.
- Peyrat J.P., Bonnetterre J., Hondermarck H., Hecquet B., Adenis A., Louchez M.M., Lefebvre J., Boilly B. & Demaille A.** (1992a). Basic fibroblast growth factor (bFGF): mitogenic activity and binding sites in human breast cancer. *J. Steroid Biochem. Biol.*, 43: 87-94.
- Peyrat J.P., Hondermarck H., Hecquet B., Adenis A. & Bonnetterre J.** (1992b). Basic FGF binding sites in human breast cancer. *Bull. Cancer*, 79: 251-260.
- Philippe J.M., Renaud F., Desset S., Laurent M., Mallet J., Courtois Y. & Edward J.B.** (1992). Cloning of two different 5' untranslated exons of bovine acidic fibroblast growth factor by the single strand ligation to single-stranded cDNA methodology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188: 843-850.
- Pienta K. J., Isaacs W.B., Vindivich D. & Coffey D.S.** (1991). The effects of basic fibroblast growth factor and suramin on cell motility and growth of rat prostate cancer cells. *J. Urol.*, 145: 199-202.
- Pineda-Lucena A., Nunez de Castro I., Lozano R.M., Munoz-Willery I., Zazo M. & Gimenez-Gallego G.** (1994). Effect of low pH and heparin on the structure of acidic fibroblast growth factor. *Eur. J. Biochem.*, 222: 425-431.
- Polakis P. & McCornick F.** (1993). Structural requirements for the interaction of p21^{ras} with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J. Biol. Chem.*, 268: 9157-9160.
- Pollack M. & Richard M.** (1990). Suramin blockade of insulin-like growth factor 1-stimulated proliferation of human osteosarcoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1349-1352.

- Powell P.P. & Klagsbrun M.** (1993). Regulation of basic fibroblast growth factor mRNA expression in rat C6 glioma cells. *Exp. Cell Res.*, 209: 224-230.
- Prats H., Kaghad M., Prats A.C., Klagsbrun M., Lelias J.M., Liauzun P., Chalon P., Tauber J.P., Amalric F., Smith J.A. & Caput D.** (1989). High molecular mass from basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1836-1840.
- Presta M., Moscatelli D., Joseph-Silverstein J. & Rifkin D.B.** (1986). Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 4060-4066.
- Presta M., Foiani M., Rusnati M., Joseph-Silverstein J., Maier J.A. & Ragnotti G.** (1988a). High molecular weight immunoreactive basic fibroblast growth factor-like proteins in rat pituitary and brain. *Neurosci. Lett.*, 90: 308-313.
- Presta M., Rusnati M., Maier J.A. & Ragnotti G.** (1988b). Purification of basic fibroblast growth factor from rat brain: identification of a Mr 22,000 immunoreactive form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155: 1161-1172.
- Quarto N. & Amalric F.** (1994). Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signalling. *J. Cell Sci.*, 107: 3201-3212.
- Quarto N., Talarico D., Sommer A., Florkiewicz R., Basilico C. & Rifkin D.B.** (1989). Transformation by basic fibroblast growth factor requires high levels of expression: comparison with transformation by hst/K-fgf. *Oncogene Res.*, 5: 101-110.
- Quarto N., Finger F.P. & Rifkin D.B.** (1991). The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J. Cell. Physiol.*, 147: 311-318.
- Rao C.D., Pech M., Robbins K.C. & Aaronson S.A.** (1988). The 5' untranslated sequence of the c-sis/Platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 284-292.
- Rapraeger A., Krufka A. & Olwin B.B.** (1991). Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast and myoblast differentiation. *Science*, 252: 1705-1708.
- Rastinejad F., Comboy M.J., Rando T.A. & Blau H.M.** (1993). Tumor suppression by RNA from the 3' untranslated region of α -tropomyosin. *Cell*, 75: 1107-1117.
- Rees S., Constantopoulos G. & Brady R.** (1986). The suramin-treated rat as a model of mucopolysaccharidosis: reversibility of biochemical and morphological changes in the liver. *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.*, 51: 235-245.
- Renaud F., Desset S., Bugra K., Halley C., Philippe J.M., Courtois Y. & Laurent M.** (1992). Heterogeneity of 3' untranslated region of bovine acidic FGF transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 945-952.
- Renaud F., Oliver L., Desset S., Tassin J., Romquin N., Courtois Y. & Laurent M.** (1994). Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival. *J. Cell. Physiol.*, 158: 435-443.

