UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ANNEE 1997 NUMERO D'ORDRE : 2088

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

présentée par :

VALERIE LAMBRECHT

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. LILLE
BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE

REGULATION DES SITES DE FIXATION DU FGF-2 DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES NORMALES ET CANCEREUSES PAR DES INHIBITEURS DE PROLIFERATION

Soutenue le 26 septembre 1997 devant le jury composé de :

Directeur du travail :	Monsieur le Professeur B. BOILLY
Rapporteurs :	Monsieur le Professeur J-P. PUJOL
	Monsieur le Docteur D. FERNIG
Examinateurs :	Monsieur le Professeur H. HONDERMARCK
	Monsieur le Docteur J-P. PEYRAT
	Madame le Docteur X. DONG-LE BOURHIS

A la mémoire de mes grands-parents
A mes grands-parents
A mes parents

En témoignage de toute mon affection et en remerciement de leur soutien tout au long de mes études.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans l'"Unité de dynamique des cellules embryonnaires et cancéreuses", du centre de biologie cellulaire de l'Université des Sciences et Technologies de LILLE, dirigée par Monsieur le Professeur B. BOILLY.

J'exprime tout d'abord ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur B. BOILLY, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je vous remercie vivement pour votre soutien au cours de ce travail de thèse et pour la confiance que vous m'avez témoignée durant ces quatre années.

Je voudrais également adresser un grand merci au Docteur X. DONG-LE BOURHIS pour son aide constante, sa compétence, ses conseils et sa très grande disponibilité. Sois assurée Xue, de toute mon amitié.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail :

- Monsieur le Professeur J-P. PUJOL et Monsieur le Docteur D. FERNIG pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse

- Monsieur le Docteur J-P. PEYRAT pour avoir accepté d'examiner ce travail

- Je remercie vivement le Professeur H. HONDERMARCK pour son aide et ses précieux conseils en matière de protéoglycanes ainsi que pour avoir accepté avec enthousiasme d'examiner ce travail

Je n'oublie pas de remercier les membres du laboratoire qui m'ont aidée matériellement ou moralement tout au long de ce travail :

- Le Docteur M. Berthout pour ses compétences en microscopie électronique.

- Le Docteur E. Lheureux et Sylviane pour leur extrême sympathie mais également pour leur talent de pâtissier. Vos bons gâteaux m'ont toujours redonné du tonus pour achever des fins de journées quelquefois difficiles.

- Toute l'"équipe" du Professeur J-J. Curgy pour leur bonne humeur et les éclats de rire.

- Toutes les personnes du bâtiment SN3 qui, un jour ou l'autre, m'ont apporté leurs conseils avec beaucoup de gentillesse.

Je ne saurais oublier lors de ces années de recherche tous les membres de ma famille et mes proches qui m'ont encouragée ainsi que mon chat Piccolo qui a su faire preuve parfois de beaucoup de patience avant d'obtenir des câlins.

Enfin, Philippe, je tiens à te remercier du plus profond de mon coeur pour ta tendresse et ton amour qui ont accompagné l'achèvement de ce travail de thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 13

I) Développement de la glande mammaire 13

A) Morphogénèse de la glande mammaire 13

B) Interactions épithélium-mésenchyme 15

C) Rôle des hormones dans le développement de la glande mammaire 17

D) Facteurs de croissance impliqués dans le développement de la glande mammaire 19

1°) Facteurs de croissance stimulateurs de la croissance mammaire 19

2°) Facteurs de croissance inhibiteurs de la croissance mammaire 22

II) Autonomie des cellules cancéreuses mammaires 24

III) FGF et cancérogenèse mammaire 26

A) Expression du FGF dans les tumeurs mammaires 26

B) Effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires 27

C) Sites de liaison du FGF-2 et cellules épithéliales cancéreuses mammaires 28

IV) Démarche expérimentale 28

V) Propriétés structurales et activités biologiques du FGF-2 30

A) Structure protéique et isoformes du FGF-2 32

B) Distributions tissulaires et cellulaires 35

C) Récepteurs du FGF-2 à activité tyrosine kinase (FGFR) 36

1°) Structure protéique des FGFR 36

2°) Isoformes des FGFR 38

3°) Spécificité des FGFR vis à vis des FGF 41

D) Sites de fixation de basse affinité du FGF-2 : Les protéoglycanes de type héparane sulfate 42

1°) Structure des HSPG 42

2°) HSPG fixant le FGF-2 45

3°) Finalité de la liaison HSPG-FGF-2 45

E) Régulation des sites de liaison du FGF-2 48

1°) Les FGFR 48

2°) Les HSPG 49

F) Devenir du ligand et transduction du signal 50

G) Le FGF-2, facteur de croissance multifonctionnel 52

1°) La prolifération et la différenciation cellulaires 52

2°) Le développement embryonnaire 53

3°) Cicatrisation et régénération tissulaire 54

4°) L'angiogénèse 54

5°) La cancérogenèse 55

VI) Propriétés et activités biologiques d'inhibiteurs de la prolifération 58

A) Le TGFß1 58

1°) Structure du TGFß 60

2°) Activation du TGFß 62

3°) Récepteurs (TGFßR) et protéines fixant le TGFß 63

4°) Transduction du signal 66

5°) Effets biologiques du TGFß1 67

a) Le TGFß1, facteur de croissance multifonctionnel 67

b) TGFß1 et cancérogenèse mammaire 69

B) Le NaB 73

1°) Effets et mécanismes d'action du NaB sur les cellules tumorales en culture 73

2°) Effets du NaB sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires 75

C) Le RA 76

1°) Structure des principaux rétinoïdes naturels 77

2°) Mécanismes d'action de l'acide rétinoïque 77

a) Les CRABPs 77

b) Les récepteurs de l'acide rétinoïque tout trans 79

c) Eléments de réponse aux rétinoïdes (RARE et RXRE) 81

d) Autres mécanismes d'action 82

3°) Effets du RA sur la prolifération et la différenciation cellulaires 82

CHAPITRE 1 : Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammmaires. 86

I) Introduction 86

II) Matériels et méthodes 87

A) Matériels 87

1°) Cellules épithéliales mammaires 87

a) Lignées cellulaires de cancer du sein 87

b) Cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) 88

2°) Facteurs utilisés 88

B) Milieux de culture et conditions d'entretien des cellules mammaires 89

1°) Culture des lignées cellulaires de cancer du sein 89

2°) Obtention et conditions de culture des CEMN 89

C) Evaluation de la prolifération cellulaire 91

1°) Incorporation de thymidine tritiée 91

2°) Comptages cellulaires 92

D) Appréciation de la différenciation cellulaire 92

1°) Analyse ultrastructurale par microscopie électronique à transmission 93

2°) Détection de l'α-lactalbumine par immunocytochimie (ICC) 93

3°) Détection de l'α-lactalbumine et de l'épisialine (EMA) par test ELISA 94

a) Préparation des protéines cellulaires 94

b) Test ELISA 94

III) Résultats 95

A) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires 98

1°) Effet du TGFß1 sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires 98

2°) Effet du NaB sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires 103

3°) Effet du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires 104

B) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la différenciation des cellules épithéliales mammaires 104

1°) Effets au niveau ultrastructural 104

a) Les CEMN 104

b) Les cellules MDA-MB-231 105

c) Les cellules MCF-7 105

2°) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la production d'épisialine et d'α-lactalbumine des cellules mammaires 108

a) Production de l'épisialine (EMA) 108

b) Détection de l'α-lactalbumine par ICC 110

c) Production de l'α-lactalbumine 110

IV) Discussion 113

A) Effets du TGFß1 sur les cellules épithéliales mammaires 113

B) Effets du NaB sur les cellules épithéliales mammaires 117

C) Effets du RA sur les cellules épithéliales mammaires 120

CHAPITRE 2 : Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires. 123

I) Introduction 123

II) Matériels et méthodes 125

A) Conditions de culture 125

B) Mesure de l'activité uPA et de la quantité de PAI-1 125

1°) Mesure de l'activité uPA 126

2°) Mesure de la quantité de PAI-1 126

C) Observation du détachement des cellules de leur support de culture 127

III) Résultats 128

A) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires 128

B) Effets du TGFß1 et du NaB sur la production de PAI-1 130

C) Effets du TGFß1 et du NaB sur le détachement cellulaire 130

IV) Discussion 134

A) Activités uPA et niveaux de PAI-1 des cellules épithéliales mammaires 135

B) Effets du TGFß1 sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires 136

C) Effets du NaB sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires 140

D) Effets du RA sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires 141

CHAPITRE 3 : Etude des sites de haute affinité pour le FGF-2 des cellules épithéliales mammaires traitées au TGFß1, au NaB et au RA. 142

I) Introduction 142

II) Matériels et méthodes 143

A) Conditions de culture 143

B) Marquage du FGF-2 par l'iode 125 143

C) Liaison du ^{125}IFGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires en culture 144

D) Dosages radiorécepteurs par saturation 145

III) Résultats 146

A) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la liaison du ^{125}IFGF-2 des cellules épithéliales mammaires 146

B) Etude par saturation de la fixation du ^{125}IFGF-2 sur les sites de haute affinité des cellules mammaires en culture 146

IV) Discussion 150

CHAPITRE 4 : Régulation de la production de protéoglycanes sulfatés des cellules épithéliales mammaires sous l'influence du TGFß1, du NaB et du RA. 156

I) Introduction 156

II) Matériels et méthodes 157

A) Conditions de culture 158

B) Isolement des PG des cellules épithéliales mammaires 158

C) Liaison des protéoglycanes aux membranes cationiques 159

III) Résultats 160

A) Incorporation de [^{35}S] sulfate des cellules épithéliales mammaires 160

1°) Synthèse de PG 160

2°) Synthèse de HSPG et de CSPG 160

B) Régulation de l'incorporation de [^{35}S] sulfate dans les PG des cellules épithéliales mammaires traitées au TGFß1, au NaB ou RA 164

1°) Régulation de la synthèse de PG 164

2°) Régulation de la synthèse d'HSPG et de CSPG 166

a) PG des cellules epithéliales mammaires traitées par le TGFß1 166

b) PG des cellules épithéliales mammaires traitées au NaB 167

c) PG des cellules épithéliales mammaires traitées au RA 168

IV) Discussion 169

A) Biosynthèse de PG sulfatés par les cellules épithéliales mammaires 169

B) Régulation de la biosynthèse des PG sulfatés par les cellules épithéliales mammaires 171

1°) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la synthèse des PG 172

2°) Synthèse des PG et prolifération cellulaire 174

a) Le TGFß1 et le NaB inhibent la prolifération cellulaire tout en modifiant la synthèse de PG 174

b) Le RA inhibe la prolifération cellulaire sans modifier la synthèse de PG 176

3°) Synthèse de PG et activité uPA 177

CHAPITRE 5 : Effets d'une augmentation exogène de polysaccharides sulfatés sur les cellules épithéliales mammaires. 178

I) Introduction 178

II) Matériels et méthodes 180

A) Matériels 180

B) Conditions de culture 180

C) Evaluation de la prolifération cellulaire 180

D) Mesure de l'activité uPA et de la quantité de PAI-1 181

E) Liaison du ^{125}IFGF-2 en présence de carraghénanes et d'héparine 181

1°) Marquage du FGF-2 par l'iode 125 181

2°) Liaison du ^{125}I FGF-2 181

III) Résultats 182

A) Effets des carraghénanes ι, κ et λ sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires 182

B) Effets des carraghénanes ι sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires 184

C) Liaison du ^{125}I FGF-2 aux cellules épithéliales mammaires en présence de carraghénanes et d'héparine 184

IV) Discussion 187

A) Régulation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires par les carraghénanes 187

B) Régulation du système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires par les carraghénanes ι 189

CONCLUSION GENERALE 192

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 200

ABREVIATIONS 250

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

I) Développement de la glande mammaire

A) Morphogénèse de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire est très lent ; ébauché pendant la vie foetale, il ne s'achève qu'à la première lactation (figures 1 et 2). C'est au cours de la quatrième semaine de la vie foetale que débute la morphogénèse mammaire sous la forme d'un épaississement de l'ectoderme, la crête mammaire ou ligne lactéale (figure 1). Des bourgeons mammaires primitifs apparaissent par paires symétriques le long de cette crête, leur nombre et leur situation dépendant de l'espèce. Chez l'être humain, la crête mammaire disparaît à six semaines et seuls subsistent les deux bourgeons pectoraux. Au cinquième mois, les bourgeons mammaires émettent quinze à vingt prolongements cylindriques pleins dans le mésoderme sous-jacent puis ces prolongements se ramifient et se dilatent à leur extrémité. Vers le septième-huitième mois, ils se creusent d'une lumière formant les futurs canaux galactophores. Ceux-ci s'ouvrent au fond d'une petite dépression située à l'emplacement du futur mamelon. A la naissance, la glande est donc réduite à un court système de tubules. De la naissance à la puberté (figure 2), les modifications morphologiques et histologiques sont modestes : il existe une légère augmentation de la ramification des canaux galactophores et une tendance à la lobulation par le développement du tissu conjonctif. A la puberté, bien que des modifications morphologiques soient importantes, elles ne sont dues avant tout qu'à une augmentation du tissu adipeux. Le développement des canaux galactophores et des acini reste modéré, les lobules ne se formant qu'après la première ovulation.

Au cours de la gestation, le sein présente des modifications importantes caractérisées par une extension des canaux galactophores et une différenciation des acini glandulaires. La glande mammaire n'achève son développement qu'après la première lactation époque à laquelle les acini sont parfaitement différenciés et capables de sécréter le lait.

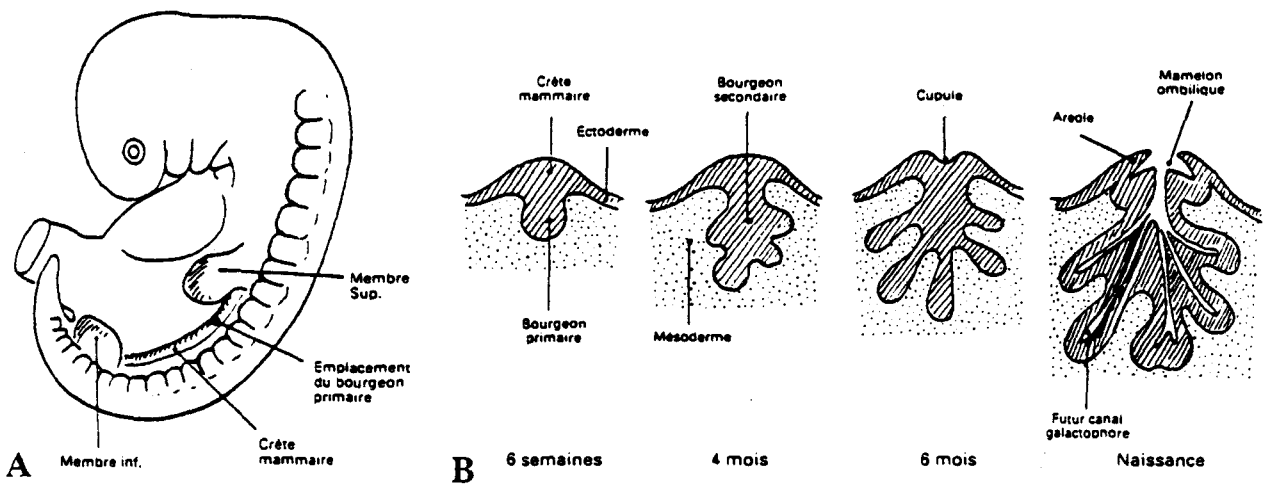


Figure 1 : **A.** Crête mammaire chez un embryon humain de 7-8 mm, 31-32 jours.
B. Développement prénatal du sein. A la naissance, il n'existe qu'une ébauche glandulaire qui restera telle quelle chez le garçon.
D'après Espié et Gorins, 1995.

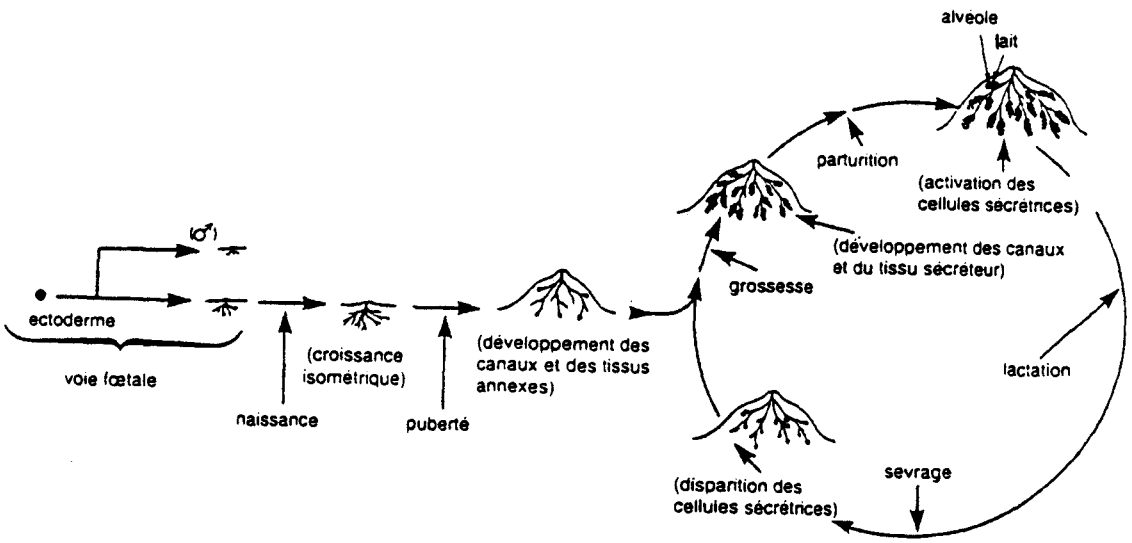


Figure 2 : Schéma général de l'évolution de la glande mammaire depuis l'embryon jusqu'à la fin de la première lactation.
Le cycle mammogenèse-lactogenèse-galactopoïèse se reproduit à chaque lactation.
D'après Martinet et Houdebine, 1993.

La glande mammaire est composée de quatre types cellulaires différents (figure 3) : 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 essentielle 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 les composants du mésenchyme (ou stroma).

B) Interactions épithélium-mésenchyme

Les cellules épithéliales de la glande mammaire passent donc par trois phases importantes au cours du développement : la prolifération, la migration et enfin la différenciation. Les deux premières phases qui caractérisent aussi la cancérogénèse mammaire sont sous la dépendance de signaux inducteurs provenant du mésenchyme qui contrôle notamment le caractère mammaire des ramifications des cordons épithéliaux. La spécificité du mésenchyme est donnée par les adipocytes qui contribuent à la prolifération et à l'organisation des cellules épithéliales et augmentent la vascularisation de la glande mammaire (revue dans 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, tels que les acides gras poly-insaturés et leurs dérivés, les prostaglandines.

Les fibroblastes mammaires qui se trouvent à proximité des cellules épithéliales jouent tout comme les adipocytes un rôle essentiel dans la formation et la différenciation du tissu épithélial. Ils sécrètent du collagène I permettant aux cellules épithéliales de se polariser et de synthétiser une matrice extracellulaire qui favorise leur différenciation. En outre, aux points de contact fibroblastes-cellules épithéliales se dépose de la laminine synthétisée par les cellules épithéliales ; seules les cellules épithéliales en contact de la laminine ont un haut niveau de cytokératine et sont capables de synthétiser des caséines sous l'influence des hormones lactogènes.

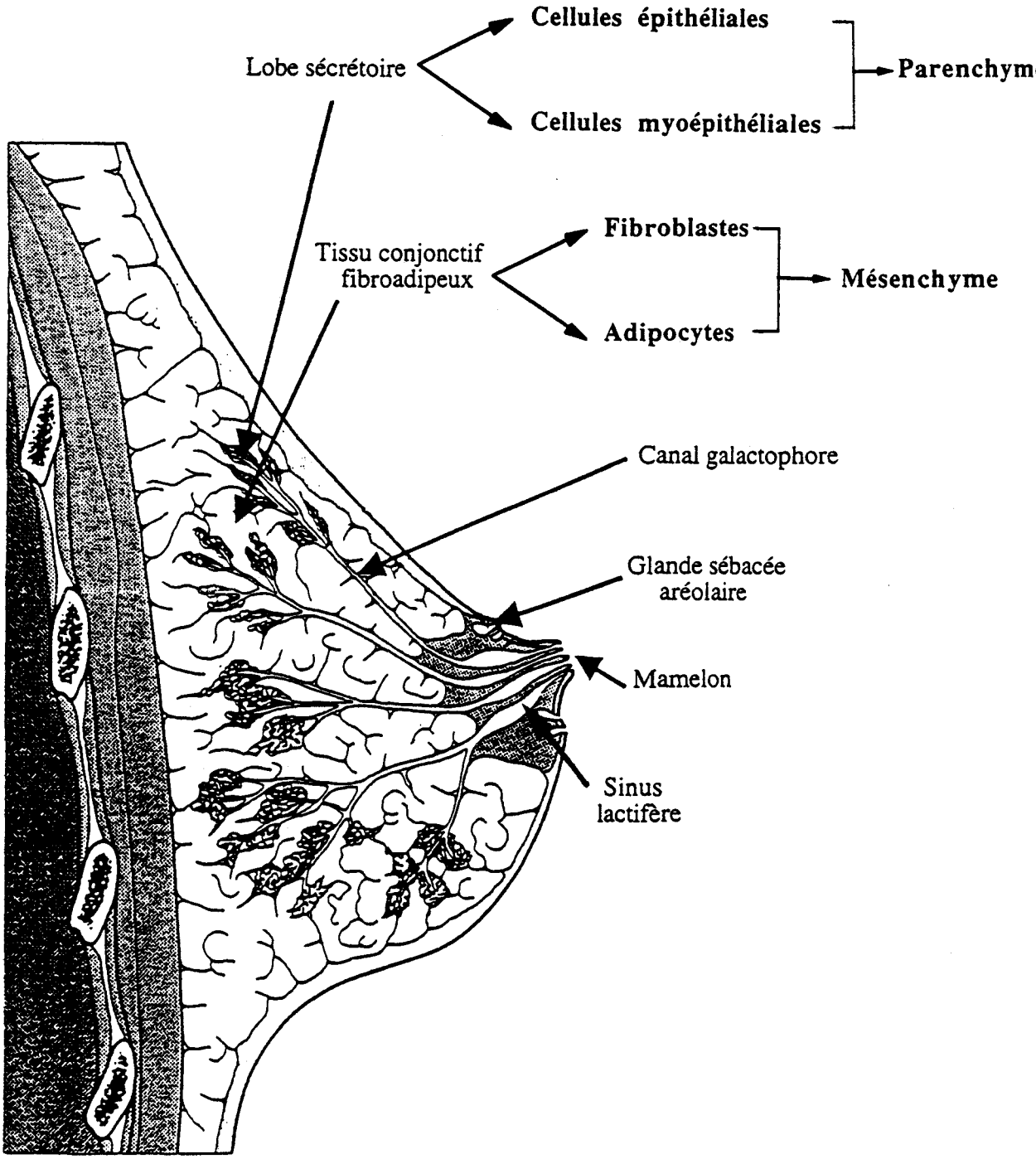


Figure 3 : Structure de la glande mammaire.
D'après Burkitt et al., 1995.

La genèse de la glande mammaire résulte donc d'une série d'interactions très complexes entre les différents types de cellules qui la composent. Par ailleurs, l'assemblage des différentes cellules d'un tissu pour former un organe est en grande partie assuré par la matrice extracellulaire. Cette matrice est un ensemble complexe de molécules synthétisées par les cellules elles-mêmes. Ces molécules, insolubles ou peu solubles, sont assemblées en réseau et forment un gel directement en contact avec les membranes des cellules qui contiennent des récepteurs spécifiques pour les différents éléments de cette matrice. Ces principaux constituants sont les collagènes, la laminine, la fibronectine, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes. Dans la glande mammaire, la matrice extracellulaire intervient non seulement dans son organisation structurale mais également dans le mécanisme de transduction du signal prolactine aux gènes des protéines du lait.

C) Rôle des hormones dans le développement de la glande mammaire

Contrairement à la plupart des organes, la plus grande partie du développement de la glande mammaire se déroule pendant la période post-embryonnaire et chaque stade important du développement mammaire correspond à de grandes modifications hormonales (puberté, gestation, lactation). Parmi ces hormones interviennent les hormones ovariennes (oestrogène et progestérone), les hormones hypophysaires (prolactine, hormone de croissance) et les hormones placentaires (hormone placentaire lactogène).

Les oestrogènes qui se maintiennent à un taux élevé pendant la gestation sont un des signaux essentiels qui déclenchent la croissance de la glande mammaire. Cependant, il est clair que les oestrogènes eux-mêmes ne sont pas de véritables agents mitogènes pour les cellules épithéliales mammaires normales (Edery et al., 1984 ; Gabelman et Emerman, 1992). Tout semble indiquer en effet qu'ils agissent par l'intermédiaire de mécanismes multiples plus ou moins indépendants et indirects. Les oestrogènes *in vivo* stimulent la sécrétion de prolactine, puissant facteur de croissance vis à vis de la glande mammaire. La progestérone en synergie avec d'autres facteurs et en particulier la prolactine augmente la croissance des cellules

épithéliales. Ainsi, les oestrogènes en induisant l'accumulation des récepteurs de la progestérone des cellules épithéliales pourraient favoriser leur multiplication (Edery et al., 1984 ; Haslam, 1987). Toutefois, la progestérone n'est pas un agent mitogène très puissant vis a vis de la glande mammaire ; son effet s'exerce surtout sur les cellules d'animaux vierges et moins nettement sur les cellules d'animaux en gestation. Par ailleurs, il existe une corrélation négative entre le taux de progestérone circulant et le niveau de synthèse des protéines du lait. La progestérone apparaît donc comme une hormone favorisant la croissance mammaire tout en freinant la biosynthèse des protéines du lait. Une des actions *in vivo* des oestrogènes sur la croissance de la glande mammaire pourrait par conséquent s'exercer via la prolactine. Bien que cette hormone induise une croissance mammaire indiscutable *in vivo*, elle se révèle peu active sur la multiplication des cellules épithéliales mammaires *in vitro* (Edery et al., 1984 ; Martel et Houdebine, 1982). Ces observations ont fait supposer que la prolactine exerce ses effets par l'intermédiaire d'un facteur synthétisé par le foie : la synlactine (Mick et Nicoll, 1985). La nature et la fonction de ce facteur n'ont toutefois pas été complètement élucidées. Outre ses effets mitogènes, la prolactine est également un facteur indispensable à la lactogénèse ; elle induit la synthèse et la sécrétion des macromolécules composant le lait.