- Renko M., Quarto N., Morimoto T. & Rifkin D.B.** (1991). Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth species. *J. Cell. Physiol.*, 144: 108-114.
- Revillon F., Lassalle B., Vandewalle B. & Lefebvre J.** (1990). Cell kinetics (SAMBA 200) of estradiol stimulated long-term phenol red withdrawn cultured breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 10: 1067-1070.
- Rieck P., Hartmann C., Jacob C., Pouliquen Y. & Courtois Y.** (1992). Human recombinant bFGF stimulates corneal endothelial wound healing in rabbits. *Curr. Eye Res.*, 11: 1161-1172.
- Rieck P., Assouline M., Hartmann C., Pouliquen Y. & Courtois Y.** (1993). Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor (rh-bFGF) on wound healing of the corneal epithelium. *Ophthalmology*, 90: 646-651.
- Rieck P., David T., Hartmann C., Renard G., Courtois Y. & Pouliquen Y.** (1994). Basic fibroblast growth factor modulates corneal wound healing after excimer laser keratomileusis in rabbits. *Ger. J. Ophthalmol.*, 3: 105-111.
- Riegel A.T. & Wellstein A.** (1994). The potential role of the heparin-binding growth factor pleiotrophin in breast cancer. *Breast cancer Res. Treat.*, 31: 309-314.
- Risau W.** (1986). Developing brain produces an angiogenesis factor. *Proc. Natl. Acad. USA*, 83: 3855-3859.
- Risau W. & Eklom P.** (1986). Production of a heparin-binding angiogenic factor by the embryonic kidney. *J. Cell Biol.*, 103: 1101-1107.
- Rizzino A.** (1993). Understanding the roles of growth factors in carcinogenesis: modulation of autocrine growth control by differentiation. *Int. J. Dev. Biol.*, 37: 61-65.
- Rizzino A., Kuszynski C., Ruff E. & Tiesman J.** (1988). Production and utilization of growth factors related to fibroblast growth factor by embryonal carcinoma cells and their differentiated cells. *Developmental Biol.*, 129: 61-71.
- Robinson M.L., Overbeek P.A., Verran D.J., Grizzle W.E., Stockard C.R., Friesel R., Maciag T. & Thompson J.A.** (1995). Extracellular FGF-1 acts as a lens differentiation factor in transgenic mice. *Development*, 121: 505-514.
- Rodeck U., Becker D. & Herlyn M.** (1991). Basic fibroblast growth factor in human melanoma. *Cancer Cells*, 3: 308-311.
- Rogelj S., Weinberg R.A., Fanning P. & Klagsbrun M.** (1988). Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. *Nature*, 331: 173-175.
- Rogelj S., Klagsbrun M., Atzmon R., Kurokawa M., Haimovitz 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.

- Rosengart T.K., Kupferschmid J.P., Ferrans V.J., Casscells W., Maciag T. & Clark R.E.** (1988). Heparin-binding growth factor-I (endothelial cell growth factor) binds to endothelium *in vivo*. *J. Vasc. Surg.*, 7: 311-317.
- Rosa F., Roberts A. B., Danielpret D., Dart L.L., Spron M.B.M. & David I.B.** (1988). Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF β 2-like factors. *Science*, 239: 783-785.
- Rowe J.M., Kasper S., Shine R.P.C. & Friesen H.G.** (1986). Purification and characterization of a human mammary tumor-derived growth factor. *Cancer Res.*, 46: 1408-1412.
- 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 J.S., Osada H., Finch P.W., Taylor W.G., Rudikoff S. & Aaronson S.A.** (1989). Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 802-806.
- Rudland P.S., Platt-Higgins A.M., Wilkinson M.C. & Fernig D.G.** (1993). 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.
- Rustani M., Urbinati C. & Presta M.** (1993). Internalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultured endothelial cells: role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J. Cell Physiol.*, 154: 152-161.
- Ruta M., Howk R., Ricca G., Drohan W., Zabelshanski M., Laureys G., Barton D.E., Francke U., Schlessinger J. & Givold D.** (1988). A novel protein kinase gene whose expression is modulated during endothelial cell differentiation. *Oncogene*, 3: 9-15.
- Ruta M., Burgess W., Givold D., Epstein J., Neiger N., Kaplow J., Crumley G., Dionne C., Jaye M. & Schlessinger J.** (1989). Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the *fms*-like gene (*flg*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8722-8726.
- Rydell R.E. & Greene L.A.** (1987). Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J. Neurosci.*, 7: 3639-3653.
- Sakamoto H., Yoshida T., Nakakuki M., Odagiri H., Miyagawa K., Sugimura T. & Terada M.** (1988). Cloned *hst* gene from normal human leukocyte DNA transforms NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 965-972.
- Saksela O., Moscatelli D. & Rifkin D.B.** (1987). The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor b on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 105: 957-964.

- Saksela O., Moscatelli D., Sommer A. & Rifkin D.B.** (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell. Biol.*, 197: 743-751.
- Sasada R., Kurokawa T., Iwane M. & Igarashi K.** (1988). Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 588-594.
- Satch M., Nakafuka Y. & Kaziro Y.** (1992). *J. Biol. Chem.*, 267: 24149-24152.
- Satoh M., Nakafuka M. & Kaziro Y.** (1992). Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 267: 24149-24152.
- 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: 1545-1556.
- Savagner P., Vallés A.M., Jouanneau J., Yamada K.M. & Thiery J.P.** (1994). Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell*, 5: 851-862.
- Schlessinger J.** (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *TIBS*, 18: 273-275.
- Schmidt M., Sharma H.S., Schott R.J. & Schaper W.** (1991). Amplification and sequencing of mRNA encoding acidic fibroblast growth factor (aFGF) from porcine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 853-859.
- Schnürch H. & Risau W.** (1991). Differentiating and adult neurons express the acidic fibroblast growth factor gene during chick neuronal development. *Development*, 111: 1143-1154.
- Schreiber A.B., Kenney J., Kowalski W.J., Friesel R., Mehlman T. & Maciag T.** (1985). Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: characterization by receptor and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6138-6142.
- Schubert D., Ling N. & Baird A.** (1987). Multiple influences of a heparin growth factor on neuronal development. *J. Cell Biol.*, 104: 635-643.
- Schweigerer L., Neufeld G., Friedman J., Abraham J.A., Fiddes J.C. & Gospodarowicz D.** (1987a). Basic fibroblast growth factor : production and growth stimulation in cultured adrenal cortex cells. *Endocrinology*, 120: 796-800.
- Schweigerer L., Neufeld G., Mergia A., Abraham J.A., Fiddes J.C. & Gospodarowicz D.** (1987b). Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 842-846.