Une autre hormone lactogène, mais sécrétée par le placenta, intervient également dans le développement de la glande mammaire : l'hormone placentaire lactogène. Cette hormone présente des homologies de séquence avec la prolactine et l'hormone de croissance et possède une double activité biologique de type prolactinique et de type hormone de croissance. Cependant, puisque l'hormone placentaire lactogène n'est sécrétée que pendant la gestation, son rôle sur la croissance et la différenciation de la glande mammaire ne peut s'exercer que durant cette période.

A ces hormones dont le profil de sécrétion est spécifique de la gestation et/ou de la lactation, s'ajoutent des hormones moins spécifiques qui jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammaires telles que les hormones surrénaliennes, les hormones thyroïdiennes, l'hormone de croissance et l'insuline.

D) Facteurs de croissance impliqués dans le développement de la glande mammaire

A côté de ces signaux hormonaux, il existe d'autres facteurs diffusibles représentés par les facteurs de croissance qui contribuent au développement de la glande mammaire. Certains stimulent le développement mammaire (EGF, IGF, FGF, HGF), tandis que d'autres s'y opposent (MDGI, TNFα, TGFß1, Mammastatine).

1°) Facteurs de croissance stimulateurs de la croissance mammaire

Parmi ces facteurs de croissance, l'EGF (Epidermal Growth Factor) a retenu le premier l'intérêt des chercheurs. Le rôle de ce facteur dans le développement est suggéré par l'observation d'une modification du nombre de récepteurs à l'EGF en fonction de l'état physiologique (Forsyth, 1989) et d'une diminution de la croissance mammaire chez des souris ayant subi une ablation des glandes sous-maxillaires, l'une des sources les plus importantes d'EGF (Okamoto et Oka, 1984) , cet effet pouvant être partiellement reversé par des greffes de glandes salivaires ou des injections du facteur de croissance. L'EGF apparaît exercer une fonction double, stimulant la prolifération et inhibant la différenciation fonctionnelle (synthèse de protéines du lait) dans les cellules épithéliales normales mammaires de souris *in vitro*. En effet, en culture organotypique de glande mammaire de souris vierges traitées par les oestrogènes et la progestérone, l'EGF induit la croissance lobuloalvéolaire (Tonelli et Sorof, 1980) et inhibe la synthèse de caséine (Taketani et Oka, 1983). Par ailleurs, la libération lente d'EGF à partir d'implants inertes imbibés de ce facteur placés au niveau de la glande mammaire stimule le développement lobuloalvéolaire de la glande mammaire de souris d'une part, et peut réinitier la croissance des canaux et la morphogénèse des glandes régressées de souris ovariectomisées d'autre part (Coleman et al., 1988).

De même, le TGFα (Transforming Growth Factor α), facteur appartenant à la même famille que l'EGF et agissant via les récepteurs de l'EGF, exerce aussi un effet sur le développement lobuloalvéolaire dans les souris femelles vierges (Vonderhaar, 1987), la réponse

étant similaire à celle produite par l'EGF. Toutefois, le TGFα agit à plus faibles doses que l'EGF et ne nécessite pas de stimulation préalable par les oestrogènes et la progestérone. Des récepteurs à l'EGF et au TGFα ont été identifiés sur les cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires (Smith et al., 1989).

La découverte de facteurs de croissance stimulant le développement mammaire a permis d'entrevoir les relais possibles des mécanismes d'action des oestrogènes. En effet, sous l'influence des oestrogènes, les cellules épithéliales mammaires produisent davantage de facteurs de croissance et leurs récepteurs. Ainsi, les oestrogènes augmentent la synthèse d'EGF, de TGFα et de leurs récepteurs (Vonderhaar, 1984 ; Monaham et al., 1987 ; Gabelman et Emerman, 1992).

L'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) ou somatomédine C est un facteur de croissance capable de stimuler la prolifération des cellules épithéliales mammaires (Imagawa et al., 1986 ; Braumrucker et Stemberger, 1989). L'insuline à des concentrations dix fois plus importantes produit un effet semblable en occupant les récepteurs de l'IGF1. L'IGF1 a par ailleurs un rôle différenciateur et peut être considéré comme une des hormones lactogènes, car capable en effet de stimuler la synthèse de caséine (Duclos et al., 1989). De plus, des ARNm codants pour l'IGF1 ont été localisés par hybridation *in situ* dans le stroma de la glande mammaire humaine (Yee et al., 1989) suggérant ainsi un modèle paracrine dans lequel les cellules stromales constitueraient la source locale d'IGF1 stimulant la prolifération de l'épithélium.

L'HGF (Hepatocyte Growth Factor) encore appelé Scatter Factor (SF) joue également un rôle essentiel dans les interactions épithélium-mésenchyme de la glande mammaire. Ce facteur de croissance, à la fois mitogène, motogène et morphogène est synthétisé par les fibroblastes du tissu stromal de la glande mammaire en développement et agit spécifiquement sur les cellules épithéliales qui forment les canaux en cours d'élongation (Niranjan et al., 1995). Les cellules épithéliales expriment en outre l'HGF (Wang et al., 1994), ainsi que les récepteurs de ce facteur de croissance (Zioncheck et al., 1995).

Un facteur de croissance, le MDGF1 (Mammary Derived Growth Factor 1), a été isolé à partir du lait et de tumeurs mammaires (Bano et al., 1985). Ce facteur, produit par les cellules épithéliales, stimule leur prolifération par un mécanisme autocrine et amplifie la production de

collagène IV, constituant essentiel de la membrane basale sur laquelle se développent les cellules épithéliales (Liotta et al., 1980). Le MDGF1 n'agit qu'en synergie avec les oestrogènes qui constituent la stimulation initiale, les cellules privées d'oestrogène étant en effet insensibles au MDGF1.

Le FGF (Fibroblast Growth Factor), facteur mitogène intervenant dans de nombreux systèmes en développement (Liu et Nicoll, 1988 ; Seed et al., 1988), est également impliqué dans le développement de la glande mammaire. Par immunocytochimie, Rudland et al. (1993) ont détecté chez la rate la présence de FGF-2 uniquement sur les lames basales des structures quiescentes alors que dans les canaux en croissance, l'immunoréactivité est essentiellement localisée sur les cellules épithéliales (notamment sur les cellules intermédiaires entre le type épithélial et myoépithélial). Ces observations suggèrent que le FGF contrôlerait la prolifération des cellules épithéliales. Antérieurement à ce travail, il avait d'ailleurs été décrit à partir de structures en développement isolées de glandes mammaires de rate que le FGF-2 stimule la croissance des cellules myoépithéliales, des cellules souches intermédiaires, des bourgeons terminaux, mais est incapable de stimuler la croissance des cellules épithéliales ductales (Fernig et al., 1990). Outre son action mitogène, le FGF-2 est également capable de s'opposer à la différenciation des cellules épithéliales mammaires puisqu'il diminue la synthèse de caséine de cellules épithéliales issues de glandes mammaires normales de souris stimulées à proliférer en présence de ce facteur de croissance (Levay-Young et al., 1989). Des études immunocytochimiques ont par ailleurs permis de localiser le FGF-2 dans la glande mammaire humaine et plus précisément dans les cellules myoépithéliales et non dans les cellules épithéliales canalaires ou lobulaires (Gomm et al., 1991). Cette expression myoépithéliale du FGF-2 a été confirmée dans les cellules humaines en culture par Ke et al. (1993). Néanmoins, il a été montré récemment que des cellules épithéliales mammaires normales humaines ayant un phénotype de cellules luminales expriment les ARNm codants pour le FGF-2 (Renaud et al., 1996). Actuellement, un autre membre de la famille des FGF, le FGF-7 est décrit comme "bon candidat" de la régulation du développement de la glande mammaire. Ce facteur de croissance, produit par le stroma et stimulant la prolifération de l'épithélium adjacent, est capable *in vitro*

d'exercer un effet mitogène et morphogène sur des cellules épithéliales isolées de glandes mammaires de souris cultivées en gel de collagène (Imagawa et al., 1994b).

2°) Facteurs de croissance inhibiteurs de la croissance mammaire

A côté des facteurs stimulateurs de la croissance mammaire, il existe des facteurs inhibiteurs qui semblent jouer un rôle important dans l'homéostasie de la glande mammaire.

Le MDGI (Mammary Derived Growth Inhibitor) isolé de glande mammaire bovine en lactation (Böhmer et al., 1987) est présent essentiellement dans la glande mammaire pleinement différenciée (synthétisant du lait et ayant achevé sa croissance). Ce facteur a des effets remarquables sur la croissance mammaire, ces effets sont à la fois inhibiteurs de la croissance des cellules épithéliales mammaires et activateurs de la différenciation glandulaire (Kurtz et al., 1990). Les glandes mammaires traitées par le MDGI présentent des lobules alvéolaires monocouches actifs avec une lumière agrandie et cet état différencié s'accompagne de l'apparition de caséine ß intracellulaire et canaliculaire. Par ailleurs, le MDGI a des analogies de structure avec les protéines associées à des lipides, il est capable de se lier aux lipides et de les transporter dans les cellules mammaires (Revue dans Houdebine, 1993).

Un autre facteur inhibiteur est le TNFα (Tumor Necrosis Factor α) qui exerce un effet paracrine sur le développement et la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Le TNFα diminue la prolifération des cellules épithéliales mammaires et induit leur différenciation (Ip et al., 1992).

Un troisième inhibiteur mammaire est le TGFß (Transforming Growth Factor ß). Ce facteur de croissance introduit sous forme d'implants dans la glande mammaire de souris en phase de croissance inhibe rapidement, fortement et d'une manière réversible la croissance des canaux sans affecter le stroma et en ne faisant que ralentir le développement des alvéoles (Daniel et al., 1989). Le TGFß a été localisé essentiellement au niveau des membranes basales entourant les canaux mammaires mais il n'est jamais détecté dans la matrice des bourgeons en croissance (Silberstein et al., 1990). L'effet inhibiteur du TGFß s'exercerait par augmentation de la synthèse des composants matriciels par les cellules épithéliales, composants qui accumuleraient

le TGFß à la périphérie des canaux et dicteraient ainsi la morphogénèse de la glande mammaire (Silberstein et al.,1990). En outre, le TGFß inhibe la croissance des bourgeons terminaux et provoque une rapide involution des canaux mammaires (Daniel et Robinson, 1992). Sur la base de ces résultats, Daniel et Robinson (1992), admettent que la croissance des canaux mammaires ne s'effectue que là où le TGFß serait absent ou aurait disparu. D'autre part, le TGFß influence le fonctionnement même de la glande mammaire en inhibant la synthèse des protéines du lait, notamment la caséine ß et l'α-lactalbumine (Robinson et al., 1993 ; Sudlow et al., 1994 ; Yamamoto et al., 1994). Ce facteur jouerait donc un rôle physiologique important pendant la gestation caractérisé par un haut niveau de TGFß. Ce niveau décline rapidement à la naissance entraînant ainsi les cellules dans la voie d'une différenciation terminale et permettant la synthèse des protéines du lait.

Une autre protéine, la mammastatine a été isolée de cellules épithéliales mammaires normales humaines (Ervin et al., 1989). Elle est un puissant inhibiteur de la multiplication des cellules épithéliales mammaires et se distingue par sa grande spécificité tissulaire.

Ainsi, la glande mammaire est soumise tout au long de la vie à des remaniements tissulaires considérables qui sont fonction de l'activité reproductrice et de la lactation. Les cellules épithéliales mammaires nécessitent par conséquent un contrôle rigoureux de leur prolifération, de leur migration et de leur différenciation, ainsi que de leur mort cellulaire lors de l'involution. Ce contrôle est assuré par un équilibre constant entre les différents effecteurs (activateurs et inhibiteurs), permettant ainsi un déroulement harmonieux de toutes les phases d'évolution de la glande mammaire. Aussi, il est aisé de comprendre qu'un désordre de ce contrôle puisse être à l'origine de la pathologie tumorale mammaire.

II) Autonomie des cellules cancéreuses mammaires

L'équilibre normal bien contrôlé entre la division, la différenciation et la mort cellulaires est déplacé pour les cellules cancéreuses au profit d'un excès de prolifération. La cellule tumorale prolifère indéfiniment, perd sa différenciation et indifférenciée, n'assume plus ses fonctions normales. L'autonomie de croissance est le trait essentiel des cellules tumorales, car sans elle, il n'y aurait pas de cancer. En outre, au cours de la progression tumorale dans le cancer du sein, les cellules cancéreuses sont capables d'envahir le mésenchyme sous-jacent mais leur mobilité est loin d'être contrôlée comme celle des cellules épithéliales normales lors notamment de la mise en place de la lactogénèse. Outre l'invasion du mésenchyme sous-jacent, les cellules cancéreuses mammaires sont capables de se détacher de leur masse tumorale d'origine, de migrer à travers les membranes basales et les matrices extracellulaires et de passer dans le courant sanguin afin de coloniser d'autres organes.

Il convient néanmoins de souligner que bien que les cellules cancéreuses possèdent une croissance autonome, elles conservent dans bien des cas, un niveau de différenciation suffisant pour que les pathologistes puissent les classer suivant le type épithélial dont elles sont issues. Ainsi, l'acquisition de l'autonomie de croissance ne fait pas perdre à la cellule tumorale tout son "potentiel de différenciation" ce qui suggère la possibilité d'un retour à un état normalisé. Par conséquent, une des voies possibles pour supprimer le processus tumoral serait de recréer les conditions favorables qui dirigeraient les cellules cancéreuses vers leur programme de différenciation.

L'autonomie de croissance des cellules tumorales provient par ailleurs d'altérations dans des gènes dont les produits sont essentiels d'une part à la prolifération et d'autre part à la différenciation cellulaire. Or, certains gènes sont trouvés en permanence activés dans les cellules tumorales, ce sont les oncogènes. Il est intéressant en outre de constater que la plupart des produits des oncogènes connus s'avèrent être des facteurs de croissance (le PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes est le produit de l'oncogène c-sis ; les produits des oncogènes int-2 et hst-1 présentent des analogies avec le FGF-2), des récepteurs de facteur de croissance (le récepteur du facteur de croissance des macrophages CSF-1 est le produit de c-fms ; c-erb2

code pour un récepteur tronqué de l'EGF) ou encore des molécules associées à la transduction des signaux membranaires (le produit de ras est une protéine G). Cette identité ou cette analogie entre les oncogènes et des facteurs de croissance ou leurs récepteurs montre le lien étroit entre les mécanismes de transformation maligne et de prolifération cellulaire, les facteurs de croissance apparaissant donc clairement comme des effecteurs biologiques liés à la prolifération et/ou à la différenciation cellulaires. Rizzino (1993) suggère par ailleurs que la différenciation qui s'opère dans des conditions normales limite d'elle même la prolifération cellulaire en provoquant un changement dans la production des facteurs de croissance par les cellules. Ces dernières synthétiseraient non plus des facteurs stimulateurs de la croissance mais des facteurs inhibiteurs. Par conséquent, un blocage de la différenciation peut conduire à la formation de tumeurs par le maintien de la production de facteurs de croissance stimulateurs agissant d'une manière autocrine.

Nous venons de décrire qu'outre les hormones, les facteurs de croissance jouent un rôle important dans la régulation de la morphogénèse de la glande mammaire. Aussi, leur implication dans les cancers du sein a été largement mise en évidence par de nombreux travaux montrant notamment que leur expression ou celle de leurs récepteurs peut être modifiée ou amplifiée.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons de travailler sur le FGF-2. A l'aide d'agents connus pour inhiber la prolifération et/ou induire la différenciation, nous essaierons de rétablir, au moins partiellement, une régulation des cellules cancéreuses épithéliales mammaires et d'aborder ainsi le rôle de ce facteur de croissance dans la cancérogenèse mammaire.

III) FGF et cancérogenèse mammaire

Les différents membres de la famille du FGF seront décrits ultérieurement dans le paragraphe se rapportant aux généralités sur le FGF-2. Cependant, il convient dès à présent de préciser que la famille des FGF comprend actuellement quatorze membres présentant entre eux une forte homologie. Ces peptides possèdent en outre des analogies structurales avec les produits des oncogènes int-2 (FGF-3) et hst-1 (FGF-4).

A) Expression du FGF dans les tumeurs mammaires

C'est en 1986 que Rowe et al. purifient à partir de tumeur mammaire humaine un facteur de croissance identifié ultérieurement comme étant le FGF-2. L'expression de ce facteur de croissance dans les cellules épithéliales normales et cancéreuses de la glande mammaire humaine est confirmée par Flamm et al. (1989). Plus récemment, par RT-PCR et/ou par Northern Blot, plusieurs équipes ont également mis en évidence l'expression du FGF-2 comme du FGF-1 dans une très grande majorité de biopsies tumorales de cancer du sein (Luqmani et al., 1992 ; Anandappa et al., 1994 ; Smith et al., 1994 ; Penault-Llorca et al., 1995). De plus, les tumeurs mammaires amplifient des oncogènes appartenant à la famille du FGF tels que int-2 et hst-1 (Liderau et al., 1988 ; Theillet et al., 1989 ; Meyers et Dudley, 1992). Ces deux oncogènes, localisés à proximité l'un de l'autre sur le chromosome 11 humain (Adelaide et al., 1988 ; Wada et al., 1988), sont co-amplifiés dans 17 % des cancers du sein (Theillet et al., 1989). Par ailleurs, la transfection de l'ADNc du FGF-4 dans les cellules cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 modifie leur pouvoir invasif, les cellules acquérant la capacité à former des tumeurs après greffe dans les souris nudes sans addition d'oestrogènes avec augmentation de la fréquence des métastases (20 à 30 % versus 5 %). La surexpression du FGF-4 dans les cellules cancéreuses du sein induit en outre, une résistance aux effets antiprolifératifs du Tamoxifène (Kern et al., 1994).

L'implication d'autres membres de la famille des FGF a également été rapportée. Le gène du FGF-6 peut être amplifié dans 3,6 % des tumeurs du sein (Dib et al., 1994), le FGF-7

(KGF) a été détecté par RT-PCR dans les tumeurs cancéreuses mammaires (Koos et al., 1993) et le FGF-8 a été purifié à partir du milieu conditionné de cellules cancéreuses mammaires murines (carcinome Shionogi 115) (Tanaka et al., 1992).

Les cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines en culture sont capables *in vitro* de produire du FGF-2 et du FGF-1 (Luqmani et al., 1992 ; Smith et al., 1994 ; Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Penault-Llorca et al., 1995). En outre, *in vivo*, il a été décrit une augmentation de la concentration sérique en FGF-2 chez des patientes présentant un cancer du sein (Takei et al., 1994) soulignant encore davantage le rôle important que semble exercer le FGF-2 dans la tumorogénèse mammaire.

B) Effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires

In vitro, le FGF-2 est capable de stimuler la prolifération de cellules épithéliales de glande mammaire cancéreuse en culture primaire (Takahashi et al., 1989). En outre, son effet stimulateur de croissance de lignées cancéreuses mammaires hormono-dépendantes telles que les lignées MGF-7 et T47D a été largement démontré (Daly et al., 1988 ; Karey et Sibarsku, 1988 ; Briozzo et al., 1991 ; Peyrat et al., 1991-1992 ; Stewart et al., 1992 ; Sutherland et al., 1992 ; Musgrove et Sutherland, 1993 ; Delehedde et al., 1995a). A l'inverse, le FGF-2 n'exerce aucun effet mitogène sur les cellules immortalisées, cellules HBL100 (Souttou et al., 1994) et sur les cellules cancéreuses hormono-indépendantes MDA-MB-231 (Peyrat et al., 1991).

Il a été décrit d'autre part que les cellules épithéliales mammaires cancéreuses produisant du FGF-2 sont capables de stimuler leur prolifération en agissant par une boucle autocrine externe (Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995). Souttou et al. (1994) ont d'ailleurs suggéré que le FGF-2 serait un facteur autocrine impliqué dans les événements précoces de la transformation néoplasique des cellules épithéliales mammaires.

C) Sites de liaison du FGF-2 et cellules épithéliales cancéreuses mammaires

Des sites de fixation du FGF-2 ont été décrits au niveau de cellules épithéliales cancéreuses mammaires de rate (Fernig et al., 1993), de lignées cellulaires de cancer du sein (Briozzo et al., 1991 ; Peyrat et al., 1991) ainsi qu'au niveau de biopsies cancéreuses mammaires (Peyrat et al., 1992). Il existe actuellement quatre types de FGFR numérotés de 1 à 4 et certains des gènes codants pour ces récepteurs peuvent être amplifiés dans les cellules tumorales mammaires. C'est le cas du FGFR-1, du FGFR-2 et du FGFR-4 (Adnane et al., 1991 ; Luqmani et al., 1992 ; Jaakkola et al., 1993 ; Theillet et al., 1993 ; Jacquemeir et al., 1994 ; Penault-Llorca et al., 1995). Le FGFR-3 n'a par contre pas été détecté dans les cellules épithéliales cancéreuses mammaires en culture et dans les biopsies tumorales (Penault-Llorca et al., 1995).

Outre les récepteurs de haute affinité, les cellules épithéliales mammaires cancéreuses expriment également les sites de basse affinité pour le FGF-2 correspondant à des protéoglycanes de type héparane sulfate (Peyrat et al., 1991 ; Fernig et al., 1993 ; Delehedde et al., 1996-1997).

IV) Démarche expérimentale

Nous venons de présenter le rôle important joué par le FGF-2 sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Nous savons en outre que la transmission du signal mitogène de ce facteur de croissance passe par les récepteurs de haute affinité (Fernig et Gallagher, 1994) et que la régulation de ces récepteurs apparaît fondamentale dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré sur des cellules de mélanomes que l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre le FGFR-1 conduit à une réduction significative du pouvoir prolifératif ou tumorigène des cellules épithéliales transfectées (Becker et al., 1992). D'autre part, il existe un certain nombre de situations où le ralentissement ou l'arrêt de la prolifération se traduit par une diminution du nombre de FGFR. Ainsi, le nombre de FGFR

diminue à mesure que la densité cellulaire augmente (Veomett et al., 1989) ou que les cellules telles que les cellules musculaires (Templeton et Hauschka, 1992), les chondrocytes (Iwamoto et al., 1991) ou encore les cellules de tératocarninomes (Pertovaara et al., 1993a) évoluent vers la différenciation terminale.

Toutefois, il s'avère que le nombre de FGFR, notamment au niveau des cellules épithéliales cancéreuses mammaires, ne reflète pas toujours une sensibilité au FGF-2. Il a été rapporté en effet que des cellules cancéreuses mammaires possédant des sites de haute affinité en nombre comparable peuvent être soit stimulées, soit ne présenter aucune modification de leur prolifération sous l'influence du FGF-2 (Peyrat et al., 1991). Ces cellules diffèrent cependant par leur nombre de sites de basse affinité : ces sites présents en très grand nombre au niveau des cellules insensibles au FGF-2 n'ont pas été détectés au niveau des cellules répondant à une stimulation de leur croissance. Ces résultats laissent par conséquent entrevoir un rôle important des sites de basse affinité dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2. Sachant que les sites de basse affinité correspondent à des HSPG (protéoglycanes de type héparane sulfate), Delehedde et al. (1996-1997) ont purifié ces molécules à partir de lignées épithéliales cancéreuses mammaires en culture et ont confirmé le rôle primordial joué par les HSPG sur l'activité du FGF-2. Ces protéoglycanes sont en effet nécessaires à l'action mitogène de ce facteur de croissance mais peuvent également inhiber son activité lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité.

En regard de l'ensemble de ces résultats, nous nous proposons au cours de ce travail de thèse d'appréhender le rôle du FGF-2 dans la régulation de la prolifération et/ou de la différenciation des cellules épithéliales cancéreuses mammaires par l'étude de l'expression des sites de liaison de ce facteur de croissance. Notre étude portera sur deux lignées cancéreuses mammaires : une lignée hormono-dépendante, la lignée MCF-7 et une lignée hormono-indépendante, la lignée MDA-MB-231. Des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) issues de mammoplasties réductionnelles seront étudiées en parallèle et serviront de témoins. Les cellules seront soumises à l'action de trois agents connus pour inhiber la prolifération

(le Transforming Growth Factor ß1) et/ou induire la différenciation cellulaires (le butyrate de sodium et l'acide rétinoïque).

Nous décrirons dans un premier temps les effets de ces agents sur les cellules mammaires tant au niveau de leur prolifération et de leur différenciation (chapitre 1) qu'au niveau du système uPA/PAI-1, système intervenant dans la migration cellulaire (chapitre 2).

Nous étudierons ensuite la régulation des sites de haute affinité (chapitre 3) et de basse affinité (chapitre 4) du FGF-2 des cellules mammaires traitées ou non par les inhibiteurs de prolifération et/ou inducteurs de différenciation.

Puis, nous examinerons la prolifération et le système uPA/PAI-1 des cellules mammaires soumises à l'action de polysaccharides sulfatés (carraghénanes), substances connues comme antagonistes du FGF-2 (chapitre 5).

Avant d'aborder le travail de thèse proprement dit, nous présenterons successivement chacun des facteurs intervenant dans ce travail : le FGF-2, le Transforming Growth Factor ß1 (TGFß1), le butyrate de sodium (NaB) et l'acide rétinoïque (RA).

V) Propriétés structurales et activités biologiques du FGF-2

Les "Fibroblast Growth Factors" (FGF) constituent une famille de facteurs de croissance et d'oncogènes présentant une grande affinité pour l'héparine et comprenant actuellement 14 membres qui sont le FGF acide (FGF-1), le FGF basique (FGF-2), les produits des oncogènes int-2 (FGF-3) et hst (FGF-4), le FGF-5, le FGF-6, le Keratinocyte Growth Factor (KGF ou FGF-7), le FGF-8, le FGF-9 et les FGF-10 à -14 (Basilico et Moscatelli, 1992 ; Tanaka et al., 1992 ; Miyamoto et al., 1993 ; Coulier et al., 1997). Les 9 premiers membres de cette famille (figure 4) présentent entre eux une homologie de séquence variant de 35 à 55%. Les quatre derniers membres (FGF-10 à -14) ont été identifiés très récemment et semblent constituer une sous-famille puisqu'ils présentent entre eux de fortes similitudes de séquence variant de 64 à 82 % d'acides aminés identiques (Coulier et al., 1997).