- Seed J. & Hauschka S.D.** (1988). Clonal analysis of vertebrate myogenesis. VIII. Fibroblast growth factor (FGF-)-dependent and FGF independent muscle colony types during chick wing development. *Dev. Biol.*, 128: 40-49.
- Seed J., Olwin B.B. & Hauschka S.D.** (1988). Fibroblast growth factor levels in the whole embryo and limb bud during chick development. *Dev. Biol.*, 128: 50-57.
- Seno M., Sasada R., Iwane M., Sudo K., Kurokawa T., Ito K. & Igarashi K.** (1988). Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 701-708.
- Shaw G. & Kamen R.A.** (1986). Conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation *Cell*, 46: 659-667.
- Shi D.-L., Feige J.-J., Riou J.-F., DeSimone D.W. & Boucaut J.-C.** (1992). Differential expression and regulation of two distinct fibroblast growth factor receptors during early development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Development*, 116: 261-273.
- Shimasaki S., Emoto N., Koba A., Mercado M., Shibata F., Cooksey K., Baird A. & Ling N.** (1988). Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152: 717-723.
- Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J. & Klagsbrun M.** (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 223: 1296-1299.
- Singh R.K., Gutman M., Bucana C.D., Sanchez R., Llansa N. & Fidler I.J.** (1995). Interferons α and β down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4562-4566.
- Slack J.M.W. & Isaacs H.V.** (1989). Presence of basic fibroblast growth factor in the early *Xenopus* embryo. *Development*, 105: 147-153.
- Slack J.M., Darlington B.G., Heath J.K. & Godsave S.F.** (1987). *Nature*, 326: 197-200.
- Smith J., Chander S.K., Baillie R. & Coombes R.C.** (1993). The effect of endocrine therapy on fibroblast growth factor-like activity in nitrosomethylurea-induced rat mammary tumours. *Eur. J. Cancer*, 29(A): 2125-2131.
- Smith J., Yelland A., Baillie R. & Coombes R.C.** (1994). Acidic and basic fibroblast growth factors in human breast tissue. *Eur. J. Cancer*, 30: 496-503.
- Smith R., Peters G. & Dickson C.** (1988). Multiple RNAs expressed from the int-2 gene in mouse embryonal carcinoma cell lines encode a protein with homology to fibroblast growth factors. *EMBO J.*, 7: 1013-1022.
- Sommers A., Brewer M.T., Thompson R.C., Moscatelli D., Presta M. & Rifkin D.B.** (1987). A form of human basic fibroblast growth factor with an extended amino terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144: 543-550.
- Soubrane G., Cohen S.Y., Delayre T., Tassin J., Hartmann M.P., Coscas G.J., Courtois Y. & Jeanny J.C.** (1994). Basic fibroblast growth factor

- experimentally induced choroidal angiogenesis in the minipig. *Curr. Eye Res.*, 13: 183-195.
- Soule H.D. & Mc Grath C.M.** (1986). A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 22: 6-12.
- Soule H.D., Vasquez J., Long A., Albert S. & Brennan M.J.** (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.
- Stachowiak M.K., Moffett J., Joy A., Puchacz E., Florkiewicz R. & Stachowiak E.K.** (1994). Regulation of bFGF gene expression and subcellular distribution of bFGF protein in adrenal medullary cells. *J. Cell Biol.*, 127: 203-223.
- Stan A.C., Nemati M.N., Pietsch T., Walter G.F. & Dietz H.** (1995). *In vivo* inhibition of angiogenesis and growth of the human U-87 malignant tumor by treatment with an antibody against basic fibroblast growth factor. *J. Neurosurg.*, 82: 1044-1052.
- Stark K.L., Mc Mahon J.A. & Mc Mahon A.P.** (1991). FGFR-4, a new member of fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle cell lineages of the mouse. *Development*, 113: 641-651.
- Statuto M., Ennas M.G., Zamboni G., Bonetti F., Pea M., Bernardello F., Pozzi A., Rusnati M., Gualandris A. & Presta M.** (1993). Basic fibroblast growth factor in human pheochromocytoma: a biochemical and immunohistochemical study. *Int. J. Cancer*, 53: 5-10.
- Stein C.A., La Rocca R.V., Thomas R., McAtee N. & Myers L.E.** (1989). Suramin: an anticancer drug with a unique mechanism of action. *J. Clin. Oncol.*, 7: 499-508.
- Stewart A.J., Johnson M.D., May F.E.B. & Westley B.R.** (1990). Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 265: 21172-21178.
- Sternfeld M.D., Hendrickson J.E., Keeble W.W., Rosenbaum J.T., Robertson J.E., Pittelkow M.R. & Shipley G.D.** (1988). Differential expression of mRNA coding for heparin-binding growth factor type 2 in human cells. *J. Cell. Physiol.*, 136: 297-304.
- Stewart A.J., Westley B.R. & May F.E.B.** (1992). Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br. J. Cancer.*, 66: 640-648.
- Stipp C.S., Litwack E.D. & Lander A.D.** (1994). Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulphate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. *J. Cell Biol.*, 124: 149-160.

- Story M.T., Esch F., Shimasaki S., Sasse J., Jacobs S.C. & Lawson R.K.** (1987). Aminoterminal sequence of a large form of basic fibroblast from human benign prostatic hyperplastic tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145: 702-709.
- Story M.T., Livingston B., Baeten L., Swartz S.J., Jacobs S.C., Begun F.P. & Lawson R.K.** (1989). Cultured human prostate-derived fibroblasts produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor. *The Prostate*, 15: 355-365.
- Sutherland R.L., Lee C.L., Felman R.S. & Musgrove E.A.** (1992). Regulation of breast cancer cell cycle progression by growth factors, steroids and steroids antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 41: 315-321.
- Syms A.J., Norris J.S. & Smith R.G.** (1984). Autocrine regulation of growth: I. Glucocorticoid inhibition is overcome by exogenous platelet derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122: 68-74.
- Taira M., Yoshida T., Miyagawa K., Sakamoto H., Terada M. & Sugimura T.** (1987). cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2980-2984.
- Takagi Y., Shrivastav S., Miki T. & Sakaguchi K.** (1994). Molecular cloning and expression of the acidic fibroblast growth factor receptors in a rat parathyroid cell line (PT-r). *J. Biol. Chem.*, 269: 23743-23749.
- 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.
- Takei Y., Kurobe M., Uchida A. & Hayashi K.** (1994). Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in breast cancer. *Clinical Chem.*, 40: 1980-1981.
- 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-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8928-8932.
- Taylor W.R., Greenberg A.H., Turley E.A. & Wright J.A.** (1993). Cell motility, invasion, and malignancy induced by overexpression of K-FGF or bFGF. *Exp. Cell Res.*, 204: 295-301.
- Tcheng M., Oliver L., Courtois Y. & Jeanny J.-C.** (1994). Effects of exogenous FGFs on growth, differentiation, and survival of chick neural retina cells. *Exp. Cell Res.*, 212: 30-35.
- Theillet C., Le Roy X., De Lapieyriere O., Grosgeorges J., Adnane J., Raynaud S.D., 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). FGFR1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chrom. Cancer*, 7: 291-226.

- Thomas D., Groux-Muscatelli B., Raes M.-B., Caruelle J.-P., Stehelin D., Barritault D. & Boilly B.** (1991). Developmental changes of acidic fibroblast growth factor (aFGF) transcription and expression in mouse brain. *Dev. Brain Res.*, 59: 117-122.
- Thomas K.A., Rios-Candelore M. & Fitzpatrick S.** (1984). Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 357-361.
- Thomas K.A., Rios-Candelore M., Gimenez-Gallego G., DiSalvo J., Bennett C., Rodkey J. & Fitzpatrick S.** (1985). Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukine 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6409-6413.
- Thomas K.A., Gimenez-Gallego G., DiSalvo J., Linemeyer D., Kelly L., Menke J., Mellin T. & Busch R.** (1987). Structure and activities of acidic fibroblast factor. *In: Angiogenesis mechanisms and pathobiology. Current communications in molecular biology.* Eds Rifkin D.B., Klagsbrun M. Cold Spring Harbor, New York, pp 9-12.
- Thompson J.A., Anderson K.D., DiPietro J.M., Zwiebel J.A., Zametta A., Anderson W.F. & Maciag T.** (1988). Site-directed neovessel formation *in vivo*. *Science*, 241: 1349-1352.
- Thompson R.W., Wadzinski M.G., Sassa J., Klagsbrun M., Folkman J., Shemin R.J. & D'Amore P.** (1986). Isolation of heparin-binding endothelial cell mitogens from normal human myocardium. *J. Cell. Biol.*, 203: 300A.
- Thornton S. C., Mueller S. N. & Levine E. M.** (1983). Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science*, 222: 623-625.
- Tiesman J., Meyer A., Hines R.N. & Rizzino A.** (1988). Production of growth factors related to fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor by human embryonal carcinoma cells. *In vitro Cell. Develop. Biol.*, 24: 1209-1216.
- Togari A., Baker D., Dickens G. & Guroff G.** (1983). The neurite promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 114: 1189-1193.
- Togari A., Dickens G., Kuzuya H. & Guroff G.** (1985). The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J. Neurosci.*, 5: 307-316.
- Toi M., Hamada Y., Nakamura T., Mukaida H., Suehiro S., Wada T., Toge T., Nimoto M. & Hattori T.** (1989). Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer tissues : relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion. *Int. J. Cancer*, 43: 220-225.
- Tomasetto C., Rio M.-C., Gautier C., Wolf C., Hareuveni M., Chambon P. & Lathe R.** (1990). hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.*, 9: 407-414.
- Tsai P.K., Volkin D.B., Dabora J.M., Thompson K.C., Bruner M.W., Gress J.O., Matuszewska B., Keogan M., Bondi J.V. & Middaugh C.R.** (1993). Formulation design of acidic fibroblast growth factor. *Pharmaceutical Res.*, 10: 649-