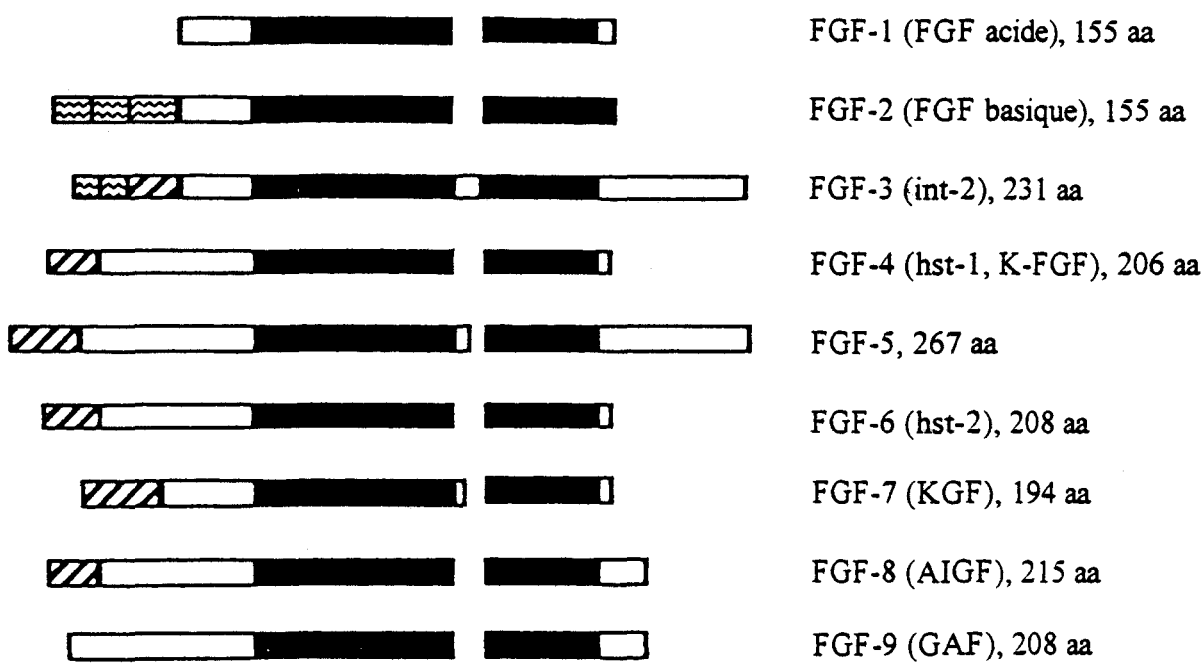


Figure 4 : Caractéristiques structurales des 9 premiers membres de la famille des FGF. Le FGF-1 (FGF acide) et le FGF-2 (FGF basique) sont les deux membres prototypes de la famille des FGF, ils présentent la caractéristique de ne pas posséder de peptide signal (Esch et al., 1985 ; Jaye et al., 1986). Le FGF-3 (ou int-2), le FGF-4 (ou hst-1 encore appelé K-FGF : Kaposi Sarcoma FGF) et le FGF-5 ont d'abord été identifiés comme des produits d'oncogènes (Moore et al., 1986 ; Delli Bovi et al., 1987 ; Zhan et al., 1988). Le FGF-6 a été identifié sur la base d'homologie avec le FGF-4 (Marics et al., 1989). Le FGF-7 (ou KGF : Keratinocyte Growth Factor) a été présenté initialement comme un mitogène spécifique des kératinocytes (Finch et al., 1989). Le FGF-8 (ou AIGF : Androgen Induced Growth Factor) a été isolé d'une lignée de carcinome mammaire de souris dont la croissance est dépendante des androgènes (Tanaka et al., 1992). Le FGF-9 (ou GAF : Glia-Activating-Factor) a été purifié à partir d'une lignée cellulaire de gliome humain (Miyamoto et al., 1993), il ne possède pas de signal de sécrétion comme le FGF-1 et le FGF-2.

Région responsable de la fixation aux récepteurs de la surface cellulaire

Peptide signal

Extensions N-terminales, séquences de localisation nucléaire

D'après Fernig et Gallagher, 1994.

Le membre prototype de cette famille est le FGF-2 isolé initialement à partir d'extraits hypophysaires de boeuf (Gospodarowicz, 1975). Le FGF-2 exerce des effets pléiotropiques sur des types cellulaires variés grâce à l'existence de deux grandes classes de sites de fixation définies selon leur affinité pour le FGF-2 : les sites de haute affinité, récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (FGFR) et les sites de basse affinité correspondant à des protéoglycanes de type héparane sulfate (HSPG).

Au cours de ce paragraphe, nous détaillerons successivement la structure et les caractéristiques du FGF-2, ses sites de fixation de haute et de basse affinité ainsi que ses principales activités biologiques.

A) Structure protéique et isoformes du FGF-2

Le FGF-2 est un polypeptide constitué d'une chaîne unique non glycosylée de poids moléculaire de 18 kDa, il possède un point isoélectrique de 9,6 (Esch et al., 1985). Par des études structurales approfondies, plusieurs domaines fonctionnels spécifiques ont été déterminés au sein de la molécule de FGF-2 (figure 5) : deux domaines distincts de liaison aux récepteurs (revue dans Basilico et Moscatelli, 1992 ; Springer et al., 1994 ; Seddon et al., 1995) et un domaine de liaison à l'héparine (Baird et al., 1988 ; Heath et al., 1991 ; Zhang et al., 1991 ; Arakawa et al., 1994 ; Li et al., 1994 ; Thompson et al., 1994).

En raison de la structure tertiaire du FGF-2, le premier domaine de liaison au récepteur correspond à une séquence discontinue d'acides aminés, dont les capacités de liaison proviennent essentiellement des interactions hydrophobes des résidus Tyr-24, Tyr-103, Leu-140 et Met-142 ainsi que des résidus polaires Arg-44 et Asn-101 (Springer et al., 1994). Le second domaine de fixation au récepteur présente une affinité beaucoup réduite (250 fois), cependant trois acides aminés de ce domaine Lys-110, Tyr-111 et Trp-114 apparaissent indispensables à l'activité mitogène du FGF-2 (Springer et al., 1994).

De même, le domaine de liaison à l'héparine semble nécessaire à l'activité mitogène du facteur de croissance puisqu'après mutagenèse dirigée ou modification chimique des acides

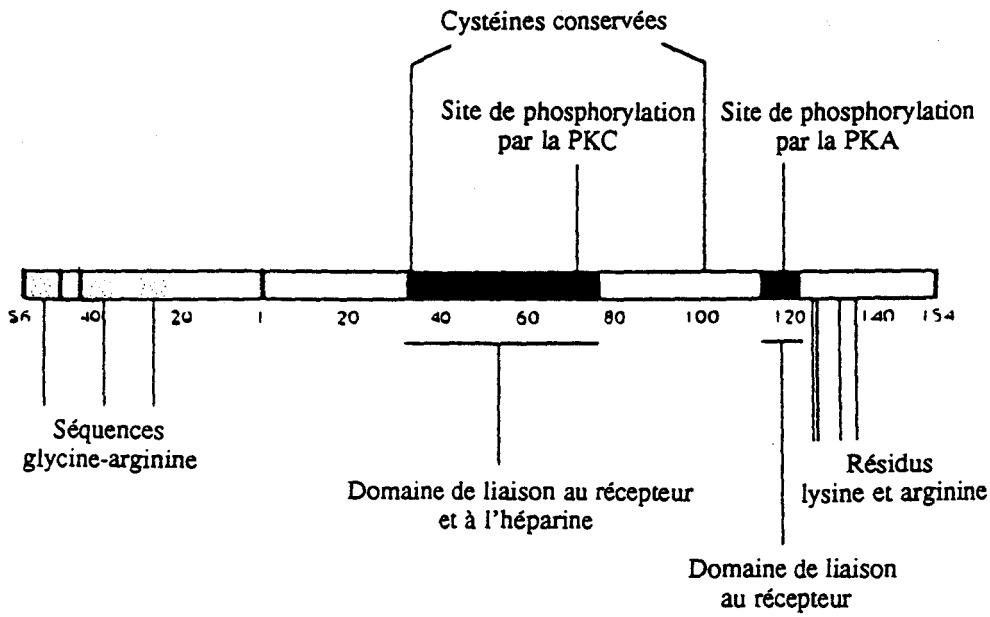


Figure 5 : Représentation schématique du FGF-2.
Ce schéma présente les séquences en acides aminés des 4 isoformes du FGF-2. Ces quatre isoformes ainsi que leurs domaines fonctionnels sont présentés dans le texte. D'après Basilico et Moscatelli, 1992.

aminés le constituant, la prolifération induite par le FGF-2 est fortement diminuée (Burgess et al., 1990b ; Heath et al., 1991 ; Li et al., 1994 ; Thompson et al., 1994).

La liaison du FGF-2 à l'héparine est assurée par une séquence discontinue de 11 acides aminés chargés positivement. Les interactions entre le FGF-2 et l'héparine sont essentiellement de nature non ionique (liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals), les interactions électrostatiques apparaissant mineures.

La molécule de FGF-2 est également caractérisée par quatre cystéines dont deux d'entre elles sont hautement conservées entre les différents membres de la famille des FGF (revue dans Basilico et Moscatelli, 1992). Ces cystéines ne paraissent toutefois pas indispensables à la fonction biologique du FGF-2, leur remplacement par des résidus sérines n'empêche pas l'activité mitogène du facteur de croissance (Fox et al., 1988).

La molécule de FGF-2 peut subir par ailleurs des modifications post-traductionnelles telles que notamment des phosphorylations ou des ribosylations (Feige et Baird, 1989 ; Boulle et al., 1995) ; le rôle de ces modifications n'est pas encore clairement établi.

Outre la forme de 18 kDa, la molécule de FGF-2 peut également se présenter sous des formes de plus haut poids moléculaire dues à l'utilisation de plusieurs codons d'initiation lors de la transcription du gène. Le gène du FGF-2 est situé sur le chromosome 4, il comporte trois exons séparés par deux larges introns (Mergia et al., 1986). Les ARNm transcrits à partir de ce gène sont constitués de 3,7 et 7 kb (Abraham et al., 1986). Les transcrits du FGF-2 présentent plusieurs sites d'initiation de la traduction. L'utilisation du codon classique de type AUG donne naissance à une forme dite de bas poids moléculaire du FGF-2 ou "Low Molecular Weight"/LMW FGF-2 (155 aa : 18 kDa) tandis que l'utilisation d'un des trois codons CUG situés plus en amont génère les formes dites de haut poids moléculaire ou "High Molecular Weight"/HMW FGF-2 (210 aa : 24 kDa, 201 aa : 22,5 kDa, 196 aa : 21 kDa) (Florkiewicz et Sommer, 1989 ; Prats et al., 1989 ; Quarto et al., 1993). Ces formes de haut poids moléculaire présentent spécifiquement du côté N-terminal une séquence de localisation nucléaire qui permet le transport du FGF-2 jusqu'au noyau. Elles sont par conséquent retrouvées préférentiellement dans le noyau des cellules alors que la forme de 18 kDa se retrouve plus spécifiquement dans le cytoplasme (revue dans Quarto et al., 1993 ; Dono et Zeller, 1994 ; Gualandris et al., 1994).

En outre, bien que le FGF-2 ne possède pas de peptide signal, il est cependant présent dans les matrices extracellulaires (Bashkin et al., 1989) et *in vitro* dans le milieu de culture des cellules (Souttou et al., 1994). Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour tenter d'expliquer le mode de sécrétion du FGF-2. Le facteur de croissance pourrait être libéré au cours de rupture membranaire après blessure ou au cours de la mort cellulaire (Yeoman, 1993). Le FGF-2 pourrait également utiliser un mécanisme de sécrétion similaire à celui de l'interleukine-1ß, analogue structural du FGF-2 (Zhang et al., 1991) à savoir une exocytose membranaire indépendante du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Rubartelli et al., 1990 ; Mignatti et al., 1992). Toutefois, actuellement il n'existe aucun consensus quant à la voie de libération du FGF-2.

B) Distributions tissulaires et cellulaires

Le FGF-2 apparaît comme le facteur de croissance le plus ubiquitaire ; il est largement retrouvé dans tous les tissus et les cellules d'origine mésodermique et ectodermique (Baird et al., 1986 ; Gospodarowicz et al., 1987). Il est principalement localisé dans les matrices extracellulaires (revue dans Vlodavsky et al., 1991), au sein desquelles il se trouve associé aux HSPG (Bashkin et al., 1989). En outre, il a été détecté dans de nombreuses biopsies tumorales (Lobb, 1988) dont les gliomes et les méningiomes (Takahashi et al., 1990), les adénocarcinomes pulmonaires (Takanami et al., 1996) ainsi que dans les carcinomes mammaires (Luqmani et al., 1992 ; Anandappa et al., 1994 ; Penault-Llorca et al., 1995).

C) Récepteurs du FGF-2 à activité tyrosine kinase (FGFR)

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont les récepteurs proprement dits du FGF-2 puisqu'ils sont responsables de la transduction du signal (revue dans Jaye et al., 1992 ; Fantl et al., 1993). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires d'un poids moléculaire de 110 à 160 kDa qui lient le FGF-2 avec une grande affinité (Kd = 20-600 pM).

1°) Structure protéique des FGFR

La famille des FGFR comprend actuellement quatre membres : le FGFR-1 (flg ou fms-like gene), le FGFR-2 (bek), le FGFR-3 (cek 2) et le FGFR-4 (revue dans Jaye et al., 1992 ; Fernig et Gallagher, 1994). Ils sont codés par quatre gènes différents situés respectivement sur les chromosomes 8, 10, 4 et 5 (revue dans Jaye et al., 1992).

Les protéines FGFR-1, -2, -3 et -4 présentent de fortes similitudes de séquence, allant de 56% d'acides aminés identiques pour la comparaison FGFR-1 et FGFR-4 à plus de 71% pour la paire FGFR-1 et FGFR-2 (revue dans Coulier et al., 1992). Une même structure générale a pu être déduite de ces quatre récepteurs (figure 6) : ce sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une seule chaîne et présentant plusieurs domaines spécifiques. La région intracellulaire porte un domaine kinase en deux parties séparées par une courte séquence interkinase de quatorze acides aminés ; cette région possède les résidus tyrosine qui sont les sites potentiels d'autophosphorylation du FGFR. Le domaine transmembranaire est constitué de vingt acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage dans la membrane plasmique. Le domaine extracellulaire est composé de trois boucles de type "immunoglobuline", il présente six à neuf sites de glycosylation et constitue le domaine de fixation du FGF-2. Au sein de cette région extracellulaire, entre les deux premières boucles de type immunoglobuline, se trouve un domaine acide constitué de quatre à huit acides aspartiques ou glutamiques, ce domaine étant caractéristique de la classe des FGFR. Les récepteurs du FGF possèdent

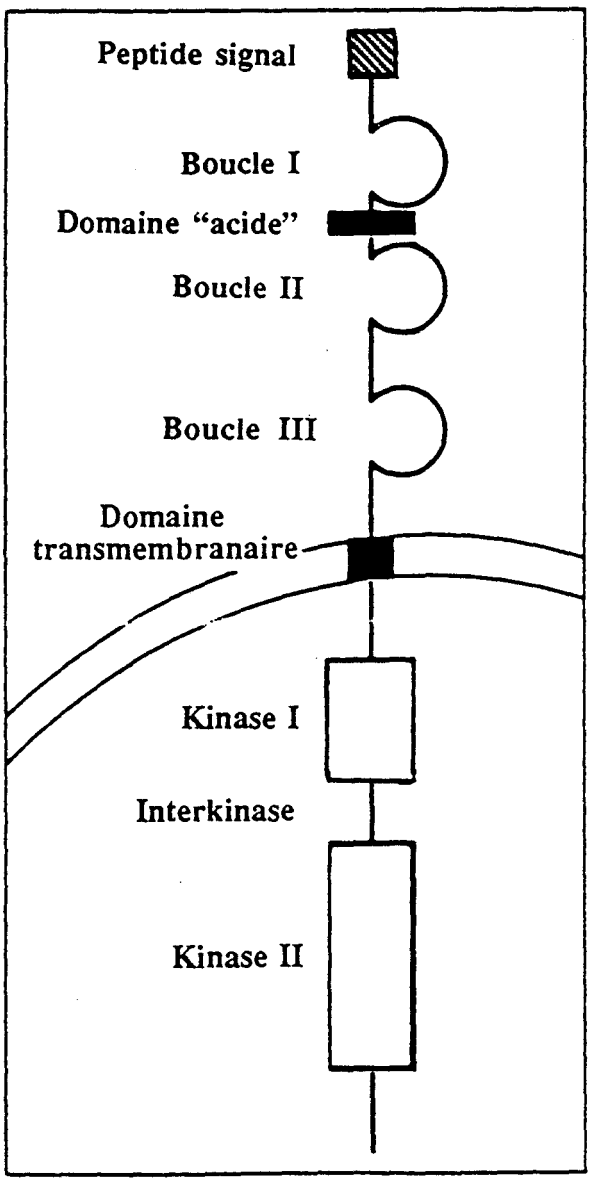


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des récepteurs des FGF. Les récepteurs des FGF présentent une structure extracellulaire en 3 boucles «immunoglobuline». Un domaine acide est également présent entre la première et la deuxième boucle. Le domaine catalytique intracytoplasmique est constitué de 2 domaines kinases séparés par une courte séquence interkinase.
D'après Coulier et al., 1992.

également dans leur partie extracellulaire un domaine de liaison à l'héparine, mais leur affinité pour l'héparine est plus faible que pour le FGF-2 (Kan et al., 1993 ; Thompson et al., 1994).

2°) Isoformes des FGFR

Une caractéristique de la famille des FGFR est que ces récepteurs peuvent se présenter sous un très grand nombre d'isoformes qui sont le résultat de mécanismes d'épissages alternatifs permettant à un seul gène de coder pour des protéines différentes (Jaye et al., 1992). Plusieurs variants ont ainsi été isolés, ils diffèrent par la présence ou l'absence de domaines spécifiques.

La première modification importante est la délétion de la première boucle "immunoglobuline" du FGFR-1 (Johnson et al., 1991). Pour le FGFR-2, cette délétion comprend même le domaine acide. Les formes à deux ou trois boucles ne présentent cependant pas de différence d'affinité notable envers leur ligand, suggérant que la boucle N-terminale comme le segment acide ne sont pas indispensables à la fixation du FGF-1 ou du FGF-2. Ces isoformes à deux boucles immunoglobuliniques sont les isoformes les plus communément rencontrées (revue dans Johnson et Williams, 1993).

Des divergences au niveau de la troisième boucle immunoglobuline ont été par ailleurs détectées. Cette boucle est codée par trois exons (l'exon IIIa codant pour la moitié N-terminale et les exons IIIb et IIIc codant pour la moitié C-terminale) qui sont le siège d'épissages alternatifs. Ainsi, l'incorporation de l'exon IIIa lors de l'épissage des messagers introduit un codon stop en phase aboutissant à la traduction de protéines sécrétées et constituées de la majeure partie du domaine extracellulaire. Par contre, l'expression des exons IIIb et IIIc donne naissance à des formes transmembranaires (Johnson et al., 1991) mais présentant des différences d'affinité importantes pour le FGF-2 (Miki et al., 1992).

Des messagers capables de coder pour une forme sécrétée constituée de la première boucle immunoglobuline précédée du peptide signal ont également été décrits pour le FGFR-1 (Eisenman et al., 1991). La fonction de cette forme sécrétée reste à définir.

Des modifications du domaine intracellulaire des FGFR ont également été rapportées. La délétion d'une grande partie du domaine kinase de FGFR-1 donne naissance à un variant vraisemblablement inactif dans la transduction du signal (Hou et al., 1991) mais ayant un rôle de régulateur négatif (Li et al., 1994).

D'autres modifications d'apparence plus mineure ont été décrites. Elles concernent la présence ou l'absence de dipeptides : le dipeptide Arg-Met entre la boîte "acide" et la deuxième boucle immunoglobuline de FGFR-1 (Johnson et al., 1990) et le dipeptide Thr-Val au niveau du domaine juxtamembranaire de FGFR-1 et FGFR-2 (Hou et al., 1991).

Ainsi, six isoformes du FGFR-1 (FGFR-1 I-VI) produites par un épissage alternatif sont actuellement connues (Eisenman et al., 1991 ; Fujita et al., 1991 ; Hou et al., 1991 ; Dell et Williams, 1992 ; Duan et al., 1992), elles sont présentées comme exemple dans la figure 7. Certaines isoformes des FGFR pourraient être impliquées dans la modulation de l'activité des récepteurs. Par exemple, le FGFR-1 présentant deux boucles immunoglobuline serait associé aux phénotypes transformés et malins (Yan et al., 1992 ; Yamaguchi et al., 1994) alors que les formes sécrétées ou présentant un domaine kinasique tronqué agiraient comme antagonistes (Duan et al., 1992).

Il convient également de signaler qu'un type différent de récepteur de haute affinité pour les FGF a été décrit : le récepteur CFR (Cystein-Rich-FGF Receptor). Le CFR est un récepteur transmembranaire ne possédant pas d'activité kinase. Il présente un domaine extracellulaire fortement enrichi en cystéines et fixe le FGF-2 avec un Kd d'environ 1 nM. Le rôle biologique de ce type de récepteur est encore inconnu à l'heure actuelle (Olwin et al., 1991 ; Burrus et al., 1992).

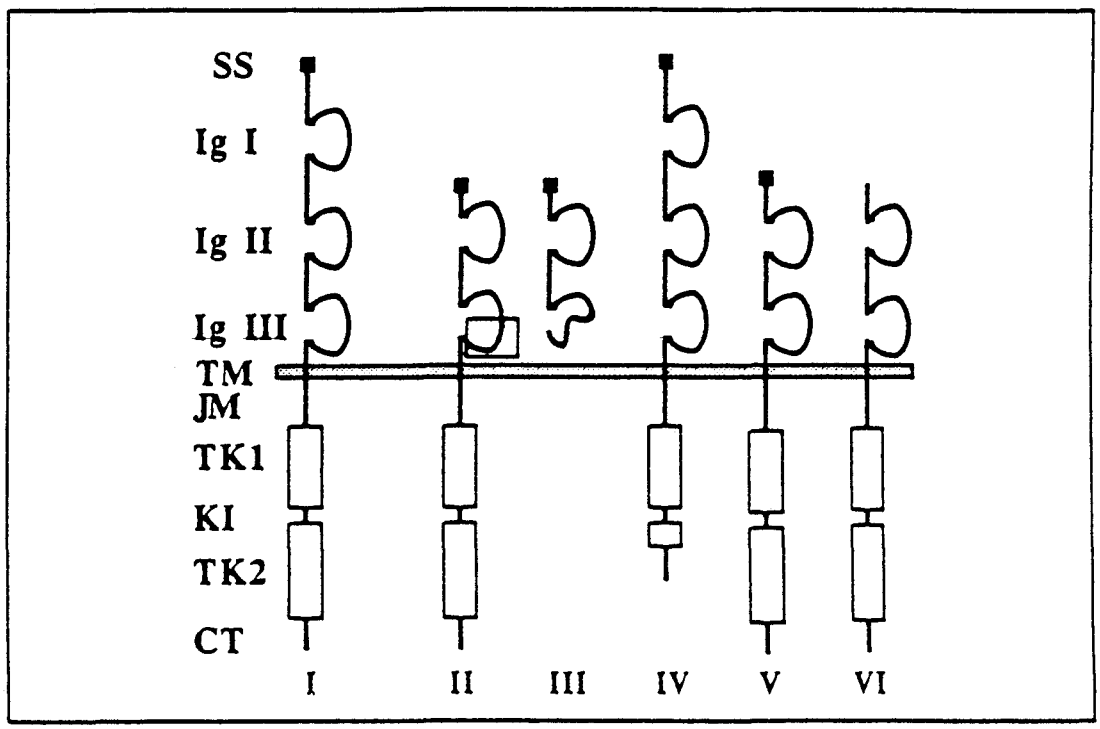


Figure 7 : 6 isoformes du FGFR-1 générées par épissages alternatifs.
Les variations observées sont : - délétion d'une boucle immunoglobuline totale (FGFR-1-II et FGFR-1-V)
- délétion de l'ensemble du domaine intracellulaire, de la région transmembranaire et d'une partie de la troisième boucle immunoglobuline (FGFR-1-III, isoforme sécrétée)
- délétion d'une partie du domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (FGFR-1-IV)
- délétion du peptide signal (FGFR-1-VI).
Des épissages alternatifs similaires génèrent différentes isoformes du FGFR-2 (Champion-Arnaud et al., 1991).
D'après Fernig et Gallagher, 1994.

3°) Spécificité des FGFR vis à vis des FGF

L'existence de quatre récepteurs avec pour chacun différentes isoformes pose la question de la spécificité de ces différentes formes pour les membres de la famille des FGF. Il semble cependant exister une faible spécificité des FGFR vis à vis des différents FGF (Ruta et al., 1989 ; Dionne et al., 1990 ; Houssaint et al., 1990 ; Mansukhani et al., 1990 ; Keegan et al., 1991 ; Miki et al., 1991 ; Partanen et al., 1991). Les quatre membres de la famille des FGFR fixent le FGF-1 et le FGF-4, le FGF-2 n'est pas capable de se lier au FGFR-4 alors que les FGF-5, FGF-6 et FGF-7 agissent via le FGFR-3, le FGFR-4 et le FGFR-2 respectivement. La famille des FGF et de leurs récepteurs présentent un cas de double redondance unique par sa complexité puisqu'un même facteur peut se lier à plusieurs récepteurs et qu'un récepteur peut être activé par plusieurs facteurs.

Cette complexité de la spécificité ligand-récepteur est en outre accentuée par l'existence des différentes isoformes. Il a été décrit que les isoformes présentant des modifications dans la deuxième et la troisième boucle immunoglobuline montrent des spécificités différentes vis à vis de leur ligand. De même, la forme sécrétée de FGFR-1 (FGFR-1-III) fixe le FGF-2 avec une forte affinité mais ne fixe pas le FGF-1 (Duan et al., 1992). Par ailleurs, l'affinité et la spécificité des récepteurs transmembranaires peuvent varier selon l'exon transcrit pour la troisième boucle immunoglobuline (Werner et al., 1992).

Ces données mettent en évidence la complexité du système ligand-récepteur : d'une part, un récepteur donné peut fixer différents membres de la famille des FGF et d'autre part, un même gène peut conduire à plusieurs isoformes du même récepteur, chacune des ces isoformes fixant les différents FGF avec une affinité plus ou moins grande.