- Tsuda T., Hammamori Y., Yamashita T., Fukumoto Y. & Takai Y. (1986).** Involvement of three intracellular messenger systems, protein kinase C, calcium ion and cyclic AMP, in the regulation of c-fos gene. *FEBS Lett.*, 208: 39-42.
- Tsutsumi Y., Naber S.P., Delellis R.A., Wolfe H.J., Marks P.J., McKenzie S.J. & Yin S. (1990).** New oncogene protein and epidermal growth factor receptor are independently expressed in benign and malignant breast tissues. *Human pathology*, 21: 750-757.
- Ueno N., Baird A., Esch F., Shimasaki S., Ling N. & Guillemin R. (1986).** Purification and partial characterization of a mitogenic factor from bovine liver : structural homology with basic fibroblast growth factor. *Regul. Peptides*, 16: 135-145.
- Uhlrich S., Lagente O., Lenfant M. & Courtois Y. (1986).** Effect of heparin on the stimulation of non-vascular cells by human acidic and basic FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137: 1205-1213.
- Ulich T.R., Yi E.S., Cardiff R., Yin S., Bikhazi N., Biltz R., Morris C.F. & Pierce G.F. (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.
- Unsicker K., Reichert-Preibsch H., Schmidt R., Pettmann B., Labourdette G. & Sensenbrenner M. (1987).** Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5459-5463.
- 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.
- Valverius E., Walker-Jones D., Bates S., Stampfer M.R., Clark R., McCornick F., Dickson R.B. & Lippeman M.E. (1989).** Production of and responsiveness of TGF- β in normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 49: 6269-6274.
- Vaucheret H., Vincent Z.M., Kronnenberger J., Caboche M. & Rouze P. (1989).** Molecular cloning and characterisation of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 216: 10-15.
- Vigny M., Ollier-Hartmann M.P., Lavigne M., Fayein N., Jeanny J.C., Laurent M. & Courtois Y. (1988).** Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane-like structures and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor. *J. Cell Physiol.*, 137: 321-328.
- Vlodavsky I., Folkman J., Sullivan R., Friedman R., Ishai-Michaeli R., Sasse J. & Klagsbrun M. (1987).** Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2292-2296.
- Voulgaropoulou F., Myers R.L. & Chiu I.M. (1994).** Alternative splicing of fibroblast growth factor 1 (FGF1) transcripts: A cellular dilemma in determining exon selection and exclusion. *DNA and Cell Biology*, 13: 1001-1009.