D) Sites de fixation de basse affinité du FGF-2 : Les protéoglycanes de type héparane sulfate

Les composés de type héparane sulfate (HS) sont des composants essentiels des cellules animales, ils sont localisés à la surface de la cellule et dans les matrices extracellulaires plus particulièrement au niveau des membranes basales (Gallagher et al., 1986 ; Kjellen et Lindahl, 1991). Ces HS sont présents au niveau des cellules sous la forme de protéoglycanes dont les chaînes polysaccharidiques sont liées de façon covalente au corps protéique (HSPG). En raison de leur forte densité de charges négatives, portées notamment par les groupements sulfates, les HSPG interagissent avec de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance dont le FGF-2 (Ruoslahti et Yamaguchi, 1991 ; Yanagishita et Hascall, 1992). Ils ont ainsi été décrits comme les sites de liaison de basse affinité (avec un Kd de l'ordre 10 nM) et de haute capacité (0,5 à 2 x 10^6 sites par cellules) du FGF-2 (revue dans Gallagher, 1994).

1°) Structure des HSPG

Les héparanes sulfates sont des glycosaminoglycanes (GAG) composés d'une chaîne linéaire d'unités disaccharidiques répétées. Au sein du polymère, la répartition des sucres sulfatés n'est pas constante générant ainsi des zones ou domaines hautement sulfatés séparés par des séquences peu sulfatées (figure 8). Dans les régions hautement sulfatées, l'unité disaccharidique est constituée de glucosamine N-sulfatée ($GlcNSO_3$) et d'acide iduronique (IdoA), les sites de sulfatation les plus fréquents étant le C6 de la glucosamine et le C2 de l'iduronate. La sulfatation en C3 des résidus glucosamine est un événement beaucoup plus rare. Dans les régions peu sulfatées, la glucosamine est N-acétylée (GlcNac) et liée à un acide glucuronique (GlcA). Cette unité disaccharidique GlcNac-GlcA se répète environ dix fois entre les domaines hautement sulfatés (revue dans Gallagher, 1994).

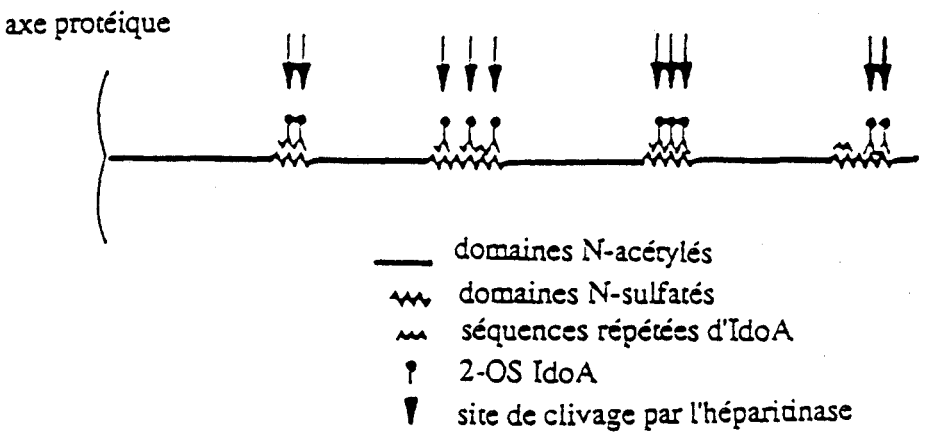


Figure 8 : Représentation schématique de la structure en domaines des chaînes d'héparane sulfates (HS).
Les chaînes linéaires d'HS présentent une structure organisée en domaines plus ou moins sulfatés. Les courts domaines sulfatés contiennent environ 5 disaccharides et sont séparés par de longues séquences N acétylées d'environ 18 disaccharides. La taille, la distribution des domaines sulfatés le long de la chaîne d'HS ainsi que le contenu en IdoA semblent rendre compte des capacités de liaison des HSPG.
D'après Gallagher et al., 1992.

La séquence oligosaccharidique liant le FGF-2 avec une grande affinité a été isolée à partir d'HS de fibroblastes de peau (Turnbull et al., 1992). Cette séquence nommée oligo-H est composée de sept unités disaccharidiques :

$$GlcA\text{-}GlcNSO_3\text{-}[IdoA,2S\text{-}GlcNSO_3]_5\text{-}IdoA\text{-}GlcNAc$$

Séquence oligo-H

La séquence oligo-H lie le FGF-2 avec une affinité identique à celle de la chaîne entière d'HS, elle est caractérisée par des domaines hautement sulfatés riches en $GlcNSO_3$ et en acide iduronique sulfaté en C2 (IdoA,2S). Cependant, il faut noter l'absence particulière des groupements sulfatés en C6 qui sont pourtant présents sur les HS isolés de fibroblastes ou d'autres types cellulaires. Une séquence similaire à la séquence oligo-H a également été identifiée, elle ne comporte que quatre répétitions du disaccharide $IdoA,2S\text{-}GlcNSO_3$ et fixe le FGF-2 avec une affinité un peu plus faible (Turnbull et al., 1992).

D'autres travaux ont par ailleurs souligné l'importance des résidus IdoA,2S et $GlcNSO_3$ pour les liaisons du FGF-2 aux HS et ont ainsi pu déterminer la séquence saccharidique minimale capable de lier le FGF-2 (Maccarana et al., 1993 ; revue dans Gallagher, 1994) ; elle correspond à un pentasaccharide dont la structure est la suivante :

$$HexA\text{-}GlcNSO_3\text{-}HexA\text{-}GlcNSO_3\text{-}IdoA,2S$$

HexA est le résidu hexuronate mais il peut être substitué par un résidu GlcA ou IdoA. Cette séquence présente une affinité beaucoup plus faible pour le FGF-2 que la séquence oligo-H mais sa taille semble toutefois correspondre au motif structural de base capable d'interagir avec le site de liaison présent sur la molécule de FGF-2. La plus forte affinité de la séquence d'oligo-H peut s'expliquer par le fait que cette dernière, étant de plus grande taille, pourrait acquérir une conformation favorisant la liaison du facteur de croissance. En outre, la présence de cinq répétitions d'unités disaccharidiques permettrait la fixation de deux molécules de FGF-2 créant ainsi un dimère de FGF-2 (revue dans Fernig et Gallagher, 1994). Il a d'ailleurs été proposé qu'une oligomérisation des FGF puisse être responsable de la dimérisation des FGFR,

de leur activation et consécutivement de la prolifération cellulaire (Spivak-Kroizman et al., 1994b).

2°) HSPG fixant le FGF-2

Quatre HSPG capables de fixer le FGF-2 ont été caractérisés. Le syndecan, le premier identifié, possède un domaine transmembranaire sur son corps protéique (Kiefer et al., 1990). Le glypican ne possède pas de domaine transmembranaire mais est retenu à la surface de la cellule par des glycosylphosphatidylinositol (GPI-HSPG) (David et al., 1990). Le bétaglycan est un autre type de protéohéparane sulfate membranaire constituant le récepteur de type III du TGFß. Il possède la particularité de lier le TGFß par son axe protéique et le FGF-2 par ses chaînes d'HS (Andres et al., 1992). Le perlecan est un HSPG de grande taille caractéristique des matrices extracellulaires et des membranes basales (Murdoch et al., 1992). Il reste néanmoins possible que des HSPG membranaires se trouvent également dans les matrices extracellulaires à proximité des cellules.

3°) Finalité de la liaison HSPG-FGF-2

La capacité de l'héparine à lier le FGF-2 est bien connue puisqu'elle permet de purifier de manière sélective ce facteur de croissance appelé également "Heparin Binding Growth Factor" (Burgess et Maciag, 1989). L'héparine protège le FGF de la dénaturation par la chaleur et des variations de pH (Gospodarowicz et Cheng, 1986) ainsi que des dégradations protéolytiques (Sommer et Rifkin, 1989). Ces propriétés de fixation et de protection sont retrouvées avec les héparanes sulfates protéoglycanes (Vigny et al., 1988) et les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (Saksela et al., 1988).

Les HSPG présents dans les matrices extracellulaires et les lames basales jouent des rôles importants dans les fonctions biologiques du FGF-2. Ils constituent entre autre un réservoir du facteur de croissance à proximité de la cellule (Flaumenhaft et al., 1989 ; Saksela et Rifkin, 1990 ; Vlodavsky et al., 1991) et représentent de cette manière une source de FGF-2

pour une stimulation à long terme de la prolifération des cellules endothéliales vasculaires (Flaumenhaft et al., 1989 ; Vlodavsky et al., 1991) et pour la différenciation des cellules PC12 (Rogelj et al., 1989). Le FGF-2 ainsi immobilisé par les HSPG peut être libéré après traitement par diverses enzymes telles que la plasmine (Saksela et Rifkin, 1990), l'héparanase (Bashkin et al., 1989 ; Ishai-Michaeli et al., 1990), la phospholipase C et D (Brunner et al., 1991-1994) ou encore la thrombine (Benezra et al., 1993). La balance stockage-libération du FGF-2 aurait un rôle clef dans la régulation de la fonction de ce facteur de croissance. De plus, le FGF-2 complexé aux chaînes d'HS est beaucoup plus stable que le FGF-2 libre, ce qui lui permet une plus grande diffusion (Flaumenhaft et al., 1990) pour aller agir sur ses cellules cibles et permettre notamment la stimulation de la production de l'activateur du plasminogène (revue dans Vlodavsky et al., 1991).

Outre le rôle de réservoir de FGF-2, il a été proposé que les HSPG membranaires ou les HS libres (héparine) étaient nécessaires à la fixation du FGF-2 sur ses récepteurs de haute affinité et par conséquent à l'activité biologique du facteur de croissance (Heath et al., 1991 ; Rapraeger et al., 1991 ; Yayon et al., 1991 ; Ornitz et al., 1992), la structure des chaînes d'HS pouvant déterminer une fonction activatrice ou inhibitrice pour le FGF-2 (Guimond et al., 1993). Nugent et Edelman (1992a) ont par ailleurs rapporté que les HS n'étaient pas indispensables à la liaison du FGF-2 aux FGFR mais qu'ils joueraient toutefois un rôle stabilisateur du complexe FGFR/FGF-2. Des études plus récentes réalisées à l'aide de récepteurs solubles ont confirmé cette dernière hypothèse, elles ont montré que l'héparine ou les HS augmentaient l'affinité de la liaison du FGF-2 à son récepteur (Pantoliano et al., 1994 ; Roghani et al., 1994). Pantoliano et al. (1994) ont ainsi défini les caractéristiques de liaison entre le FGF-2 et l'héparine, le FGF-2 et le FGFR, le FGFR et l'héparine au sein d'un complexe d'activation.

Différentes approches expérimentales ont permis de mettre en évidence l'implication de l'héparine ou des HS dans l'activité mitogène du FGF-2 (Rapraeger et al., 1991 ; Ornitz et al., 1992 ; Delehedde et al., 1996). Rapraeger et al. (1991) ont montré que des fibroblastes et des myoblastes traités à l'héparinase ou cultivés en présence d'un inhibiteur de la sulfatation des protéoglycanes n'étaient plus stimulés à proliférer sous l'action du FGF-2. Seule l'addition

d'héparine ou d'HS au milieu de culture pouvait restaurer l'activité mitogène de ce facteur de croissance. De même, Ornitz et al. (1992) ont décrit la nécessité des interactions FGFR-héparine pour l'activité du FGF-2. Plus récemment, Delehedde et al. (1996) ont démontré le rôle important des HSPG dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires. Ces auteurs ont montré que les HSPG étaient indispensables à l'activité du FGF-2 mais pouvaient également, en fonction de leur degré de sulfatation et/ou de leur quantité, réguler négativement l'activité du facteur de croissance.

En outre, les HSPG sont capables d'induire l'internalisation du FGF-2 conduisant ainsi à un mode d'endocytose autre que par les FGFR (Gannoun-Zaki et al., 1991 ; Roghani et Moscatelli, 1992 ; Rusnati et al., 1993). Ils auraient pour rôle de transporter le FGF-2 depuis le milieu extracellulaire jusqu'au cytoplasme. Selon Gleizes et al. (1995), le FGF-2 fixé aux HSPG peut être internalisé de différentes manières : par un mécanisme d'endocytose clathrine indépendant, par pinocytose ou par phagocytose. Après internalisation, le FGF-2 est dégradé dans les lysosomes. Par conséquent, ces auteurs ont suggéré que l'internalisation du FGF-2 induite par les HSPG serait un moyen de réguler la quantité de FGF-2 de la matrice extracellulaire, cette régulation étant un processus très important dans le contrôle de l'activité du facteur de croissance. Néanmoins, le FGF-2 internalisé par l'intermédiaire des HSPG n'est pas uniquement voué à une dégradation puisqu'il a été montré à partir de myoblastes L6, déficients en FGFR, que le complexe HSPG-FGF-2 pouvait conduire après internalisation à une réponse biologique telle que l'induction de l'activité uPA (Quarto et Almaric, 1994) conférant ainsi aux HSPG un rôle direct dans la transduction du signal du FGF-2.

E) Régulation des sites de liaison du FGF-2

1°) les FGFR

Les données exposées précédemment démontrent que les familles des FGF et de leurs récepteurs représentent un cas de double redondance unique par sa complexité puisqu'un même facteur peut se lier à plusieurs récepteurs et qu'un même récepteur peut être activé par plusieurs FGF. De plus, s'ajoute à cela la possibilité pour les FGFR de générer à partir du même gène plusieurs isoformes du même récepteur et d'agir par ailleurs selon différentes voies de transduction (cf. paragraphe suivant). La nécessité d'un tel système à redondances multiples pourrait s'expliquer par une possible spécificité tissulaire des ligands et surtout des récepteurs. Certaines études ont ainsi montré que l'expression *in vivo* des différents FGFR, voire de certaines formes d'épissages, peut être régulée de manière tissu voire cellule spécifique (revue dans Jhonson et Williams, 1993 ; Orr-Urtreger et al., 1993 ; Patstone et al., 1993) ou encore selon l'état de prolifération des cellules (Xin et al., 1994).

Il a été montré par dosages radiorécepteurs qu'une réduction de la prolifération ou une induction de la différenciation s'accompagnait d'une régulation de la quantité de FGFR. Ainsi, le nombre de récepteurs de haute affinité du FGF-2 diminue lorsque des cellules fibroblastiques, arrivées à confluence, arrêtent de proliférer (Veomett et al., 1989). Lors de la différenciation cellulaire, les résultats rapportés sont très controversés. Il a été décrit pour les cellules musculaires lisses (Olwin et Hauschka, 1988 ; Templeton et Hauschka, 1992 ; Olwin et al., 1994), les chondrocytes (Iwamoto et al., 1991) ou les cellules de tératocarcinomes (Pertovaara et al., 1993b) une diminution des FGFR à mesure que les cellules s'engagent vers une voie de différenciation terminale. Par contre, d'autres travaux menés sur des cellules de carcinomes embryonnaires ont montré que la différenciation s'accompagnait d'une augmentation de la quantité de FGFR (Mummery et al., 1993 ; Moscatelli, 1994 ; Ali et al., 1995).

L'implication d'une dérégulation des FGFR a également été envisagée dans les phénomènes pathologiques pour expliquer les bouleversements de la prolifération cellulaire.

Une amplification des gènes codants pour les récepteurs a notamment été rapportée dans les cancers de l'estomac (Hattori et al., 1990), les cancers du pancréas (Kobrin et al., 1993 ; Leung et al., 1994) ainsi que dans les cancers du sein (Adnane et al., 1991 ; Luqmani et al., 1992 ; Jacquemier et al., 1994 ; Penault-Llorca et al., 1995). En outre, des modifications dans l'expression d'un type de récepteur peuvent être liées à des changements du degré de différenciation des cellules épithéliales cancéreuses. Ainsi, dans le cas des cellules cancéreuses prostatiques indifférenciées, l'expression du FGFR-1 est augmentée alors que celle du FGFR-2 n'est plus détectable (Yan et al., 1993). De même pour les cellules d'astrocytome humain, une augmentation des FGFR-1 et une diminution des FGFR-2 sont corrélatives de la progression tumorale vers un phénotype indifférencié (Yamaguchi et al., 1994).

2°) les HSPG

Les HSPG sont largement distribués dans les matrices extracellulaires (revue dans Fernig et Gallagher, 1994). L'expression des syndecans, protoype des HSPG, peut varier en fonction du type cellulaire ou au sein d'un même type cellulaire en fonction du stade de développement (revue dans Elenius et Jalkanen, 1994 ; Kim et al., 1994 ; Sanderson et al., 1994 ; Salmivirta et Jalkanen, 1995). Comme pour les récepteurs de haute affinité, il peut exister une modification des quantités d'HSPG selon l'état de prolifération cellulaire. La réduction de la croissance de cellules fibroblastiques suite à une privation de sérum est associée à une augmentation des composés de type HSPG (Matuoka et al., 1985). D'autre part, les diminutions de prolifération en relation avec le développement du placenta de souris (Hondermarck et al., 1990b) ou du cerveau d'embryon de poulet (Hondermarck et al., 1992a, b) sont concomitantes d'une augmentation des quantités d'HSPG. Par ailleurs, plusieurs travaux menés *in vitro* sur des types cellulaires variés tels que les cellules de mélanomes (Caux et al., 1992 ; Moczar et al., 1993), les cellules tumorales de poumon et de foie (Timar et al., 1987-1995) ou encore les cellules cancéreuses mammaires (Mangakis et al., 1990 ; Delehedde et al., 1996-1997) ont montré qu'il existait une relation entre la quantité de composés de type HSPG et le potentiel invasif des cellules cancéreuses.

F) Devenir du ligand et transduction du signal

Les FGFR et les HSPG permettent l'internalisation du FGF-2 selon des voies différentes (Moscatelli, 1992 ; Roghani et Moscatelli, 1992 ; Reiland et Rapraeger, 1993). Le FGF-2 exogène est internalisé classiquement par endocytose des FGFR membranaires mais il peut également être internalisé lorsqu'il est uniquement lié aux HSPG de la surface cellulaire (Gannoun-Zaki et al., 1991 ; Roghani et Moscatelli, 1992 ; Rusnati et al., 1993 ; Quarto et Almaric, 1994 ; Gleizes et al., 1995). Une fois internalisé, le FGF-2 exogène peut se retrouver dans le noyau où il s'accumule dans le nucléole (Bouché et al., 1987 ; Baldin et al., 1990 ; Walicke et Baird, 1991). Il pourrait ainsi agir directement sur la transcription de certains gènes (Nakanishi et al., 1992 ; Almaric et al., 1994 ; Bouché et al., 1994). Il semble que cette localisation nucléaire du FGF-2 nécessite son interaction avec le complexe d'activation HS-FGFR car si l'un des composants de ce complexe est absent, le FGF-2 est certes internalisé mais ne se retrouve pas dans le noyau (Reiland et Rapraeger, 1993).

La majorité des signaux intracellulaires délivrés par le FGF est assurée par les récepteurs à activité tyrosine kinase qui sont activés après fixation du facteur de croissance. L'induction par les HSPG du changement de conformation et la dimérisation du FGF seraient suffisantes pour conduire au processus d'activation des FGFR et à la genèse du signal de transduction (Rapraeger et al., 1991 ; Yayon et al., 1991 ; Ornitz et al., 1992). L'activation des récepteurs tyrosine kinase des FGF conduit à 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 de deux types de récepteurs différents (FGFR-1 et FGFR-2 par exemple) ou de deux variants d'un même type (forme à deux ou trois boucles de type immunoglobuline). Des protéines à domaines SH2 (Src Homology 2) et SH3 peuvent alors se fixer sur les tyrosines phosphorylées (Koch et al., 1991), être activées à leur tour par phosphorylation et transmettre ainsi le signal à l'élément suivant. La cascade de transduction se propage alors jusqu'au noyau où des facteurs de transcription tels que c-myc et c-fos (Müller et al., 1984) sont activés pour modifier

l'expression des gènes et par voie de conséquence, la synthèse de protéines (Hondermarck et al., 1994), ceci afin d'enclencher notamment les processus de la division cellulaire (Ullrich et Schlessinger, 1990).

Plusieurs voies de transduction du signal, dépendant du type cellulaire et de la réponse induite par le FGF, ont été caractérisées. La phospholipase Cγ (PLC-γ) est une enzyme capable d'hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate en diacylglycérol et en inositol triphosphate activant ainsi la protéine kinase C (PKC) et augmentant le taux de calcium intracellulaire. Cette PLC-γ est un substrat cytoplasmique usuel des FGFR (Burgess et al., 1990a), elle s'associe aux récepteurs par un domaine SH2 (Mohammadi et al., 1992). L'utilisation de cette voie de transduction par le FGF est toutefois controversée ; elle dépendrait d'une part du type cellulaire étudié (Hicks et al., 1989) et d'autre part, des fonctions biologiques assurées par le FGF-2. Ainsi, la voie des inositides ne serait pas impliquée dans l'activité mitogène et dans l'activité neurotrophique de ce facteur de croissance puique la suppression de la phosphorylation de la PLCγ après remplacement de la Tyr-766 du FGFR par une phénylalanine n'altère ni la stimulation de la prolifération (Mohammadi et al., 1992 ; Peters et al., 1992) ni la poussée de neurites de cellules PC12 (Spivak-Kroizman et al., 1994a). La transduction du signal FGF-2 par la PLCγ serait impliquée dans d'autres fonctions biologiques telles que la mobilité cellulaire (Mohammadi et al., 1992 ; Peters et al., 1992).

Outre la PLCγ, une autre voie d'action des FGF via les FGFR est la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) ou ER kinases (Extracellular-Signal-Regulated Kinases) (Pages et al., 1993 ; Wang et al., 1994 ; Besser et al., 1995 ; Campbell et al., 1995). Cette voie passe par l'activation préalable des protéines Ras/Raf1 (Blenis, 1993 ; McNicol et al., 1993 ; Lallemain, 1994 ; Besser et al., 1995 ; Campbell et al., 1995). Les substrats des MAP kinases peuvent être cytoplasmiques (phospholipase A2 et autres kinases) ou nucléaires (les facteurs de transcription c-myc et c-jun) (revue dans Marshall, 1994).

Les seconds messagers qui interviennent dans la transduction du signal par les FGFR sont encore mal connus par rapport à d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur de l'EGF (Ullrich et Schlessinger, 1990 ; Fantl et al., 1993). Actuellement, aucun consensus n'existe sur le rôle de l'hydrolyse des phosphatidylinositols, l'activation de la PKC

ou la mobilisation du calcium intracellulaire dans le mécanisme d'action du FGF-2. Le rôle du calcium par exemple est très discuté. En effet, la libération de calcium après activation de la PLCγ ne semble pas nécessaire à l'activité mitogène (Mohammadi et al., 1992 ; Peters et al., 1992) ou à l'activité neurotrophique (Spivak-Kroizman et al., 1994a). Toutefois, des inhibitions des canaux calciques peuvent empêcher la croissance des neurites induites par le FGF-2 (Williams et al., 1994). Il en est de même pour l'activation de la PKC qui peut inhiber la synthèse d'ADN induite par le FGF-2 dans les cellules endothéliales de capillaires (Doctrow et Folkman, 1987) alors qu'elle semble indispensable à la division des cellules endothéliales bovines aortiques (Presta et al., 1989).

Ainsi, les modes de transduction du signal FGF-2 apparaissent très complexes ce qui pourrait justifier, au moins en partie, des effets pléiotropiques assurés par ce facteur de croissance.

G) Le FGF-2, facteur de croissance multifonctionnel

La famille des FGF, et plus particulièrement le FGF-2 est le prototype des facteurs de croissance pleitropiques. Le FGF-2 est impliqué dans divers processus biologiques fondamentaux tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la réparation tissulaire, le développement embryonnaire ou encore, l'angiogénèse. Il n'est pas surprenant par conséquent que ce facteur de croissance ait un rôle important dans de nombreux phénomènes intervenant au cours de la cancérogenèse.

1°) La prolifération et la différenciation cellulaires

Le FGF est un puissant mitogène d'une grande variété de cellules essentiellement d'origine mésodermique et neurectodermique. De nombreux types cellulaires répondant au FGF par une stimulation de leur prolifération peuvent également se différencier sous l'influence de ce facteur de croissance. Dans le système nerveux par exemple, le FGF exerce un rôle mitogène,

différenciateur et est également un facteur de survie. Associé à des matrices extracellulaires artificielles composées d'héparine, il augmente l'adhésion, l'agrégation et la poussée de neurites de neurones mises en culture (Schubert et al., 1987 ; Walicke, 1988 ; Rogelj et al., 1989), il peut par ailleurs induire leur activité acétylcholine transférase (Unsicker et al., 1987) et augmenter leur survie après lésion du système nerveux central (Anderson et al., 1988). Pour d'autres types cellulaires, le FGF n'a pas d'effet mitogène et agit exclusivement sur la différenciation. C'est le cas des cellules de phéochromocytome PC12 pour lesquelles le FGF-2, au même titre que le NGF (Nerve Growth factor), est capable de provoquer l'arrêt de leur prolifération et d'induire une poussée de neurites (Togari et al., 1983-1985 ; Neufeld et al., 1987 ; Rydell et Greene, 1987). Le FGF-2 peut également stimuler la différenciation des cellules photoréceptrices de la rétine (Hicks et Courtois, 1992 ; Tcheng et al., 1994) mais inhibe par contre la différenciation de cellules musculaires (Clegg et al., 1987 ; Hannon et al., 1996) et de chondrocytes en phase terminale (Iwamoto et al., 1991).

2°) Le développement embryonnaire

Le FGF-2 joue un rôle important dans les premiers stades du développement embryonnaire puisqu'il est capable d'affecter la destinée de l'ectoderme (induction mésodermique) dans les embryons précoces de Xénope (Kimelman et al., 1988 ; Slack et Isaacs, 1989) et de poulet (Mitrani et al., 1990). Le FGF et ses récepteurs ont par ailleurs été recherchés pendant les phases ultérieures du développement. Ainsi, Seed et al. (1988) ont détecté la présence de FGF dans l'embryon entier de poulet et ont montré que le niveau de ce facteur de croissance est relativement stable entre les jours 2 à 9 mais qu'ensuite, il augmente fortement jusqu'au treizième jour. Liu et Nicoll (1988) ont rapporté que des anticorps anti-FGF-2 étaient capables de retarder la croissance et la différenciation de l'ensemble des tissus embryonnaires et principalement des tissus mésodermiques.

Par ailleurs, la présence de FGF ou de ses récepteurs au niveau d'organes embryonnaires particuliers a été décrit dans le cas du bourgeon de membre (Seed et al., 1988) où le FGF exercerait une propriété morphogène au cours du développement, mais également

dans le cas du rein (Riseau et Ekblom, 1986), de la rétine, de l'humeur vitrée (Mascarelli et al., 1987) et du cerveau (Thomas et al., 1991 ; Hondermarck et al., 1992).

3°) Cicatrisation et régénération tissulaire

Le FGF-2 est impliqué dans de nombreux phénomènes intervenant au cours du processus de réparation tissulaire (migration, prolifération et différenciation). Il exerce ses effets dès la première étape de la cicatrisation (revue dans Basilico et Moscatelli, 1992) qui consiste en la mise en place d'un tissu cicatriciel, encore appelé tissu de granulation, en induisant la migration et la prolifération des cellules du tissu conjonctif au niveau de la blessure (Buntrock et al., 1984 ; Buckley-Sturrock et al., 1989). Après la mise en place du tissu de granulation, il s'établit une néovascularisation au cours de laquelle le FGF-2 libéré par les endothéliums lésés joue un rôle angiogène très important (Gadjusek et Carbon, 1989 ; revue dans Klagsbrun, 1989). De plus, le FGF *in vivo* favorise la cicatrisation de l'épithélium et de l'endothélium de cornée après lésion (Gospodarowicz et Greenburg, 1979 ; Petroutos et al., 1984) et intervient dans la cicatrisation de l'épiderme (Fourtanier et al., 1986).

Le FGF est également impliqué dans la régénération tissulaire, notamment lors de la régénération du membre de pleurodèle (Boilly et al., 1990), du foie (Kan et al., 1989), du cartilage (Jentzsch et al., 1980) ou des nerfs périphériques (Danielsen et al., 1988 ; Aebischer et al., 1989).

4°) L'angiogénèse

Ce phénomène met en jeu des processus de migration, de prolifération et de différenciation des cellules endothéliales ainsi que des résorptions de la matrice extracellulaire permettant la progression des néoformations vasculaires. Chacun de ces processus peut être régulé par le FGF puisqu'il est capable de stimuler *in vitro* et *in vivo* la prolifération des cellules endothéliales (revue dans Folkman et Klagsbrun, 1987), de favoriser leur migration, ce facteur étant d'ailleurs chémotactique pour ces cellules (Presta et al., 1986) et d'induire *in vitro* leur organisation en structure tubulaire (Montesano et al., 1986). Le FGF active également la

dégradation des membranes basales et de la matrice extracellulaire en stimulant la production d'enzymes protéolytiques par les cellules endothéliales telles que la collagènase I (Chua et al., 1987) et l'activateur du plasminogène (Presta et al., 1986 ; Saksela et al., 1987). La digestion des membranes basales par ces enzymes permet la migration des cellules endothéliales et la formation de nouveaux capillaires. En outre, le pouvoir angiogénique du FGF a été bien démontré *in vitro* par des tests classiques d'angiogénèse réalisés sur la membrane chorio-allantoidienne de poulet et sur la cornée de lapin (Lobb et al., 1985 ; Gospodarowicz et al., 1986).

Par ailleurs, la surexpression des FGF-1 et FGF-2 au cours du développement du cerveau (Riseau, 1986) et du rein (Riseau et Ekblom, 1986), au moment où la vascularisation de ces organes est intense, est un argument qui conforte le rôle de ces facteurs de croissance dans l'angiogénèse *in vivo*. Par ailleurs, des anticorps anti-FGF-2 injectés dans des embryons de rat sont capables d'inhiber la vascularisation (Liu et Nicoll, 1988).

5°) La cancérogenèse

La transfection de cellules NIH 3T3 par le FGF-2 en tant que tel n'induit pas leur transformation. Toutefois, lorsque le facteur de croissance est associé à un peptide signal (signal de sécrétion), il devient fortement transformant : les cellules NIH 3T3 transfectées présentent alors *in vitro* des caractéristiques de cellules transformées et sont tumorigènes *in vivo* dans les souris nude (Blam et al., 1988 ; Rogelj et al., 1988).

Plus récemment, un travail mené sur des cellules épithéliales mammaires normales humaines et immortalisées (cellules HBL100) a proposé que le FGF-2 serait un facteur impliqué dans les événements précoces de la transformation néoplasique des cellules mammaires (Souttou et al., 1994). Mais cette hypothèse reste limitée ; elle n'a été fondée en effet que sur l'observation d'une stimulation autocrine de la prolifération des cellules. D'autres résultats avaient suggéré auparavant que la transfection par l'ADNc du FGF ne transformerait pas les cellules transfectées elles-mêmes mais aurait un rôle paracrine conduisant à la transformation des cellules voisines (Jaye et al., 1988 ; Blam et al., 1989). Quoiqu'il en soit, le FGF-2 et/ou

ses récepteurs ont été détectés dans de nombreuses biopsies cancéreuses dont les cellules leucémiques (Moscatelli et al., 1986a), les cellules cancéreuses de la prostate (Matsuo et al., 1987) et de la vessie (Chodak et al., 1986), les gliomes et les méningiomes (Takahashi et al., 1990), les cancers du côlon (New et Yeoman, 1992 ; Wilkinson et al., 1993 ; Murgue et al., 1994), les adénocarcinomes pulmonaires (Takanami et al., 1996) ou encore les cancers du sein (Peyrat et al., 1991-1992 ; Luqmani et al., 1992 ; Anandappa et al., 1994 ; Penault-Llorca et al., 1995). En outre, de nombreux types cellulaires tumoraux sont stimulés à proliférer sous l'action du FGF-2 et il a été montré, pour la plupart des cellules cancéreuses produisant du FGF-2, que ce facteur de croissance assure une stimulation autocrine de leur prolifération (Halaban et al., 1988 ; Becker et al., 1989 ; Gross et al., 1993 ; Morrison et al., 1993 ; Emoto et al., 1994 ; Stan et al., 1995).

De plus, le FGF-2, par le biais de son effet angiogène, peut exercer un rôle indirect sur la croissance tumorale. Les tumeurs solides constituent en effet une des pathologies où la néovascularisation est très importante (revue dans Folkman et Klagsbrun, 1987). Cette angiogénèse tumorale évite l'hypoxie des cellules les plus internes de la tumeur et assure la croissance de cette dernière. Le FGF-2 a d'ailleurs été caractérisé comme le principal facteur angiogène purifié des tissus tumoraux (Folkman et Klagsbrun, 1987 ; Vlodavsky et al., 1990). Depuis, son rôle a été démontré puisque l'administration *in situ* d'anticorps anti-FGF-2 dans les tumeurs gliales humaines inhibe nettement la néovascularisation, les tumeurs restant en outre de petite taille (Stan et al., 1995). Czubayko et al. (1994) ont permis d'élucider le mécanisme par lequel le FGF-2 immobilisé dans les matrices extracellulaires peut être solubilisé et activé : des protéines fixant le FGF-2 ("Binding proteins") seraient responsables de la mobilisation du facteur de croissance et de son activation induisant ainsi la prolifération et l'angiogénèse tumorales. Ces "binding proteins" sont fortement exprimées dans les carcinomes squameux et les kératinocytes immortalisés alors qu'elles sont absentes dans les tissus sains.

Outre l'angiogénèse et la croissance tumorale, le FGF-2 peut exercer des effets sur la migration des cellules cancéreuses et participer ainsi à la formation de métastases. Le rôle motogène du FGF-2 est largement démontré par ses capacités angiogèniques (cf. paragraphe 4). Par conséquent, il n'est pas surprenant que plusieurs membres de la famille des FGF soient

impliqués dans les processus métastatiques. Ainsi, la transfection par le FGF-4 des cellules cancéreuses mammaires non métastatiques MCF-7 induit ces dernières à former des tumeurs capables de métastaser dans les souris nude (McLeskey et al., 1993). De même dans les tumeurs mammaires de souris, l'expression du FGF-4 est également associée au phénotype métastatique (Murakami et al., 1990). L'implication du FGF-2 dans le potentiel invasif des cellules a également été rapportée. La transfection par le FGF-2 des cellules NIH 3T3 augmente leur mobilité et leur pouvoir invasif (Taylor et al., 1993). En outre, Hasegawa et al. (1994) ont démontré que ce facteur de croissance induit de façon dose dépendante l'invasion de cellules cancéreuses pancréatiques et que l'addition d'anticorps dirigés contre le récepteur du FGF supprime le comportement invasif des cellules. Tout récemment, Galzie et al. (1997) ont rapporté des observations similaires pour des cellules de carcinomes de côlon. Ces auteurs ont montré d'une part que des cellules non invasives sont capables d'envahir sous l'influence du FGF-2 le gel de collagène sur lequel elles étaient cultivées et d'autre part que ce facteur de croissance augmente l'invasion de cellules possédant de manière constitutive un potentiel invasif. En outre pour ces dernières, l'addition d'anticorps dirigés contre le FGF-2 réduit leur capacité d'invasion suggérant ainsi une relation de cause à effet entre la production endogène de FGF-2 et le potentiel invasif des cellules de carcinome de côlon humain. Par ailleurs, il a été rapporté pour des cellules cancéreuses mammaires, et non pour leur homologues normales, que l'induction de replis membranaires nécessaires à la migration requiert l'activation par le FGF-2 du récepteur FGFR-4 (récepteur surexprimé dans de nombreux carcinomes mammaires) (Johnston et al., 1995b). Enfin, le FGF-2 peut être impliqué dans les processus de migration et d'invasion cellulaires via une stimulation de la production d'enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire. Ainsi, dans le cas des cellules épithéliales cancéreuses mammaires, le FGF-2 accroît l'activité de l'activateur du plasminogène de type urokinase (Mira-y-Lopez et al., 1986) et stimule la production de la protéine induite par les oestrogènes, pS2 (Miyashita et al., 1994), protéine présentant une homologie de séquence avec l'oligo-1,6-glucosidase et pouvant par conséquent contribuer à la dégradation des glycoprotéines matricielles (Tomasetto et al., 1990).

En regard de l'ensemble des données relatives au rôle du FGF-2 dans la cancérogenèse, il apparaît que ce facteur de croissance est impliqué à la fois dans la prolifération, la vascularisation et la migration des cellules tumorales.

VI) Propriétés et activités biologiques d'inhibiteurs de la prolifération

A) Le TGFß1

Le TGFß1 est le prototype d'une très grande famille de molécules présentant entre elles de fortes homologies de séquence. La "superfamille" du TGFß est composée actuellement de plus de trente molécules distinctes trouvées dans de nombreuses espèces depuis la drosophile jusque l'homme et intervenant dans la régulation de la croissance, la différenciation et le développement (figure 9). Au sein de cette famille, on distingue cinq isoformes du TGFß (TGFß 1-5) présentant à la fois une analogie de structure (supérieure à 70%) et une similitude fonctionnelle ainsi que des molécules de structure plus éloignée (analogie de structure inférieure à 40%) ayant des fonctions biologiques distinctes telles que l'activine et l'inhibine (polypeptide qui active ou inhibe la production de FSH par les cellules pituitaires), l'hormone anti-müllérienne (AMH ou MIS), des facteurs morphogénétiques (BMP : Bone morphogenetic Protein ; GDF : Growth Differentiation Factor ; le produit du gène décapentaplégique, nécessaire à la formation de l'axe dorso-ventral dans les embryons précoces ; Vg1, intervenant dans la formation de l'axe embryonnaire et l'induction du mésoderme chez le Xénope ; les protéines 60A chez la drosophile, dorsaline chez le poulet et nodal chez la souris impliquées également dans le développement de ces différents organismes) et certains facteurs neurotrophiques (GDNF, Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) (revue dans Kingsley, 1994). Parmi les cinq isoformes du TGFß connues à l'heure actuelle, trois seulement sont exprimées chez les mammifères (TGFß1, ß2 et ß3). Bien que des différences fonctionelles subtiles existent entre ces trois membres, ils partagent une grande diversité de fonction et peuvent être considérés comme des produits de gènes redondants.

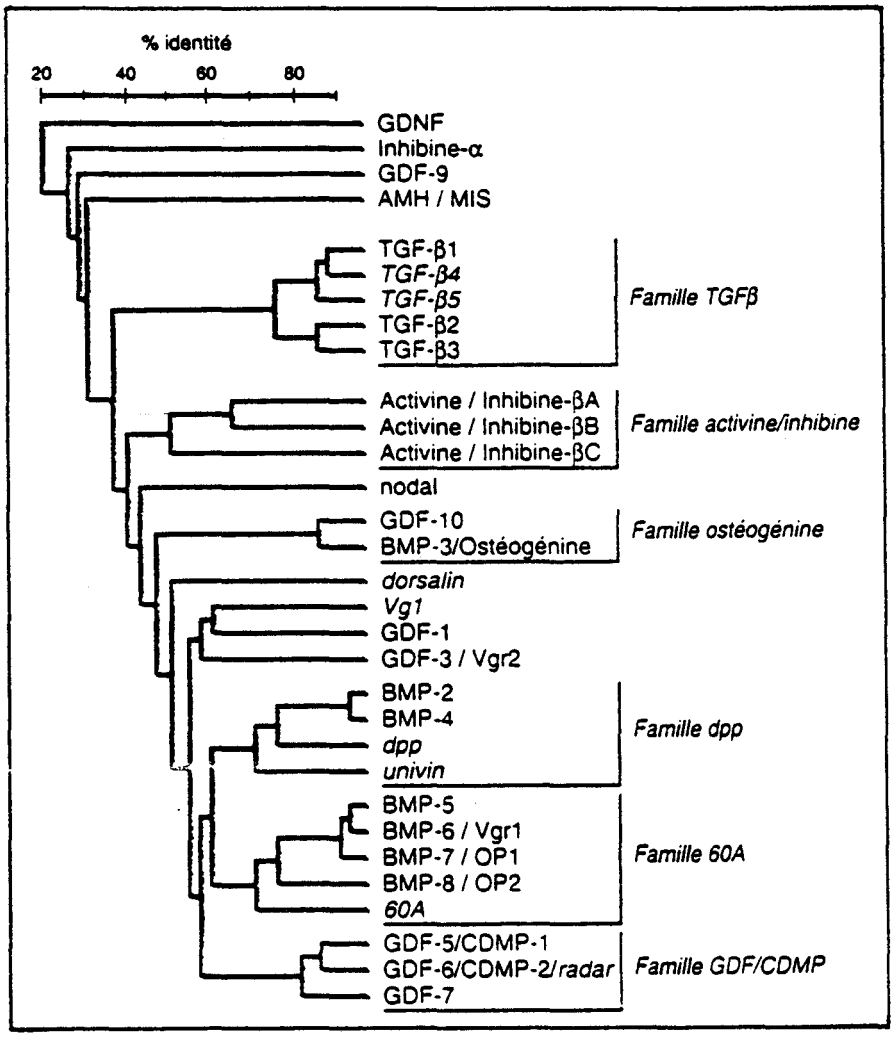
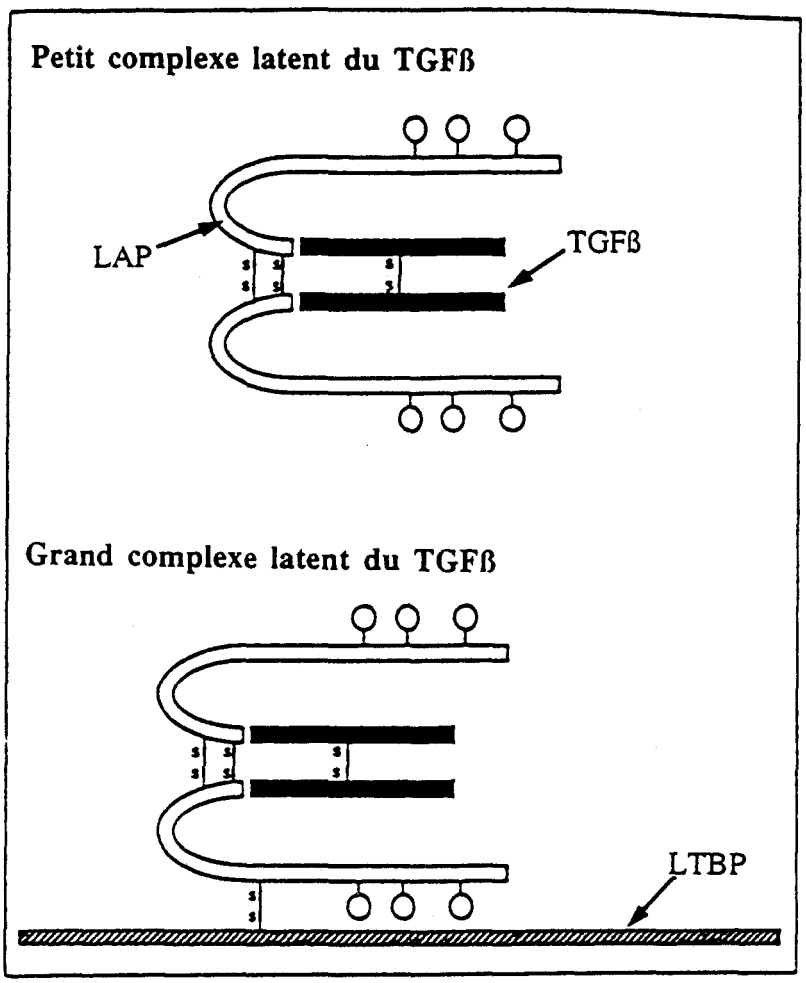


Figure 9 : La superfamille du TGFß.
La famille du TGFß comprend une multitude de facteurs distincts qui peuvent être regroupés en sous-familles (encadrées) sur la base de leur identité de séquence. Tous ces facteurs ont été caractérisés chez les mammifères à l'exception de TGFß5 et Vg1 (Xénope), TGFß4 et dorsalin (poulet), dpp et 60A (drosophile) et univin (oursin).
GDNF : Glial cell line-derived Neurotrophic Factor ; BMP : Bone morphogenetic Protein ; GDF : Growth/Differentiation Factor ; OP : Osteogenic Protein ; dpp : decapentaplegic peptide ; AMH: Anti-mullerian Hormone ; MIS : Mullerian Inhibiting Substance ; CDMP : Cartilage-derived Morphogenetic Protein.
D'après Feige et al., 1996.

1°) Structure du TGFß

Le TGFß sous sa forme biologiquement active est un homodimère de 25 kDa . Chaque élément du dimère a un poids moléculaire de 12,5 kDa et est relié à son homologue par un pont disulfure, les deux chaînes étant orientées de façon antiparallèle (Archer et al., 1993). Le TGFß est cependant synthétisé et sécrété par une grande variété de cellules sous une forme latente incapable de reconnaître ses récepteurs (figure10). L'expression du gène du TGFß1 par recombinaison génétique dans des cellules de mammifères conduit en effet à la sécrétion d'un précurseur, le pro-TGFß1 ou "petit complexe latent" (Gentry et al., 1987 ; Brown et al., 1990b). Ce complexe, d'une masse moléculaire de 105 kDa, est le produit d'un seul gène. La protéine pré-pro-TGFß1 consiste en deux chaînes polypeptidiques de 390 acides aminés reliées entre elles par des ponts disulfure. Chacune des chaînes contient plusieurs sites de glycosylation et des groupements mannose-6-phosphate. La partie précurseur dénommée LAP (Latency-Associated Peptide), également un homodimère relié par deux ponts disulfure, reste associée au peptide carboxyterminal correspondant au TGFß actif par des liaisons non covalentes ; l'ensemble formant un complexe latent biologiquement inactif (revue dans Feige et al., 1996). Cette structure précurseur est présente pour tous les membres de la "superfamille" du TGFß et semble essentielle au repliement et au transport du complexe.

Dans le milieu de culture de diverses cellules ainsi que dans les plaquettes sanguines, une forme latente du TGFß de plus haut poids moléculaire (235-265 kDa) a également été caractérisée et purifiée (Miyazono et al., 1989-1993). En fait, une protéine additionnelle est fréquemment associée au petit complexe latent pour donner le "grand complexe latent". Cette protéine d'un poids moléculaire de 125 à 160 kDa a été appelée LTBP (Latent TGFß Binding Protein), elle est liée de façon covalente à LAP par l'intermédiaire d'un pont disulfure. La LTBP est une glycoprotéine soluble contenant 16 à 18 répétitions de motifs de type EGF (motifs riches en résidus cystéines trouvés dans beaucoup de protéines et intervenant dans les interactions protéine-protéine), 3 à 4 répétitions de huit résidus cystéines et une séquence RGD (séquence de reconnaissance de molécules de la matrice extracellulaire) (revue dans Feige et al., 1996). La LTBP est impliquée dans la sécrétion du TGFß et dans son association avec la matrice



s–s : pont disulfure

LAP : Latency-Associated Peptide

LTBP : Latent TGFß Binding Protein

♀ ♀ : Sites de Glycosylation

Figure 10 : Représentation schématique des complexes latents du TGFß.
D'après Lawrence, 1996.

extracellulaire (Taipale et al., 1994b). En outre, la neutralisation de l'activité ou de l'expression de la LTBP à l'aide d'anticorps ou d'oligonucléotides anti-sens a permis d'établir son implication dans l'activation du TGFß latent (Flaumenhaft et al., 1993).

Par ailleurs, dans le plasma humain, la forme latente du TGFß a été identifiée comme étant un complexe α_2-macroglobuline-TGFß (O'Connor-McCourt et Wakefield, 1987). Ce complexe représente une forme de transport du TGFß ou une forme de neutralisation réversible de son activité (revue dans Feige et al., 1996).

2°) Activation du TGFß

Un type cellulaire donné synthétise et sécrète souvent plusieurs types de formes latentes simultanément. Aussi, la capacité que possède chaque type cellulaire d'activer ces différents complexes latents apparaît comme un élément déterminant dans le contrôle des fonctions biologiques du TGFß (revue dans Feige et al., 1996).

In vitro, les différentes formes latentes peuvent être activées par divers traitements physico-chimiques tels que des pH extrêmes, des agents chaotropiques (SDS, urée) ou par chauffage à 80°C (Brown et al., 1990b) suggérant fortement que les interactions LAP-TGFß sont réalisées par des liaisons hydrogènes. Le mécanisme physiologique d'activation du TGFß le mieux caractérisé est celui réalisé par l'action des protéinases (plasmine, cathepsine D) (Harpel et al., 1992) ; l'activation par la plasmine notamment se ferait à la surface de la cellule (revue dans Feige et al., 1996). Par ailleurs, le traitement du TGFß latent *in vitro* par de fortes concentrations de glycosidases (neuraminidase, N-glycosidase-F) ou de groupements glucidiques (acide sialique, mannose-6-phosphate) peut également l'activer. Toutefois, les doses importantes requises pour cette activation suggèrent que ce processus n'a probablement pas lieu *in vivo* (Miyazono et al., 1989 ; Brown et al., 1990b). Dans les conditions physiologiques, outre l'activation par la plasmine, le TGFß latent peut également être activé par la thrombospondine (protéine trimérique sécrétée par les plaquettes sanguines et activée par la thrombine) (Schultz-Cherry et Murphy-Ullrich, 1993). La thrombospondine est capable d'activer à la fois la petite et la grande forme latente (Schultz-Cherry et al., 1994). La libération

du facteur de croissance actif résulte d'un changement conformationnel du complexe LAP-TGFß induit par l'association moléculaire de la thrombospondine et de la protéine LAP ; l'association covalente de LTBP à ce complexe ne semble pas gêner cette interaction.

Le TGFß activé peut alors interagir avec ses récepteurs membranaires.

3°) Récepteurs (TGFßR) et protéines fixant le TGFß

Le TGFß exerce ses nombreux effets biologiques par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ubiquitistes de forte affinité. Trois molécules transmembranaires de poids moléculaire de 53, 70 à 80 et 200 à 400 kDa ont été appelées récepteurs du TGFß de type I, II et III respectivement (revue dans Lawrence, 1996).

Les TGFßRI et RII sont doués d'une activité sérine-thréonine kinase intrinsèque portée par leur domaine cytoplasmique, ces deux récepteurs étant nécessaires à l'action du TGFß sur les cellules de mammifères (Wrana et al., 1994). Le récepteur de type II est une kinase activée de façon constitutive qui peut s'autophosphoryler en de nombreux sites. La liaison du TGFß sur le TGFßRII induit une hétérodimérisation RI/RII à laquelle fait suite une transphosphorylation du domaine cytoplasmique de RI par RII et conduit à la stimulation de l'activité sérine-thréonine kinase du TGFßRI (figure 11). Cela déclenche la cascade réactionnelle intracellulaire conduisant à l'effet biologique. Par ailleurs, il a été montré que ces deux récepteurs peuvent exister sous forme d'homodimère suggérant que le complexe fonctionnel serait en fait un hétérotétramère (revue dans Lawrence, 1996). L'affinité de la liaison du TGFß sur ses récepteurs de type II est de l'ordre du pM (5 à 50 pM).

Le récepteur de type III du TGFß est le bétaglycan (Cheifetz et al., 1988), protéoglycane ancré dans la membrane cytoplasmique. Il est composé d'un grand domaine extracellulaire contenant des chaînes d'héparane sulfate et de chondroitine sulfate, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique ne portant pas de structure de signalisation. L'affinité du TGFß pour le bétaglycan est relativement haute ($Kd>10^{-9}$ M). Ce récepteur ne semble pas participer à la transduction du signal, il serait un récepteur de stockage

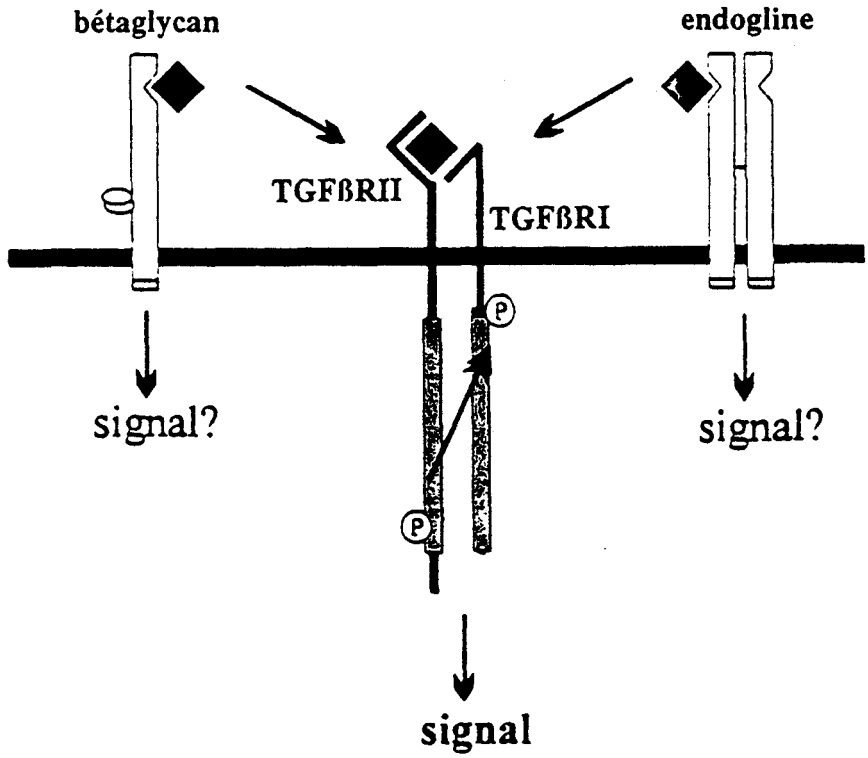


Figure 11 : Représentation schématique des complexes hétéromériques formés par les récepteurs du TGFß. Les récepteurs de type I et de type II (TGFßRI et RII) possèdent une activité sérine-thréonine kinase. Après fixation du TGFß, le TGFßRII peut phosphoryler le TGFßRI. Le bétaglycan (TGFßRIII) et l'endogline ont pour rôle de présenter le TGFß a ses deux récepteurs de signalisation.
D'après Koli, 1995.

présentant le TGFß avec une affinité accrue à ses deux récepteurs de signalisation (figure 11) (revue dans Lawrence, 1996).