- Volk R., Koster M., Poting A., Hartmann L. & Knochel W.** (1989). An antisens transcript from the *Xenopus laevis* bFGF gene coding for an evolutionarily conserved 24 kd protein. *EMBO J.*, 8: 2983-2988.
- Vonderhaar B.K.** (1984). Hormone and growth factors in mammary gland development. *In* : Venezia CM, ed. Control of cell growth and proliferation. Princeton, NJ : Van Nostrand- Reinhold , pp 11-33.
- Wada A., Sakamoto H., Katoh O., Yoshida T., Yokota J., Little P.F., Sugimura T. & Terada M.** (1988). Two homologous oncogenes, HST1 and INT2, are closely located in human genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157: 828-835.
- Wagner J.A. & D'Amore P.** (1986). Neurite outgrowth induced by an endothelial cell mitogen isolated from retina. *J. Cell. Biol.*, 103: 1363-1367.
- Wakana A., Milbrandt J. & Johnson E. Jr.** (1991). Expression of FGF receptor gene in rat development. *Development*, 111: 455-468.
- Walicke P.A.** (1988). Interactions between basic fibroblast growth factor (FGF) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Developmental Neurobiology*, 102: 144-148.
- Wang W.P., Lehtoma K., Varban M.L., Krishnan I. & Chiu I.M.** (1989). Cloning of the gene coding for human class 1 heparin-binding growth factor and its expression in fetal tissues. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2387-2395.
- Wang W.P., Myers R.L. & Chiu I.-M.** (1991). Single primer mediated polymerase chain reaction: Application in cloning of two different 5' untranslated sequences of acidic fibroblast growth factor mRNA. *DNA Cell. Biol.*, 10: 771-777.
- Weich H.A., Iberg N., Klagsbrun M. & Folkman J.** (1990). Expression of acidic and basic fibroblast growth factors in human and bovine vascular smooth muscle cells. *Growth Factors*, 2: 313-320.
- Weidner N., Semple J.P., Welch W.R. & Folkman J.** (1991). Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. Med.*, 324: 1-8.
- Weiner H. & Swain J.L.** (1989). Acidic fibroblast growth factor mRNA is expressed by cardiac myocytes in cultures and the protein is localized to the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2683-2687.
- Wellstein A., Fang W., Khatri A., Lu Y., Swain S.S., Dickson R.B., Sasse J., Riegel A.T. & Lippman M.E.** (1992). A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. *J. Biol. Chem.*, 267: 2582-2587.
- Welsh J.** (1994). Induction of apoptosis in breast cancer cells in response to vitamin D and antiestrogens. *Biochem. Cell Biol.*, 72: 537-545.
- Werner S., Duan D.S., De Vries C., Peters K., Johnson D.E. & Williams L.** (1992). Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand binding specificities. *Mol. Cell Biol.*, 12: 82-88.

- Wilkinson D.G., Peters G., Dickson C. & McMahon A.** (1988). Expression of the FGF-related protooncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO J.*, 7: 691-695.
- Wilkinson D.G., Bhatt S. & McMahon A.P.** (1989). Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene int-2 suggests multiple roles in fetal development. *Development*, 105: 131-136.
- Williams E.J., Furness J., Walsh F.S. & Doherty P.** (1994). Characterization of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development*, 120: 1685-1693.
- Winkles J.A. & Gay C.G.** (1991). Serum, phorbol ester, and polypeptide mitogens increase class 1 and 2 heparin-binding (acidic and basic fibroblast) growth factor gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Cell Growth Differentiation*, 2: 531-540.
- Winkles J.A., Friesel R., Burgess W.H., Howk R., Mehlman T., Weinstein R. & Maciag T.** (1987). Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7124-7128.
- Wosikowski K., Küng W., Hasmann M., Löser R. & Eppenberger U.** (1993). Inhibition of growth-factor-activated proliferation by anti-estrogens and effects on early gene expression of MCF7-cells. *Int. J. Cancer*, 53: 290-297.
- Yamaguchi F., Saya H., Bruner J.M. & Morrison R.S.** (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.
- Yamaguchi T., Kawamoto K., Uchida N., Uchida K. & Watanabe S.** (1992). Three cell lines showing androgen-dependent, independent and suppressed phenotypes, established from a single tumor of androgen dependent shionogi carcinoma 115. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A: 245-254.
- Yamamoto N., Matsutani S., Yoshitake Y. & Nishikawa K.** (1991). Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Histochemistry*, 96: 479-485.
- Yamamoto T., Komura H., Morishige K.I., Tadokoro C., Sakata M., Kurachi H. & Miyake A.** (1994). Involvement of autocrine mechanism of transforming growth factor- β in the functional differentiation of pregnant mouse mammary gland. *European Journal of Endocrinology*, 130: 302-307.
- Yan G.C., Wang F., Fukabori Y., Sussman D., Hou J.Z. & McKeehan W.L.** (1992). Expression and transforming activity of a variant of the heparin-binding fibroblast growth factor receptor (flg) gene resulting from splicing of the alpha exon at an alternate 3'-acceptor site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183: 423-430.
- Yan G.C., Fukabori Y., McBride G., Nikolaropoulos S. & McKeehan W.L.** (1993). Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF) -FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 4513-4522.