L'endogline est une autre protéine capable de fixer le TGFß. Elle est trouvée dans les cellules endothéliales et montre une homologie de séquence avec le bétaglycan. En outre, dans les cellules dépourvues de bétaglycan, elle peut avoir des fonctions similaires à celui-ci (Cheifetz et al., 1992). L'endogline fixe le TGFß1 et ß3 et peut former des complexes hétéromériques avec les récepteurs de type I et II (figure11) (Yamashita et al., 1994).

Par ailleurs, d'autres composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la décorine, le biglycan et d'autres protéoglycanes peuvent fixer le TGFß avec des affinités variables mais les caractéristiques de ces interactions ne sont pas encore clairement établies (revue dans Lawrence, 1996).

Plusieurs autres récepteurs ou protéines de liaison du TGFß ont été identifiés à partir de sources variées mais ils sont actuellement moins bien caractérisés. Le récepteur de type IV est une protéine de 60 kDa qui a été détectée uniquement à la surface de cellules tumorales d'hypophyse de rat ; ce récepteur semble être une protéine de liaison commune au TGFß1, aux activines et aux inhibines (revue dans Fynan et Reiss, 1993). Le récepteur de type V est une glycoprotéine de 400 kDa exprimée à la surface d'une grande variété de cellules (épithéliales, endothéliales, fibroblastes et chondrocytes), son rôle dans la transduction du signal est inconnu (revue dans Fynan et Reiss, 1993). La "protéine de binding" VI est une glycoprotéine de 180 kDa, la fixation du TGFß1 à ce récepteur semble dépendre de la présence de TGFß2 (Segarini et al., 1992).

La protéine majeure de liaison du TGFß dans le plasma est l'α_2-macroglobuline (cf. paragraphe ci-dessus : activation du TGFß). Le TGFß lié à l'α_2-macroglobuline ne peut pas se fixer à ses récepteurs de la surface cellulaire mais peut pénétrer dans la cellule après transconformation par des protéases de l'α_2-macroglobuline et liaison du complexe TGFß-α_2-macroglobuline sur le récepteur de l'α_2-macroglobuline (α_2M/LRP), homologue du récepteur des LDL (Low Density Lipoproteins). La liaison est suivie d'une entrée dans la voie de dégradation lysosomale (revue dans Feige et al., 1996). Par ailleurs, le fucoïdane (hydrate de carbone polyanionique) et l'héparine peuvent fixer le TGFß1 et inhiber son interaction avec

l'α_2-macroglobuline. Ces substances peuvent aussi protéger le TGFß1 de la protéolyse enzymatique et cellulaire conduisant ainsi à une accumulation de l'activité du facteur de croissance (McCaffrey et al., 1994).

4°) Transduction du signal

La multitude d'effets biologiques assurés par le TGFß laisse supposer que plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la transduction du signal.

Le TGFß inhibe la prolifération des cellules en bloquant le cycle cellulaire en phase tardive de G1 empêchant ainsi le passage à la phase S (Laiho et al., 1990a ; Geng et Weinberg, 1993 ; Koff et al., 1993 ; Kletsas et al., 1995). Cet effet du TGFß passe pour certains types cellulaires par une diminution du taux d'AMPc suggérant que ce facteur agit sur des protéines G, notamment les protéines Gi qui inhibent l'activité adénylate cyclase et réduisent par conséquent le taux d'AMPc (Howe et al., 1989). Un des éléments clef dans la transduction du signal inhibiteur de prolifération porté par le TGFß1 est la protéine Rb (protéine suppresseur de tumeur) que le TGFß1 maintient dans un état hypophosphorylé empêchant ainsi la progression dans le cycle cellulaire (Laiho et al., 1990a). Les différentes molécules contrôlant la phosphorylation de la protéine Rb sont les cyclines D et E et les protéines kinases dépendantes des cyclines (cdk) qui leur sont associées : cdk-2, cdk-4 et cdk-6. La phosphorylation de Rb est supprimée après inhibition des activités kinases des complexes cycline E/cdk-2, Cycline D/cdk-4 et cycline D/cdk-6. Or, le TGFß1 est capable d'agir à différents niveaux afin d'inhiber ces complexes. Il peut en autre diminuer l'expression de la cycline E (Geng et Weinberg, 1993) et de la cdk-2 (Raynal et Lawrence, 1995), empêcher l'association cycline E/cdk-2 (Koff et al., 1993) et inhiber la synthèse de cdk-4 (Ewen et al., 1993). En outre, le TGFß1 induit la synthèse de cki, inhibiteurs des cdk tels que p21-WAF (Harper et al., 1993 ; Polyak et al., 1994 ; Slingerland et al., 1994 ; Raynal et Lawrence, 1995).

Bien que le TGFß1 soit essentiellement un facteur de croissance inhibiteur de prolifération, il peut stimuler la croissance de certains types cellulaires dont les fibroblastes. Selon l'origine de ces fibroblastes, le TGFß1 exerce son effet stimulateur suivant différents

mécanismes. Il peut agir de façon indirecte en induisant le gène c-sis qui code pour le PDGF, ce facteur de croissance stimulant alors la prolifération (Leof et al., 1986) ou il peut entraîner une diminution de la synthèse de p21-WAF et une augmentation de l'activité kinasique de cdk-2 ou encore induire l'expression de c-myc (revue dans Lawrence, 1996).

Plus récemment, il a été montré d'une part que le TGFß1 était capable d'augmenter l'activité des MAP Kinase et d'autre part que le substrat préférentiel des récepteurs TGFßRI et TGFßRII était une extension de six résidus lysine du côté N-terminal d'une sérine phosphorylable, ouvrant ainsi la voie de l'identification des protéines cibles des récepteurs à activité kinase du TGFß (revue dans Lawrence, 1996).

5°) Effets biologiques du TGFß1

Le TGFß doit originellement son nom à sa capacité de permettre la formation et la croissance de colonies en agar mou de cellules fibroblastiques de rat. Mais comme pour la plupart des facteurs de croissance, le TGFß est relativement mal nommé, ce facteur exerçant en effet de multiples activités biologiques. Dans ce paragraphe, nous rappellerons brièvement les différents champs d'action du TGFß1 puis nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de ce facteur de croissance dans la cancérogenèse mammaire.

a) Le TGFß1, facteur de croissance multifonctionnel

Le TGFß1 inhibe la prolifération de nombreux types cellulaires, les cellules épithéliales et les cellules hématopoïétiques étant particulièrement sensibles à l'effet inhibiteur de ce facteur de croissance. L'inhibition de la croissance induite par le TGFß1 est généralement réversible sauf si elle est accompagnée d'une différenciation terminale (Masui et al., 1986). En outre, pour certains types cellulaires épithéliaux, tels que les cellules prostatiques ou les hépatocytes, le TGFß1 peut entraîner la mort cellulaire par apoptose (Martikainen et al., 1990 ; Oberhammer et al., 1992).

Bien que principalement inhibiteur de prolifération, ce facteur de croissance peut néanmoins stimuler la prolifération de quelques types cellulaires mésenchymateux (cellules de

Schwann, cellules musculaires lisses, ostéoblastes, chondrocytes et fibroblastes) (revue dans Lawrence, 1996) mais cette stimulation de la croissance apparaît être un effet secondaire, elle résulterait d'une induction de facteurs de croissance stimulateurs tels que le PDGF (Leof et al., 1986 ; Ishikawa et al., 1990) ou le FGF-2 (Pertovaara et al., 1993a).

Le TGFß1 peut agir en outre sur la différenciation de types cellulaires variés d'origine épithéliale et mésenchymateuse. Il peut entraîner selon le type cellulaire une inhibition ou une stimulation de la différenciation. Ainsi, le TGFß1 stimule la chondrogenèse mais inhibe la myogenèse. Pour les cellules épithéliales, le TGFß1 induit la différenciation de cellules bronchiques (Masui et al., 1986) alors qu'il réduit la synthèse de surfactant de cellules pulmonaires (Whitsett et al., 1987). Il est capable par ailleurs de stimuler la différenciation des kératinocytes (Reiss et Sartorelli, 1987) et des cellules épithéliales intestinales normales (Kurokowa et al., 1987) ou cancéreuses (Chakrabarti, 1992) mais il s'oppose à la synthèse de caséine ß des cellules épithéliales mammaires murines HC11 induite par le déxaméthasone et la prolactine (Mieth et al., 1990).

Le TGFß a également un effet immunosuppresseur dérivant en partie de ses capacités antiprolifératrices. Il inhibe en effet la prolifération des lymphocytes B et T et supprime par ailleurs la production d'immunoglobulines des lymphocytes B et la cytotoxicité des cellules NK (revue dans Barnard et al., 1990).

Le TGFß1 exerce en outre des effets sur la matrice extracellulaire. Dans les conditions physiologiques normales, il agit en faveur d'une augmentation des composants matriciels, soit en stimulant la synthèse de protéines de la matrice (collagène, fibronectine, tenascine, glycosaminoglycanes et protéoglycanes), soit en diminuant la dégradation de la matrice extracellulaire par inhibition de la synthèse de protéases (collagènase, plasmine, stromélysine) ou par augmentation de la synthèse d'inhibiteurs de protéases (TIMP, inhibiteur des métalloprotéinases ; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène) (revue dans Rizzino, 1988). Le TGFß peut de plus augmenter les protéines de la surface cellulaire qui lient les composants matriciels (revue dans Barnard et al., 1990). Par ses effets sur la matrice extracellulaire, le TGFß joue indéniablement des rôles importants dans la réparation tissulaire, la cicatrisation, la formation des os et du cartilage. Le TGFß1 entraîne cependant un effet inverse

au niveau de la matrice extracellulaire de cellules tumorales. En particulier, il provoque la dégradation des composants de la membrane basale de lignées cellulaires tumorales humaines en augmentant l'activité de la collagénase IV (Brown et al., 1990a) tout en diminuant l'expression de TIMP-2, inhibiteur spécifique de cette collagénase (Stetler-Stevenson et al., 1990). Dans le cas de cellules de carcinomes pulmonaires humains et d'adénocarcinomes mammaires, le TGFß1 peut par ailleurs augmenter la synthèse de l'activateur du plasminogène de type urokinase (Keski-Oja et al., 1988a ; Welch et al., 1990). Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation de TGFß1 *in vivo* peut promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses à travers les membranes basales.

D'autres effets biologiques du TGFß1 sont d'une part son effet chémoattractif vis à vis des macrophages et des fibroblastes, favorisant ainsi le processus de cicatrisation (revue dans Barnard et al., 1990) et d'autre part son effet angiogène. Ce dernier effet est quelque peu paradoxal. En effet, bien que le TGFß soit *in vitro* un inhibiteur de la croissance des cellules endothéliales cultivées sur plastique, il est capable de promouvoir l'angiogénèse *in vivo* après injection sous cutanée dans des embryons de souris (Roberts et al., 1986). Mais cet effet est probablement indirect dû à un recrutement et à une activation subséquente des monocytes capables de sécréter des facteurs angiogènes tels que le TNFα (Whal et al., 1987).

Ainsi, il apparaît clairement que le TGFß1 est un facteur de croissance bifonctionnel notamment pour ses effets sur la prolifération et/ou la différenciation cellulaire qui dépendent en autre de la nature de la cellule cible, de son état de différenciation initiale et des influences environnementales telles que la composition de la matrice extracellulaire et la présence d'autres facteurs de croissance.

b) TGFß1 et cancérogenèse mammaire

Dans la paragraphe relatif au développement de la glande mammaire, nous avons présenté le rôle régulateur de croissance du TGFß1 sur les cellules épithéliales mammaires. De même qu'*in vivo*, ce facteur de croissance est capable *in vitro* de réduire la prolifération de cellules épithéliales mammaires normales issues de mammoplasties réductionnelles (Hosobuchi et Stampfer, 1989 ; Valvérius et al., 1989 ; Takahashi et al., 1990). En outre, la croissance de

cellules épithéliales mammaires de rate est stimulée par des anticorps anti-TGFß1, suggérant que ce facteur de croissance agit de façon autocrine (Either et Van de Velde, 1990). Ces résultats laissent supposer que des altérations du signal inhibiteur porté par le TGFß puisse contribuer à la cancérogenèse mammaire. D'ailleurs, beaucoup de cellules cancéreuses humaines d'origine tissulaire variée échappent à la régulation de la croissance exercée par le TGFß1 sur leurs homologues normales, c'est la cas notamment de cellules dérivées de lymphomes (Kadin et al., 1994), de rétinoblastomes (Kimchi et al., 1988), de cancer de l'endomètre (Boyd et Kaufman, 1990), de cancer de la vessie (Geiser et al., 1992), de cancer du poumon (Damstrup et al., 1993 ; Norgaard et al., 1994), de cancer gastrique (Park et al., 1994), de cancer du côlon (Geiser et al., 1992) et de cancer du sein (Sun et al., 1994).

Les travaux portant sur l'expression du TGFß1 dans les cancers mammaires ont présenté des résultats très variables. Par étude immunocytochimique, certains auteurs ont corrélé l'expression du TGFß1 à un pronostic favorable (Mizukami et al., 1990 ; Auvinen et al., 1995) alors que d'autres ont remarqué une augmentation de l'expression du TGFß1 avec la progression tumorale (Gorsch et al., 1992 ; Walker et Dearing, 1992). L'étude des ARNm codant pour ce facteur de croissance a conduit à des résultats tout aussi contradictoires (Travers et al., 1988 ; Barrett-Lee et al., 1990 ; Murray et al., 1993). *In vitro*, il existe peu de différence entre l'expression du TGFß1 des cellules normales issues de mammoplasties réductionnelles et celle des lignées cancéreuses mammaires (Zajchowski et al., 1988). De même, des lignées cellulaires immortalisées partiellement transformées ou fortement tumorigènes, obtenues *in vitro* à partir de cellules épithéliales mammaires normales humaines traitées par des carcinogènes ou transfectées par des oncogènes, ne modifient pas leur niveau de sécrétion de TGFß1 par rapport aux cellules normales (Valvérius et al., 1989). Par conséquent, il apparaît difficile de porter une quelconque conclusion quant à l'expression du TGFß1 dans les cancers du sein.

Par ailleurs, des résultats conflictuels sur la réponse à l'inhibition de la croissance par le TGFß1 de cellules mammaires dérivées de tumeur ont également été décrits. Les différents travaux ont rapporté un réduction de la croissance des cellules, une absence d'effet, mais aussi bien que plus rarement, une stimulation de la prolifération (revue dans Wakefield et al., 1991). Ces résultats peuvent être expliqués en partie par les conditions de culture. Par exemple,

l'inhibition de prolifération par le TGFß1 d'un grand nombre de lignées cellulaires tumorales mammaires dépend de la présence d'acides gras polyinsaturés ; la présence de rétinoïdes semble en outre nécessaire pour obtenir une inhibition maximale de la croissance (Newman, 1990). Par ailleurs, il convient de remarquer que les dérives génétiques survenant au sein de différents laboratoires, notamment après culture à long terme, peuvent également rendre compte des réponses variables observées après action du TGFß1. Néanmoins, la controverse est restée centrée sur la corrélation entre l'effet inhibiteur du facteur de croissance et la présence de récepteurs aux oestrogènes. Il semble que les lignées ne possédant pas de récepteurs aux oestrogènes soient plus sensibles à une réduction de leur croissance sous l'influence du TGFß1 (Knabbe et al., 1987 ; Zugmaier et al., 1989 ; revue dans Wakefield et al., 1991). Toutefois, cette corrélation n'est pas stricte et elle a été largement discutée (Arteaga et al., 1988 ; Arrick et al., 1990 ; Coletta et al., 1991 ; Kalkhoven et al., 1995a, b). D'autre part, il est également difficile d'établir une relation entre l'inhibition de la prolifération et la capacité tumorigène des cellules. En effet, des cellules épithéliales mammaires normales humaines transformées *in vitro* restent sensibles au TGFß même lorsqu'elles sont rendues fortement tumorigènes après transfection par de nombreux oncogènes (Valvérius et al., 1989) alors que des cellules malignes en culture primaire sont insensibles à ce facteur de croissance contrairement aux cellules normales issues de la même biopsie (Takahashi et al., 1990). Ce dernier résultat, obtenu à partir de cultures primaires, apparaît moins incontestable que celui obtenu sur les cellules transformées cultivées à long terme dans la mesure où il se rapproche davantage des conditions observées *in vivo*. Par ailleurs, un changement comportemental vis à vis de la réponse au TGFß1 de cellules cultivées *in vitro* et *in vivo* a été confirmé par Zugmaier et al. (1991). Ainsi, la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 est fortement ralentie *in vitro* après action du TGFß1 alors qu'*in vivo*, ce facteur n'a aucun effet sur la croissance des tumeurs provenant de ces mêmes cellules.

Il a été montré pour un grand nombre de cancers d'origine épithéliale et particulièrement pour les cancers du sein, que la résistance à l'effet antiprolifératif du TGFß résulte d'une mutation ou d'une absence de TGFßRII (revue dans Markowitz et Roberts, 1996). D'ailleurs,

la transfection par le gène du TGFßRII de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 insensibles au TGFß1 réduit fortement leur capacité tumorigène (Sun et al., 1994).

Le développement des tumeurs malignes ne dépend pas seulement d'une augmentation de la prolifération mais implique également toute une série d'événements qui permettent à la cellule maligne d'envahir le stroma environnant, de se détacher de la tumeur d'origine, d'échapper à la surveillance du système immunitaire et de coloniser d'autres organes. Or, les effets multifonctionnels du TGFß1 (cf. paragraphe précédent) laissent entrevoir qu'il puisse agir sur chacun de ces événements. Ainsi, il a été suggéré que le TGFß1 peut faciliter l'invasion des cellules à travers les membranes basales et la formation de métastases puisque ce facteur de croissance d'une part stimule l'activité de protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire (cf. paragraphe précédent) et d'autre part augmente la capacité de cellules d'adénocarcinomes mammaires de souris à former des métastases pulmonaires après injection dans des rats syngéniques (Welch et al., 1990). En outre, cette augmentation du potentiel métastatique *in vivo* est associée à un accroissement du nombre de cellules capables de traverser *in vitro* des membranes basales artificielles. De plus, une surexpression du TGFß est corrélée avec une augmentation du potentiel métastatique (Schwarz et al., 1990 ; Perotti et al., 1991). Par ailleurs, une surproduction de TGFß1 par les cellules tumorales peut leur permettre d'échapper à la surveillance du système immunitaire et promouvoir la néovascularisation tumorale (cf. effets immunosuppresseur et angiogène du TGFß).

Pierce et al. (1995) ont montré récemment à l'aide de souris transgéniques qu'une surexpression du TGFß1 supprimait le développement tumoral mammaire. Ce qui apparaît quelque peu contradictoire avec les résultats antérieurs rapportant qu'une surexpression de TGFß par les cellules malignes augmente leur tumorogenèse, leur invasion et leur capacité à métastaser. Aussi, afin de rendre compte de l'effet bifonctionnel du facteur de croissance sur le processus de cancérogenèse, les auteurs ont suggéré qu'au niveau des cellules épithéliales mammaires normales, le TGFß1 n'inhiberait pas seulement la prolifération mais supprimerait également les stades précoces du développement cancéreux. Une fois que les cellules tumorales atteignent un stade où elles ne peuvent plus être inhibées de manière autocrine par le TGFß, l'expression accrue de ce facteur de croissance peut alors entraîner des effets paracrines tels que

des remaniements du stroma tumoral, une suppression de la surveillance immunitaire et l'angiogénèse favorisant ainsi la croissance tumorale et la métastase.

B) Le NaB

L'acide butyrique est un petit acide gras volatil à chaîne linéaire comportant quatre atomes de carbone. Il est un métabolite normal de l'organisme des mammifères. Le NaB est en effet apporté par l'alimentation (essentiellement par les matières grasses du lait) et est par ailleurs le produit de dégradation majeur de la fermentation bactérienne d'hydrates de carbone non digérés. Dès 1967, Pace et al. ont présenté l'action cytotoxique du NaB sur les cellules tumorales. Depuis, ses effets antiprolifératifs et antitumoraux ont été largement démontrés (revue dans Prasad, 1980 ; Planchon, 1992). En outre, vers les années 1980, plusieurs travaux ont révélé que les effets du NaB étaient en fait le reflet d'un phénomène plus important : la différenciation des cellules tumorales (Tsao et al., 1982 ; Graham et Buick, 1988).

1°) Effets et mécanismes d'action du NaB sur les cellules tumorales en culture

Les effets du NaB sur les cellules de mammifères en culture varient fortement d'un type cellulaire à un autre. Cet agent inhibe la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires tumoraux tels que les cellules leucémiques (Rastl et Swelty, 1978 ; Novogrodsky et al., 1983), les cellules de cancer du côlon (Tsao et al., 1982 ; Augeron et Laboisse, 1984 ; Barnard et Warwick, 1993) ou du sein (Abe et Kufe, 1984a, b ; Graham et Buick, 1988 ; Guilbauld et al., 1990). Il est léthal pour les cellules de gliome et de neuroblastome pour lesquelles il entraîne une réduction de la glycolyse anaérobie (revue dans Prasad, 1980). L'effet du NaB sur la synthèse d'ADN se traduit par une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Xue et Rao, 1981 ; Charollais et al., 1990 ; Guilbauld et al., 1990 ; Barnard et Warwick, 1993), le NaB agissant à la fois en phase précoce et en phase tardive de G1 (Charollais et al., 1990). En outre, d'autres auteurs ont montré une augmentation de la durée de la phase G2

(Darzynkiewicz et al., 1981 ; Boisteau et al., 1996). Pour les cellules de cancer du côlon (Hague et al., 1993a, b ; Boisteau et al., 1996), le NaB peut entraîner la mort cellulaire par apoptose.

Outre son activité antiprolifératrice, le butyrate de sodium peut exercer ses effets antitumoraux en induisant une différenciation cellulaire observable à la fois par des modifications morphologiques et/ou biochimiques. Les effets différenciateurs les plus marqués ont été obtenus pour les cellules leucémiques (revue dans Planchon, 1992), les cellules de cancer du côlon (Tsao et al., 1982 ; Barnard et Warwick, 1993 ; Ho et al., 1994) et les cellules de cancer du sein (Abe et Kufe, 1986 ; Graham et Buick, 1988 ; Guilbauld et al., 1990). Ho et al. (1994) ont d'ailleurs décrit qu'un traitement à long terme au NaB de cellules cancéreuses de côlon humain conduit en une différenciation stable des cellules, capables de maintenir un phénotype différencié après retrait du NaB du milieu de culture.

Initialement, les actions différenciatrices du NaB ont été observées sur les cellules cancéreuses mais d'autres travaux ont montré que cet agent produit également des effets sur la maturation de cellules non cancéreuses, il promeut en particulier l'érythropoïèse et la différenciation des kératinocytes (revue dans Newmark et al., 1994).

Le mécanisme d'action du NaB n'est pas encore connu, mais de nombreuses études ont montré qu'un traitement par cet agent perturbait la configuration de la chromatine et il est possible que cette désorganisation soit à l'origine des effets biologiques observés (revue dans Prasad, 1980 ; Planchon, 1992). Le NaB en effet augmente l'acétylation des histones en empêchant leur désacétylation par inhibition de la déacétylase. Les interactions histones-ADN se trouvent alors modifiées ce qui libère l'ADN de ses contraintes et altère la structure et la fonction de la chromatine empêchant par conséquent le bon déroulement de la mitose. Le NaB influence également la phosphorylation des histones et de deux protéines non histones (HMG14 et HMG17) qui maintiennent la chromatine dans une configuration active. En outre, il module l'expression des gènes en régulant la méthylation de l'ADN (Cosgrove et Cox, 1990). D'ailleurs, des travaux ont commencé à analyser le mécanisme par lequel le NaB inhibe la croissance ou induit la différenciation cellulaire en examinant l'expression des gènes. Barnard et Warwick (1993) ont montré que l'inhibition de croissance et l'induction de différenciation de

cellules de cancer du côlon sont accompagnées d'une diminution de l'expression de c-myc. Nishina et al. (1993) ont suggéré que le NaB induit la différenciation des cellules de carcinome embryonnaire F9 en induisant l'expression de junB.

L'acide butyrique intervient également directement dans de nombreux processus enzymatiques, en stimulant ou en inhibant l'activité de certaines enzymes. Il est capable par exemple d'inhiber l'AMPc phosphodiestérase augmentant ainsi la quantité d'AMPc des cellules (revue dans Prasad, 1980).

2°) Effets du NaB sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires

La majorité des travaux relatifs aux effets du NaB sur les cellules cancéreuses mammaires a été effectuée sur la lignée hormono-dépendante MCF-7 pour laquelle une inhibition de la croissance a été largement décrite (Abe et Kufe, 1984a, b ; Stevens et al., 1984 ; Abe et Kufe, 1986 ; Graham et Buick, 1988 ; Guilbaud et al., 1990). En outre, de nombreux auteurs, à l'aide de marqueurs de différenciation variés ont montré que cette inhibition de la prolifération était corrélée à des modifications morphologiques des cellules et à une induction de leur différenciation. Ainsi pour ce type cellulaire, le NaB est capable d'augmenter l'expression de l'antigène carcino-embryonnaire (Abe et Kufe, 1984a), l'expression de l'EMA (Epithelial Membrane Antigen ou épisialine, marqueur de différenciation de cellules épithéliales au sens large) (Guilbaud et al., 1990), l'expression d'un antigène présent sur la bordure apicale de cellules épithéliales mammaires différenciées à caractère sécrétoire (Abe et Kufe, 1984b), ainsi que l'expression d'un antigène membranaire apparenté à un antigène de haut poids moléculaire détectable dans le lait humain (Abe et Kufe, 1984b ; 1986). Le NaB induit d'autre part l'accumulation de gouttelettes lipidiques au sein des cellules (Guilbaud et al., 1990). Les effets de cet agent sont réversibles après une courte exposition (Abe et Kufe, 1984b). Par ailleurs, le NaB réduit le nombre de récepteurs aux oestrogènes des cellules MCF-7 (Stevens et al., 1984 ; Guilbaud et al., 1990 ; de Fazio et al., 1992) et le nombre de récepteurs à la progestérone des cellules T47D (Hortwitz et al., 1978). Sachant qu'une augmentation du nombre de récepteurs

stéroïdiens est corrélée au processus de cancérisation (Nenci et al., 1988), il a été suggéré que le butyrate de sodium rend la cellule "moins cancéreuse".

Graham et Buick (1988) ont élargi l'étude du NaB à 6 lignées de cancer du sein hormono-dépendantes ou non. Bien que ce facteur entraîne une inhibition de la croissance et des modifications morphologiques des six lignées étudiées, il induit la différenciation seulement des trois lignées exprimant le récepteur aux oestrogènes. Cette différenciation est caractérisée par l'accumulation de lipides et de glycoprotéines membranaires des globules gras du lait. Toutefois, elle n'est pas bloquée par les anti-oestrogènes et les auteurs ont donc été incapables d'établir le rôle des récepteurs aux oestrogènes dans les changements phénotypiques induits par le NaB. Ils ont suggéré par conséquent, que l'expression des récepteurs aux oestrogènes serait probablement un marqueur des types cellulaires capables de se différencier en une lignée à caractère sécrétoire sous l'influence du NaB et il reste possible que les lignées ne possédant pas de récepteurs aux oestrogènes seraient induites à se différencier mais en une lignée à caractère non sécrétoire (Graham et Buick, 1988).

C) Le RA

L'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A, exerce de multiples effets biologiques. Au niveau cellulaire, il est capable d'inhiber la prolifération, d'induire la différenciation et l'apoptose participant ainsi au contrôle de l'homéostasie tissulaire (revue dans De Luca, 1991). Les rétinoïdes entraînent leurs effets pleiotropiques en se fixant sur au moins deux classes différentes de protéines nucléaires : les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR α, ß, γ) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR α, ß, γ). Ces récepteurs appartiennent à la "superfamille" des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, ils exercent un contrôle transcriptionnel de gènes spécifiques en se fixant à une séquence spécifique d'ADN (RARE, Retinoic Acid Responsive Element et RXRE) localisée dans la région promotrice d'un grand nombre de gènes (Gudas, 1992).

1°) Structure des principaux rétinoïdes naturels

Les rétinoïdes sont des molécules globalement hydrophobes (figure 12). Ce sont des hydrocarbures polyéniques qui comportent cinq doubles liaisons ce qui explique la sensibilité particulière de ces molécules à la lumière et à l'oxydation. La structure des rétinoïdes peut être subdivisée en trois parties : une extrémité cyclique terminale hydrophobe, une chaîne polyénique et une extrémité polaire porteuse du groupement fonctionnel : CH_2OH pour le rétinol, CHO pour le rétinal et COOH pour l'acide rétinoïque.

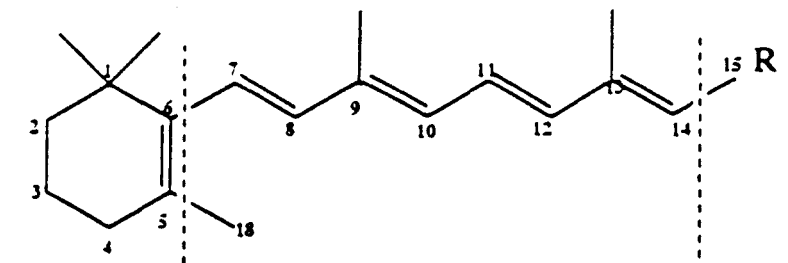


Figure 12 : Structure des principaux rétinoïdes naturels.
D'après Lotan, 1980.

2°) Mécanismes d'action de l'acide rétinoïque

(figure 13)

a) Les CRABPs

Dans les cellules cibles, le RA est pris en charge par des protéines navettes hautement spécifiques, les CRABPs (Cellular Retinoic Acid Binding Protein). Ces protéines sont de petite taille 100 à 160 acides aminés et fixent leur ligand avec une bonne affinité (Kd = 4 nM). Actuellement, deux isoformes de ces CRABPs (CRABP1 et CRABP2) ont été définies

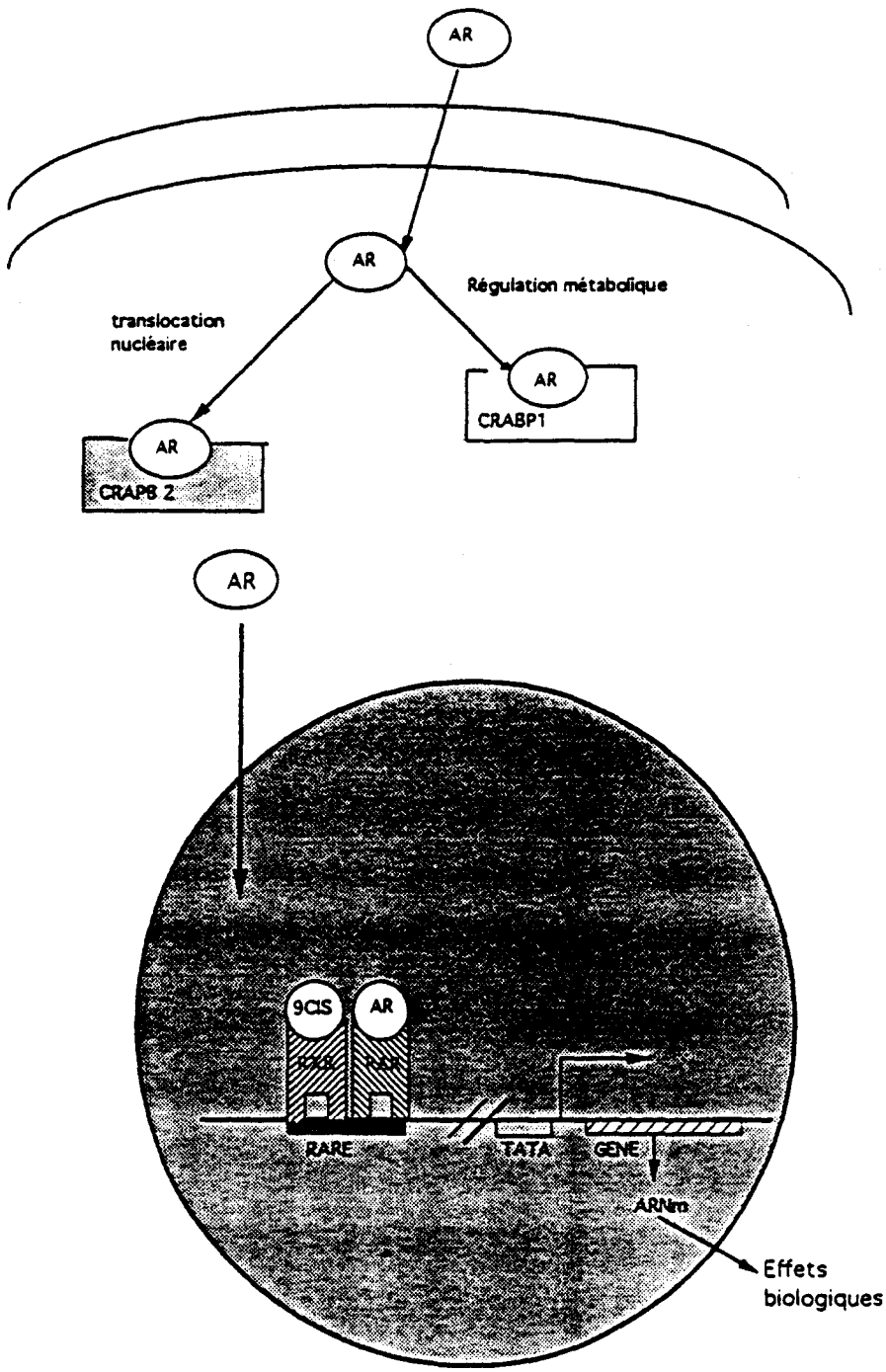


Figure 13 : Mécanismes d'action de l'acide rétinoïque.
D'après Grillier, 1994.

(Giguere et al., 1990a), elles serviraient de navettes en favorisant le transport du RA vers le noyau et faciliteraient sa prise en charge par les récepteurs nucléaires (revue dans Lotan, 1980). Ces protéines toutefois ne sont pas nécessaires au fonctionnement normal des récepteurs nucléaires puisque de nombreuses lignées cellulaires dépourvues de CRABPs répondent parfaitement au traitement par le RA (Jetten et al., 1987 ; Mangelsdorf et al., 1990). Aussi, il a été proposé pour ces CRABPs , une fonction tampon régulant la concentration intracellulaire du rétinoïde. Elles pourraient également être utiles dans la conversion de l'acide rétinoïque *tout trans* en d'autres métabolites, jouant alors le rôle d'un transporteur qui va amener le RA vers les voies enzymatiques appropriées de façon similaire à l'action des protéines cellulaires liant le rétinol (CRBP : Cellular Retinol Binding Protein) (Blomhoff et al., 1990).

b) Les récepteurs de l'acide rétinoïque tout trans

Actuellement, trois isoformes distinctes de RAR ont été identifiées : RAR α, ß, γ (de Thé et al., 1987 ; Giguere et al., 1987 ; Petkovick et al., 1987 ; Brand et al., 1988 ; Krust et al., 1989 ; Zelent et al., 1989). Elles sont des protéines de taille voisine (462, 448 et 454 acides aminés respectivement) qui présentent une organisation en six domaines (notés de A à F) bien décrite pour tous les récepteurs nucléaires (figure 14) (Green et Chambon, 1988). Ces isoformes présentent un degré d'homologie élevé au niveau des régions C et E qui correspondent respectivement au domaine de liaison à l'ADN et au domaine de fixation du RA. Les RAR α, ß, γ ont une homologie de séquence comprise entre 94 et 97 % pour le domaine de liaison à l'ADN et entre 84 et 90 % pour le domaine de fixation du ligand (revue dans Darmon, 1990). Par ailleurs, la diversité des RAR est augmentée par l'existence de deux promoteurs sur chacun des gènes codant pour ces récepteurs ; les deux promoteurs engendrent deux transcrits alternatifs qui génèrent des isoformes de RAR présentant des extrémités N-terminales différentes (Giguere et al., 1990b ; Kastner et al., 1990 ; Leroy et al., 1991 ; Zelent et al., 1991 ; Blumberg et al., 1992). De plus, plusieurs variants provenant d'épissages alternatifs ont été caractérisés (Kastner et al., 1990 ; Leroy et al., 1991 ; Zelent et al., 1991 ; Nagpal et al., 1992). Ainsi, la diversité des RAR pourrait rendre compte de la diversité des effets exercés par le RA sur les cellules.

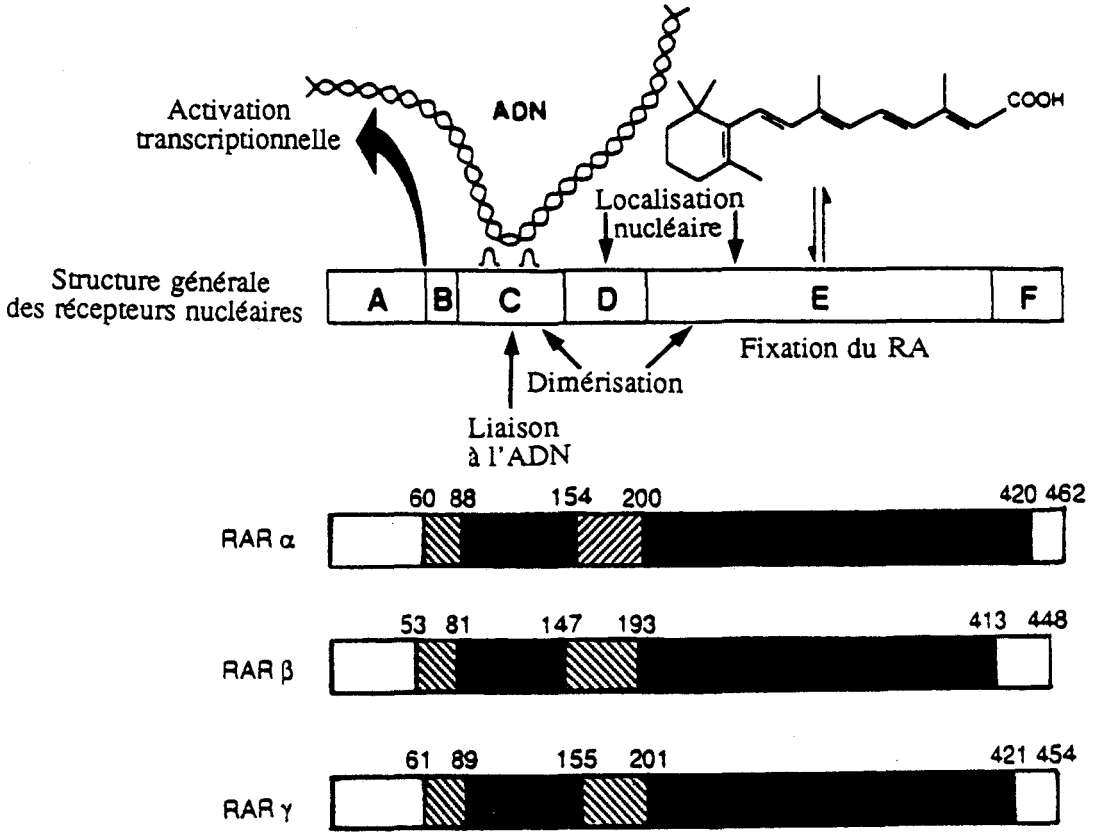


Figure 14 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs humains de l'acide rétinoïque : RARα, RARß et RARγ.
Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont divisés en six régions distinctes (A, B, C, D, E et F) bien décrites pour tous les récepteurs nucléaires. Les régions A et B sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle, la région C dans la liaison à l'ADN et la région E dans la fixation du ligand. Les chiffres correspondent à la position du dernier acide aminé de chaque région. Les régions figurées en noir, hachuré et blanc représentent les analogies de séquences entre les différents RAR.

■ Analogies de séquences > 80%

▨ Analogies de séquences comprises entre 60 et 80 %

□ Analogies de séquences < 25%

D'après Darmon, 1990.

Plus récemment, une seconde classe de récepteurs aux rétinoïdes a été découverte : les RXR (Mangelsdorf et al., 1990). Trois isoformes ont été identifiées (α, ß, γ), elles présentent entre elles un haut degré de conservation à l'exception de leur domaine N-terminal qui montre une grande variabilité, suggérant que chaque isoforme pourrait avoir une fonction de transactivation différente. Bien que les récepteurs RXR soient reliés sur le plan de leur structure aux RAR, l'analyse des séquences a révélé peu de similitudes entre ces deux types de récepteurs, notamment au niveau de leurs domaines de liaison à l'ADN et de fixation du ligand. En fait, le ligand physiologique des RXR est un métabolite de l'acide rétinoïque *tout trans* : l'acide 9-Cis rétinoïque (produit d'isomérisation *in vivo* de la forme *tout trans*) (Heyman et al., 1992 ; Allenby et al., 1994). Ce métabolite est un bon activateur des RAR où il a la même activité que le RA *tout trans* mais il est 40 fois plus actif que ce dernier sur les RXR.

Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) s'associent sous forme d'homodimère ou sous forme d'hétérodimère avec d'autres récepteurs nucléaires, le plus souvent des RXR. Ces derniers agissent comme des co-régulateurs des récepteurs RAR ; les hétérodimères RAR-RXR montrent en effet une liaison à l'ADN 40 à 50 fois supérieure à celle des homodimères RAR-RAR. Les récepteurs nucléaires du RA se comportent d'autre part comme des facteurs de transcription inductibles : l'intervention du ligand est capitale dans le mécanisme d'activation transcriptionnelle puisque suivant sa nature et sa concentration, le niveau d'activation et les gènes régulés seront différents.

c) Eléments de réponse aux rétinoïdes (RARE et RXRE)

En présence de leur ligand, les récepteurs nucléaires sont capables d'activer ou d'inhiber la transcription de gènes spécifiques en interagissant avec leurs éléments de réponse (RARE et RXRE) localisés dans la région promotrice de gènes tels que notamment celui de l'ostéocalcine, de la laminine B1 ou du récepteur RARß. L'élément structural de base qui constitue les RARE est la séquence AGGTCA, rencontrée sous la forme de répétitions directes séparées par cinq nucléotides, de palindromes ou de palindromes inversés. Les répétitions directes sont les RARE les plus actifs *in vivo* (revue dans De Luca, 1991). Les RXRE sont exclusivement présents

sous la forme de répétitions directes de cette même séquence mais séparée par un seul nucléotide.

Le système de signalisation des rétinoïdes apparaît d'une grande complexité montrant ainsi la plasticité du système de régulation transcriptionnelle. Des aspects importants tels que le nombre de récepteurs et d'isoformes, la formation d'homodimères ou d'hétérodimères, la nature du ligand, l'intervention d'autres protéines et l'organisation structurale des RARE peuvent rendre compte de l'extraordinaire variété d'effets biologiques exercés par ces molécules.

d) Autres mécanismes d'action

Le RA peut également agir par des mécanismes d'action indépendants de ses récepteurs. Il peut en effet solliciter des systèmes de transduction mettant en jeu l'AMPc et le diacylglycérol (Olsson et al., 1982). Des effets biologiques membranaires ont également été évoqués, en particulier des modifications des glycoprotéines de la surface cellulaire (Lotan et al., 1987) qui ont d'ailleurs un rôle clef dans les phénomènes d'adhérence et de croissance cellulaires. De plus, les glycoprotéines de surface modifient l'accessibilité des hormones et des facteurs de croissance au niveau de leurs sites récepteurs. Mais de tels mécanismes d'action restent largement minoritaires en regard de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des rétinoïdes.

3°) Effets du RA sur la prolifération et la différenciation cellulaires

Les rétinoïdes ont un rôle important dans le développement embryonnaire normal ainsi que dans la croissance et la différenciation cellulaires. *In vivo* et *in vitro*, des traitements par les rétinoïdes entraînent une inhibition et/ou une maturation d'une grande variété de types cellulaires. Aussi, il apparaît difficile de présenter d'une manière exhaustive la liste des types cellulaires affectés par le RA. Par conséquent, nous nous focaliserons sur les effets de cet agent au niveau de la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses et plus particulièrement des cellules cancéreuses mammaires.

Le RA est capable d'inhiber la prolifération et/ou d'induire la différenciation d'un très grand nombre de cellules cancéreuses telles que les cellules leucémiques (Breitman et al., 1983 ; Gottardis et al., 1996), les cellules de carcinomes squameux de la tête et du cou (Gottardis et al., 1996), les cellules de carcinomes embryonnaires (Egletis et Sherman, 1983 ; Atencia et al., 1994 ; Seo et Noguchi, 1995), les cellules d'adénocarcinome de l'endomètre (Carter et al., 1996), les cellules de mélanomes, les cellules cancéreuses hépatiques et gastriques (revue dans Hill, 1992), ainsi que les cellules cancéreuses mammaires (Fontana et al., 1991 ; Halter et al., 1993 ; Demirpence et al., 1994 ; Lopez-Boado et al., 1994 ; Gottardis et al., 1996).

Les effets des rétinoïdes sur les cellules leucémiques sont de loin les plus étudiés. Sur ces cellules, le RA entraîne *in vitro* et *in vivo* des effets anticancéreux spectaculaires. La lignée HL-60 (cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire humaine) par exemple montre une forte réduction de sa prolifération et est induite à se différencier en granulocytes sous l'action du RA (Breitman et al., 1983), cet agent peut également entraîner leur apoptose (Nagy et al., 1995). En outre, l'une des grandes réussites de la thérapie par les rétinoïdes est le traitement des leucémies aiguës promyélocytaires (APL) puisqu'un traitement par le RA des patients atteints de cette leucémie a conduit à une augmentation du taux de rémission (Chen et al., 1991 ; Warrel et al., 1991).

Pour les cancers mammaires, les rétinoïdes sont capables *in vivo* de s'opposer à la formation de tumeurs induites chez la rate par le carcinogène N-nitroso-N-méthylurée (Moon et Mehta, 1990 ; Anzano et al., 1994). *In vitro*, le RA inhibe efficacement la prolifération des lignées épithéliales mammaires cancéreuses possédant des récepteurs aux oestrogènes mais il reste sans effet sur les cellules cancéreuses hormono-indépendantes (Lacroix et Lippman, 1980 ; Ueda et al., 1980 ; Fraker et al., 1984 ; Marth et al., 1984-1985 ; Fontana et al., 1991 ; Van der Burg et al., 1993 ; Zhang et al, 1996). L'inhibition de la prolifération est dépendante de la dose et réversible (Fraker et al., 1984). Le RA exerce en outre un effet synergique sur la réduction de la croissance induite par les anti-oestrogènes comme le tamoxifène (Fontana et al., 1987 ; Butler et Fontana, 1992). Ces résultats suggèrent que les récepteurs aux oestrogènes sont un des éléments clefs pour la réponse des cellules cancéreuses mammaires au RA. Cet agent peut par ailleurs inhiber la stimulation de la croissance induite par les oestrogènes

(Fontana et al., 1987 ; Demirpence et al., 1992) et par l'IGF1 (Fontana et al., 1991 ; Adamo et al., 1992), facteur mitogène plus puissant encore que les oestrogènes sur les cellules cancéreuses hormono-dépendantes (Pollak et al., 1988).

Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'éclaircir le mode d'action du RA sur les cellules cancéreuses mammaires, et plus particulièrement en rapport avec la capacité que possède ce facteur de s'opposer à l'action stimulatrice de l'IGF1. Il a été décrit que le RA augmente la synthèse d'IGFBP (Insulin like Growth Factor Binding Protein), notamment celle de l'IGFBP3 (protéine majeure liant l'IGF1 circulant) pouvant ainsi moduler directement l'effet de l'IGF sur la prolifération des cellules mammaires (Fontana et al., 1991 ; Adamo et al., 1992). Torrisi et al. (1993) ont montré par ailleurs qu'un traitement par des rétinoïdes de synthèse chez des patientes atteintes de cancer du sein diminuait le taux d'IGF1 circulant. Ces auteurs ont spéculé qu'une des actions possibles des rétinoïdes s'exercerait via le TGFß. Les rétinoïdes peuvent en effet induire la sécrétion de TGFß (Glick et al., 1989), capable d'une part d'inhiber la prolifération de cellules épithéliales mammaires cancéreuses (Knabbe et al., 1987) et d'autre part de diminuer la synthèse d'IGF1 (Macaulay, 1992). De plus, dans les fibroblastes en culture, le TGFß augmente la synthèse d'IGFBP3 (Martin et al., 1992). Ainsi, une augmentation de l'expression du TGFß par le RA pourrait rendre compte d'une diminution d'IGF1 et par conséquent d'une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.

Les autres mécanismes proposés pour expliquer l'action du RA sur les cellules de cancer du sein mettent en jeu l'interaction des récepteurs du RA avec d'autres facteurs de transcription. Il a été postulé que le récepteur RARα formerait des dimères avec le facteur de transcription c-jun (Schüle et al., 1991) empêchant ainsi sa fixation sur le site AP-1 et conduisant par conséquent à l'inhibition de la transcription d'un grand nombre de gènes dont les produits peuvent être essentiels pour la stimulation de la croissance par les mitogènes dont l'IGF1 (Li et al., 1994). Par ailleurs, l'inhibition de la prolifération par le RA des cellules cancéreuses mammaires stimulées à proliférer sous l'influence des oestrogènes est due à une fixation des récepteurs RAR sur l'élément de réponse aux oestrogènes (Demirpence et al., 1994).

Il a été montré récemment que la résistance des cellules tumorales mammaires aux effets antiprolifératifs du RA est corrélative d'une absence de récepteur RARß (Zhang et al., 1996). D'ailleurs, la transfection des cellules par le gène codant pour ce récepteur restaure leur sensibilité vis à vis du RA suggérant que les effets inhibiteurs de croissance sont médiés par le récepteur RARß (Li et al., 1995 ; Zhang et al., 1996).

Bien que les effets du RA sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires soient bien documentés, peu de travaux ont été menés sur l'étude de leur différenciation par cet agent. Il semble néanmoins que comme pour la prolifération cellulaire, le RA n'agisse que sur la différenciation des cellules hormono-dépendantes (Lopez-Boado et al., 1994). Le RA induit pour les cellules T47D un phénotype de cellules luminales (Jing et al., 1996) et entraîne une augmentation de l'expression de l'apolipoprotéine D, une induction de la production de gouttelettes lipidiques et de lactoferrine suggérant que ces cellules acquièrent un phénotype de cellules épithéliales mammaires sécrétrices pleinement différenciées (Lopez-Boado et al., 1994). Cependant, cette voie de différenciation induite par le RA ne semble pas représenter un cas général pour les cellules hormono-dépendantes puisque Guilbaud et al. (1990) ne montrent aucune différenciation des cellules MCF-7 vers une lignée à caractère sécrétoire sous l'influence de cet agent.

CHAPITRE 1

CHAPITRE 1

Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammmaires.

I) Introduction

La glande mammaire résulte essentiellement de la croissance d'un épithélium responsable de la mise en place des canaux mammaires dont l'extrémité présentera à chaque cycle oestrien un phénomène de différenciation pouvant aboutir à la production de lait dans le cas d'une gestation. Ainsi, une cellule épithéliale mammaire normale, comme tout autre cellule normale qui se forme dans l'organisme, prolifère et acquiert les propriétés spécialisées qui sont nécessaires à la fonction pour laquelle elle est destinée (différenciation). Cette évolution s'effectue sous l'action coordonnée d'un certain nombre de molécules régulatrices. Une fois leur différenciation terminée, les cellules normales cessent de proliférer, survivent ou meurent.