- Yayon A. & Klagsbrun M.** (1990). Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: reversal by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5346-5350.
- Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Leder P. & Ornitz D.M.** (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 conserved variable region confers ligand specificity on FGF receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J.*, 11: 1885-1890.
- Yazaki N., Fujita H., Ohta M., Kawasaki T. & Itoh N.** (1993). The structure and expression of the FGF receptor-1 messenger RNA isoforms in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 1172: 37-42.
- Yee D., Paik S., Lebovic G., Marcus R.R., Favoni R.E., Cullen K.J., Lippman M.E. & Rosen N.** (1989). Analysis of Insulin-like growth factor-I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast. *Mol. Endocrinol.*, 3: 509-517.
- Yee D., Jackson J.G., Kozelsky T.W. & Figueroa J.A.** (1994). Insulin-like growth factor binding protein 1 expression inhibits insulin-like growth factor I action in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth Different.*, 5: 73-77.
- Yoshida M.C., Miyagawa K., Odagiri H., Sakamoto H., Little P.F.R., Terada M. & Sugimura T.** (1987). Genomic sequence of *hst*, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the *int-2* encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7305-7309.
- Yoshida M.C., Wada M., Satoh H., Yoshida T., Sakamoto H., Miyagawa K., Yokota J., Koda T., Kakinuma M. & Sugimura T.** (1988). Human HST1 (HSTF1) gene maps to chromosome band 11 q 13 and coamplifies with the *INT-2* gene in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4861-4864.
- Yoshida T., Miyagawa K., Sakamoto H., Katoh O., Sugimura T. & Terada M.** (1989). HST1 oncogene encoding an FGF-related growth factor: its product, expression, clustering and amplification with *int-2*. *J. Cell Biochem.*, (Suppl. 13b), 3.
- Zajchowski D., Band V., Pauzie N., Tager A., Stampfer M. & Sager R.** (1988). Expression of growth factors and oncogenes in normal and tumor-derived human mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 48: 7041-7047.
- Zeytin F.M., Rusk S.F., Baird A., Raymond V., Leff S.E. & Mandell A.J.** (1988). Induction of *c-fos*, calcitonin gene expression and acidic FG production in a multipolypeptide secreting neuroendocrine cell line. *Endocrinology*, 122: 1114-1120.
- Zhan X., Bates B., Hu X.G. & Goldfarb M.** (1988). The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol. Cell Biol.*, 8: 3487-3495.
- Zhang G., Sato J.D., Herley M.T., Tsang M. W.-K., Ye H., Liu H., Ichimura T., Yan G., McKeehan W.L. & Stevens J.L.** (1994). Stable and temperature-sensitive transformation of rat kidney epithelial cells suppresses expression of

acidic fibroblast growth factor 1 but activates secretion of fibroblast 3 (*int-2*) and vascular endothelial growth factor. *Cell Growth & Differ.*, 5: 349-357.

Zhao X.-M., Frist W.H., Yeoh T.-K. & Miller G.G. (1994). Modification of alternative messenger RNA splicing of fibroblast growth factor receptors in human cardiac allografts during rejection. *J. Clin. Invest.*, 94: 992-1003.

Zhu X.T., Komiya H., Chirino A., Faham S., Fox G.M., Arakawa T., Hsu B. & Rees D.C. (1991). Tridimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*, 251: 90-93.

Zhu X.T., Hsu B.T. & Rees D.C. (1993). Structural studies of the binding of the anti-ulcer drug sucrose octasulfate to acidic fibroblast growth factor. *Structure*, 1: 27-34.

Zimring M.B., Brandi M.L., de Grange D.A., Marx S.J., Streeten E., Katsumata N., Murphy P.R., Sato Y., Friesen H.G. & Aurbach G.D. (1990). Circulating fibroblast growth factor-like substance in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 149-154.

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 domain-3 define receptor specificity. *J. Biol. Chem.*, 268: 7899-7903.

Zugmaier G., Ennis B.W., Deschauer B., Katz D., Knabbe C., Wilding G., Daly P., Lippman M.E. & Dickson R.B. (1989). Transforming growth factors type b2 and b1 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 141: 353-361.