Au cours du processus tumoral, les altérations génomiques qui se produisent rendent la cellule cancéreuse autonome et la font échapper aux contrôles exercés par les molécules et/ou les cellules de l'organisme. La cellule tumorale prolifère, perd sa différenciation et n'assume plus ses fonctions normales. La prolifération anarchique et l'essaimage sont les traits essentiels des cellules cancéreuses responsables de la formation de tumeurs et de métastases.

Dans ce travail, à l'aide de facteurs connus pour inhiber la prolifération et/ou induire la différenciation cellulaire (le TGFß1, le NaB et le RA), nous analyserons d'une part le comportement des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) en présence de ces facteurs et d'autre part nous déterminerons si les cellules cancéreuses mammaires peuvent encore être, au moins partiellement, influencées par les facteurs de régulation de la multiplication et la différenciation des cellules normales.

Dans un premier temps, nous examinerons les effets des agents utilisés sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires et nous rechercherons si ces effets sont corrélés ou non à une induction de différenciation. Cette dernière sera analysée au niveau

ultrastructural par la recherche notamment de gouttelettes lipidiques (critère attribué à une différenciation cellulaire par McGrath et Soule en 1983), puis sera poursuivie par l'étude de deux marqueurs de différenciation : l'épisialine et l'α-lactalbumine. L'épisialine, encore appelée EMA, Muc1 ou PEM, est une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire isolée à partir de membranes de globules gras de lait humain ; elle n'est pas spécifique de la glande mammaire et constitue un marqueur de différenciation épithéliale (Sloane et Ormerod, 1981 ; To et al., 1981). L'α-lactalbumine est la protéine majeure du petit lait chez la plupart des mammifères ; elle joue un rôle essentiel dans la biosynthèse du lactose au sein des cellules épithéliales mammaires sécrétrices. Aussi, son étude permettra de mieux cerner la voie de différenciation suivie par les cellules épithéliales mammaires.

II) Matériels et méthodes

A) Matériels

1°) Cellules épithéliales mammaires

Notre étude s'est portée sur deux lignées épithéliales mammaires cancéreuses ayant des caractéristiques invasives différentes et sur des cellules épithéliales mammaires normales issues de mammoplasties réductionnelles.

a) Lignées cellulaires de cancer du sein

La lignée cellulaire MCF-7 provient d'effusions pleurales d'adénocarcinome de glande mammaire humaine (Soule et al., 1973). Cette lignée a conservé quelques caractéristiques d'épithélium mammaire différencié telles que l'aptitude à répondre à l'oestradiol via des récepteurs aux oestrogènes et la capacité de former des dômes en culture. En outre, ces cellules hormono-sensibles expriment différents marqueurs épithéliaux notamment l'E-cadhérine et les desmoplakines I et II (Sommers et al., 1994).

La lignée cellulaire MDA-MB-231 provient également d'effusions pleurales d'adénocarcinome de sein (Cailleau et al., 1974). Les cellules MDA-MB-231 sont hormono-indépendantes et possèdent un haut pouvoir invasif. Injectées à des souris nude, elles produisent des adénocarcinomes de type mammaire peu différenciés. Ces cellules, très fusiformes, présentent un phénotype fibroblastique et expriment la vimentine (Sommers et al., 1994).

Ces deux lignées cellulaires ont été gracieusement fournies par le Dr. JP. Peyrat (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Oscar Lambret, Lille).

b) Cellules épithéliales mammaires normales (CEMN)

Ces cellules ont été isolées à partir d'explants mammaires de patientes (âgées de 19 à 35 ans) ayant subit une mammoplastie réductionnelle pour raisons esthétiques. Les CEMN sont obtenues et cultivées selon le protocole décrit par Berthon et al. (1992) (cf. ci-dessous). Le caractère épithélial des cellules a été contrôlé pour chaque échantillon au niveau morphologique ainsi qu'au niveau biochimique par analyses immunocytochimiques des cytokératines 14 et 19 et de la vimentine. Les explants mammaires nous ont été généreusement offert par le Pr. JP. Pellerin (chirurgie plastique, Centre Hospitalier de Lille).

2°) Facteurs utilisés

Le TGFß1, le butyrate de sodium (NaB) et l'acide rétinoïque *tout trans* (RA) proviennent de chez Sigma.

Le TGFß1 est un recombinant humain. Il a été repris par une solution de PBS 4 mM HCl, 0,1% SAB à la concentration de 1 ng/µl et est conservé à -70°C. Juste avant utilisation, le TGFß1 est ajusté à la concentration désirée par du milieu de culture.

Le butyrate de sodium (NaB) est préparé à la concentration de 250 mM dans du PBS. Il est conservé à 4°C.

L'acide rétinoïque *tout trans* (RA) est préparé à la concentration de 5×10^{-2} M dans une solution composée de 75% de DMSO (diméthylsulfoxide) et de 25% d'éthanol absolu. La solution stock est aliquotée et congelée à -20 °C jusqu'à son utilisation. Le RA est alors ajusté à la concentration souhaitée par addition de milieu de culture. A cause de la sensibilité des rétinoïdes pour la lumière, toutes les manipulations utilisant le RA ont été effectuées dans la pénombre.

B) Milieux de culture et conditions d'entretien des cellules mammaires

Sauf indication contraire, les produits de culture proviennent de chez Eurobio.

1°) Culture des lignées cellulaires de cancer du sein

Les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 sont cultivées en boîte 75 cm^2 (Falcon) dans un milieu EMEM complet (Eagle Minimum Essential Medium) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté par chauffage (56°C, 30 min.), 5 µg/ml d'insuline (Endopancrine, Organon), 1% d'acides aminés essentiels, 2 mM de L-glutamine, 20 mM d'Hepes, 0,22% de bicarbonate de sodium et des antibiotiques : 40 µg/ml de gentamycine (Sigma), 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 95% d'air et 5% de CO_2.

2°) Obtention et conditions de culture des CEMN

Les explants mammaires issus de mammoplasties réductionnelles sont dégraissés et broyés de façon ménagée dans du sérum de veau foetal. Ils subissent ensuite une digestion enzymatique par de la collagènase de type XI (450 à 600 UI/ml) et de la hyaluronidase (450 UI/ml) dans un milieu "pré-B1" composé de DMEM/HamF12 (1/1) (Sigma), de 0,12% de bicarbonate de sodium et de 2 mM de NaOH auquel ont été ajoutés 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, de la pénicilline/streptomycine (100 UI/100 µg/ml) et de la fungizone (0,25 ng/ml).

La digestion est réalisée à 37°C et sous agitation pendant 4 à 6 heures jusqu'à l'obtention d'organoïdes individualisés (amas cellulaires de type acineux ou canalaire). Ces organoïdes sont récupérés après centrifugation sur gradient de ficoll (histopaque 1077, Sigma) (1 000g, 30 min.) au niveau de l'interface puis ils sont lavés dans du milieu pré-B1 par 4 centrifugations successives de 15 min. chacune : 2 centrifugations à 1 000g suivies de 2 centrifugations à 200g. Après ces 4 lavages, les organoïdes sont transvasés dans une boîte de culture de 75 cm^2 (Falcon) et mis en incubation à 37°C en atmosphère humide (95% d'air et 5% de CO_2) dans un milieu riche, milieu B1 constitué de milieu pré-B1 supplémenté en 5% de SVF, 10 µg/ml d'insuline, 5 x 10^{-6} M de cortisol (Sigma), 2 ng/ml d'EGF (Sigma), 100 ng/ml de toxine cholérique (Sigma) et d'antibiotiques : pénicilline/streptomycine (100 UI/100 µg/ml), gentamycine (40 µg/ml) et fungizone (0,25 ng/ml). Les organoïdes sont alors laissés 4 à 5 jours dans l'incubateur ce qui permet à la plupart d'entre eux d'adhérer sur le fond de la boîte de culture. Les autres sont récupérés par centrifugation (200 g, 15 min.) et remis en culture dans la même boîte. Le milieu B1 est ainsi changé tous les 3 jours. Des cellules épithéliales possédant un haut pouvoir prolifératif essaiment à partir des organoïdes adhérés et se dispersent sur le fond de la boîte de culture. Lorsque les cellules atteignent la préconfluence, le milieu B1 est remplacé par un milieu à faible teneur en calcium : milieu B2. La concentration calcique d'environ 1,05 mM pour le milieu B1 est diminuée à une concentration inférieure à 40 µM pour le milieu B2 par utilisation d'un milieu DMEM/HamF12 sans calcium (Sigma) et par chélation du SVF sur la résine Chelex 100 (Sigma). Cette faible teneur en calcium permet aux cellules ayant subi la division cellulaire de rester en suspension dans le milieu de culture. Les cellules flottantes sont récupérées tous les jours par centrifugation (200 g, 15 min.) pour être réensemencées dans du milieu B1. A confluence, les CEMN peuvent être décollées par de la trypsine et subir ainsi 2 à 3 passages maximum. Les cellules normales utilisées au cours de ce travail proviennent soit de cellules flottantes issues de la culture en milieu B2, soit de cellules repiquées à partir de culture en milieu B1.

Compte tenu de la grande différence de prolifération existant entre les cellules épithéliales mammaires étudiées (figure 15), celles-ci ont toujours été ensemencées à des

densités différentes de sorte qu'au moment de l'arrêt des traitements, elles aient atteint 60 à 70% de confluence.

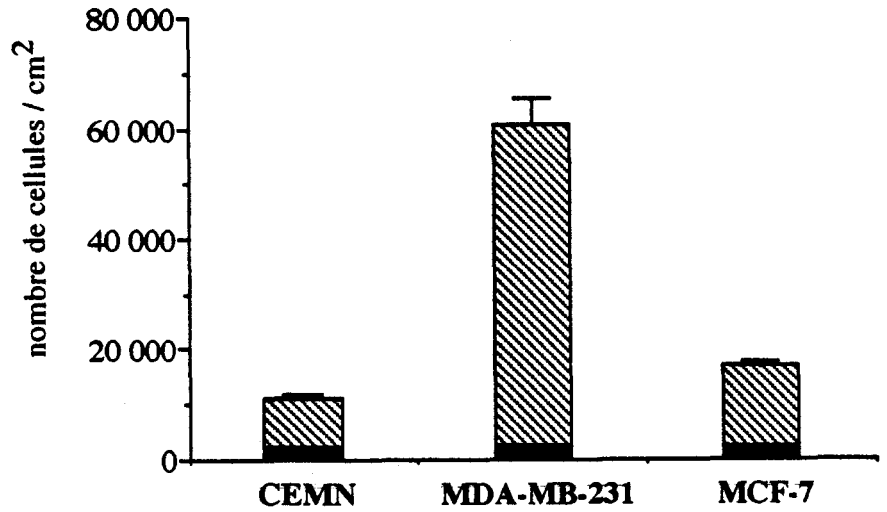


Figure 15 : Prolifération des cellules épithéliales mammaires cultivées en milieu B1 pour les CEMN et en milieu EMEM 10% SVF pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7. Les cellules ont été ensemmencées à la densité de 2 000 cellules/ cm^2 ■ et leur nombre a été déterminé après 6 jours de culture ▨ par comptage cellulaire (cellule de Malassez). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

C) Evaluation de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été estimée après incorporation de thymidine tritiée et par comptage cellulaire.

1°) Incorporation de thymidine tritiée

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de culture de 24 puits (Costar) dans 0,5 ml de leur milieu respectif. Quarante huit heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées dans le même milieu à différentes concentrations de TGFß1 ou de NaB pendant 24 heures, ou de RA pendant 96 heures. Quatre heures avant la fin du traitement, la thymidine tritiée ([^{3}H]-méthyl-thymidine, activité spécifique : 2 Ci/mmol, ICN) est ajoutée (1 µCi/puits).

Le milieu de culture est ensuite éliminé et les cellules sont traitées par l'acide trichloroacétique à 10% (0,5 ml/puits) pendant 45 min. à 4°C. Les cellules sont alors lavées 3 fois à l'eau courante et lysées par une solution de NaOH à 0,5 N (0,5 ml/puits) pendant 1 heure à 37°C. Le contenu de chaque puits est transféré dans une fiole à scintillation contenant 2,5 ml de liquide scintillant (Ready-Safe, Beckman). La radioactivité incorporée est mesurée à l'aide d'un compteur ß (LKB, Wallac). Toutes les mesures ont été effectuées 4 fois au cours de 3 expériences indépendantes.

2°) Comptages cellulaires

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Costar) dans 1,5 ml de milieu de culture. Quarante huit heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées au TGFß1 (2 ng/ml = 80 pM) , au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M) pendant des temps variant de 24 à 96 heures. Au moment souhaité pour l'arrêt du traitement, le milieu de culture est enlevé, les cellules sont rincées 2 fois au PBS et décollées par une solution de trypsine/EDTA (Eurobio) pendant 5 à 10 min. à 37°C. Les cellules sont alors comptées à l'aide d'un hématocytomètre (Cellule de Malassez). Les comptages correspondant à chacune des conditions ont été effectués 3 fois.

D) Appréciation de la différenciation cellulaire

La différenciation des cellules épithéliales mammaires est appréciée après 4 jours de traitement au TGFß1 (2 ng/ml), au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M). Les cellules sont traitées 48 heures après l'ensemencement et le traitement est renouvelé 2 jours plus tard. Le niveau de différenciation cellulaire est estimé par analyse ultrastructurale ou par la recherche de marqueurs de différenciation (l'épisialine et l'α-lactalbumine).

1°) Analyse ultrastructurale par microscopie électronique à transmission

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de culture de 24 puits (Costar). A la fin du traitement, le milieu de culture est éliminé et la fixation des cellules est réalisée directement dans les plaques de culture par une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, pendant 2 heures à 4°C. Après 3 lavages par le tampon phosphate (20 min. à 4°C), les cellules mammaires sont postfixées par du tétroxyde d'osmium à 1% (en tampon phosphate) pendant 1 heure à température ambiante. La pression osmotique de toutes les solutions est ajustée par du NaCl à 700 mosm. Les cellules sont ensuite déshydratées par des solutions d'acétone de concentration croissante (50%, 70%, 95% et 100%). L'acétone provoque le décollement du tapis cellulaire qui est alors transféré dans un tube à centrifugation. Après inclusion dans l'Epon 812, les coupes sont confectionnées à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert Om U2) équipé d'un couteau de diamant, elles sont ensuite colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de Pb et observées au microscope JEOL CX 100 à une tension d'accélération de 80 KV.

2°) Détection de l'α-lactalbumine par immunocytochimie (ICC)

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre préalablement traitées par du collagène I (préparé au laboratoire à partir de queue de rat). A la fin du traitement, elles sont rincées 2 fois 5 min. au PBS et sont fixées par du paraformaldéhyde à 4%, 30 min. à température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec de la glycine 0,1 M pendant 15 min., afin de bloquer les groupements réactifs du paraformaldéhyde. Les cellules sont alors perméabilisées par du Triton X100 (0,05%) pendant 15 min. Entre chacune de ces étapes, 2 rinçages abondants au PBS sont effectués. Les cellules sont ensuite incubées 5 min. dans du PBS, 3% H_2O_2 pour inhiber les peroxydases endogènes, puis saturées 30 min. à température ambiante par du PBS contenant 5% de sérum-albumine bovine (SAB). Les cellules sont alors incubées une nuit à 4°C en présence de l'anticorps polyclonal anti-α-lactalbumine humaine, anticorps immunoconjugué à la peroxydase (TEBU), dilué au 1/200. Après 3 lavages abondants

par du PBS, l'immunoréactivité des cellules est révélée par une incubation de 5 à 10 min. dans une solution AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole, Sigma) en tampon acétate (0,05 M, pH 5) contenant 0,3% d'H_2O_2. Les cellules sont rincées à l'eau distillée, colorées par une solution de bleu Evans 1/1000 pendant une minute puis rincées successivement à l'eau courante et à l'eau distillée. Les lames sont montées au glycergel.

3°) Détection de l'α-lactalbumine et de l'épisialine (EMA) par test ELISA

a) préparation des protéines cellulaires

Pour chaque condition de culture, les protéines cellulaires ont été extraites à partir de 5 boîtes de Pétri 150 mm (Falcon). A la fin du traitement, le milieu de culture est éliminé et la couche cellulaire est abondamment rincée par du PBS, avant d'être grattée du fond de boîte en présence de 5 ml de PBS. Le tapis cellulaire est ensuite récupéré par centrifugation à 1500 g (JOUAN B3-11), pendant 15 min. et repris sur de la glace par 1 ml d'une solution de PBS contenant 0,1 mM de PMSF. Les cellules sont ensuite broyées dans un homogénéisateur de Dounce. Le broyat obtenu est centrifugé à 200 g (Sigma 202 MK) pendant 30 min. à 4°C. Le surnageant est récupéré, aliquoté et congelé immédiatement pour une utilisation ultérieure.

La quantité de protéines est mesurée par la méthode de Bradford (1976) (Microtest BIORAD, la sérum-albumine bovine (Sigma) servant de standard). Parallèlement, le nombre de cellules est déterminé par comptage (Cellule de Malassez).

b) Test ELISA

Des aliquotes protéiques, extraites comme décrit ci-dessus, sont soumises à une immunodétection de type ELISA ("Enzymatic Ligand Immunosorbant Assay") sur des plaques de microtritation de 96 puits (Falcon). Dans chaque puits est déposée une quantité de protéines équivalente à 100 000 cellules ; le dépôt est maitenu une nuit à 4°C et sous agitation. Puis, après aspiration de leur contenu, les puits sont saturés, 30 min. à 37°C, par 200 µl de PBS contenant 1% de SAB et 0,1% d'azide de sodium. Ils sont ensuite lavés 4 fois avec du PBS, 0,1% SAB, 0,05% Tween 20. Les protéines adsorbées dans les puits sont incubées, une nuit à 4°C et sous

agitation, en présence de l'un des 2 anticorps primaires utilisés : l'anti-α-lactalbumine humaine (anticorps polyclonal, Sigma) dilué au 1/50 ou l'anti-épisialine (EMA) humaine (anticorps monoclonal, Sigma) dilué au 1/500. Après 4 lavages par du PBS, 0,1% SAB, 0,05% Tween 20, l'incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé (Sigma), dilué au 1/1000, est réalisée pendant 4 à 5 heures à température ambiante et sous agitation. Après 4 lavages, les puits sont mis en présence du complexe streptavidine-peroxydase (Sigma), dilué au 1/250 (une heure, à température ambiante, sous agitation), puis sont de nouveau lavés 4 fois. La révélation est réalisée, pendant 10 à 15 min. et à température ambiante, en présence d'OPD (orthophényldiamine) dans un tampon citrate, pH 5,5 (9 mg d'OPD pour 25 ml de tampon citrate) auquel sont ajoutés 16 µl d'H_2O_2 à 30% (100µl de cette solution sont ajoutés par puits). Puis, la révélation est arrêtée par addition de 50µl d'HCl 3N. Pour la détection de l'α-lactalbumine, une gamme étalon a été effectuée en parallèle avec de l' α-lactalbumine humaine (Sigma). La densité optique (D.O) du contenu des puits est appréciée au lecteur de plaques (Dynatech MR 700) à 490 nm. Les mesures correspondantes à chacune des conditions de culture ont été réalisées 6 fois.

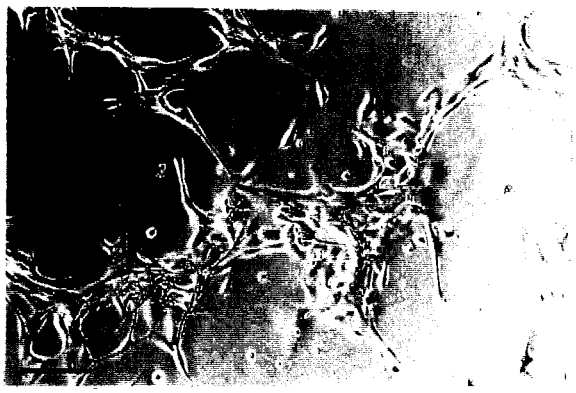
III) Résultats

Après traitement par le TGFß1, le NaB et le RA, des changements morphologiques spécifiques ont été observés (figures 16 et 17). Ces changements surviennent 48 heures après l'application des substances, ils sont plus ou moins marqués selon le type cellulaire et selon le traitement mais sont dans tous les cas amplifiés avec la durée du traitement.

Le TGFß1 conduit à un aplatissement et à une élongation des CEMN (figure 16) mais n'induit pas de modifications des cellules épithéliales mammaires cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7 (figure 17). En présence de NaB, les 3 types cellulaires étudiés présentent un aspect effilé. D'autre part, les cellules sont moins jointives, notamment les cellules MCF-7 qui ne poussent plus regroupées en clone comme lorsqu'elles sont non traitées (figure 17). Ces dernières acquièrent par ailleurs une forme polygonale à partir de laquelle partent des

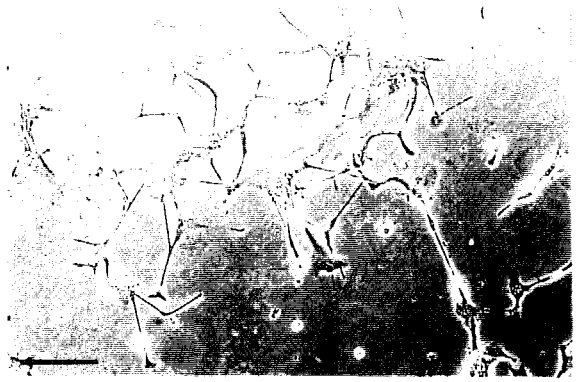
CEMN

Témoin



TGFß1

NaB



RA

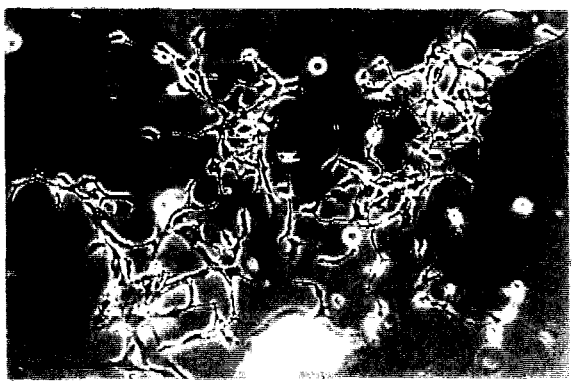


Figure 16 : Modification de la morphologie des CEMN après traitement de 4 jours au TGFß1 (2 ng/ml), au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M) en milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes). Les prises de vues ont été réalisées avec un appareil Olympus IMT-2 sur film Kodak T-Max 400 ASA. Le trait correspond à 40 µm.

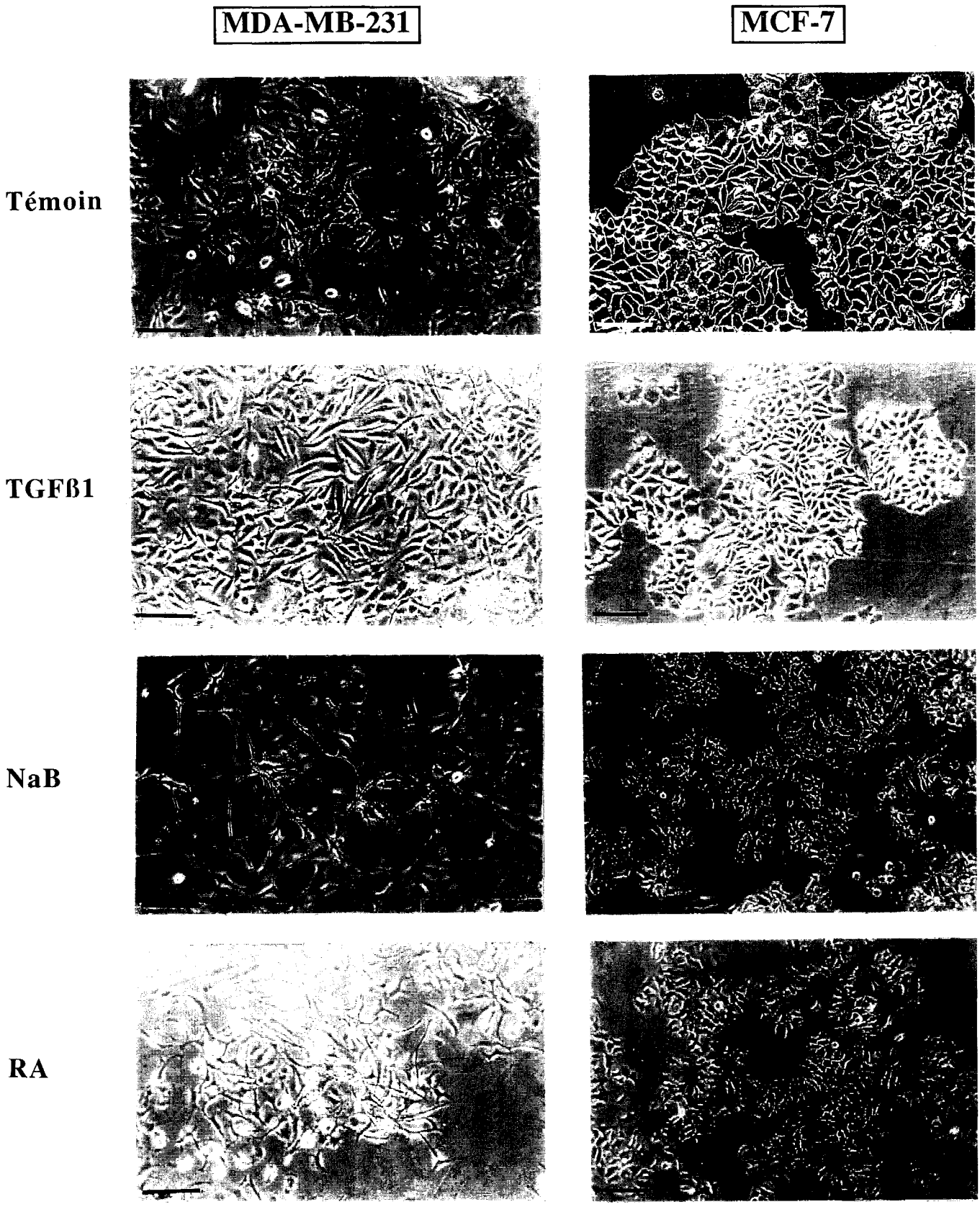


Figure 17 : Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la morphologie des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sont traitées 4 jours au TGFß1 (2 ng/ml), au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M) en milieu EMEM 10% SVF (cf. Matériels et Méthodes). Le trait correspond à 40 µm.

prolongements cytoplasmiques conférant à certaines d'entre elles un aspect étoilé. Le RA induit également des prolongements cytoplasmiques sur les trois types cellulaires mais les modifications morphologiques observées sont moins importantes que celles induites par le NaB (figures 16 et 17).

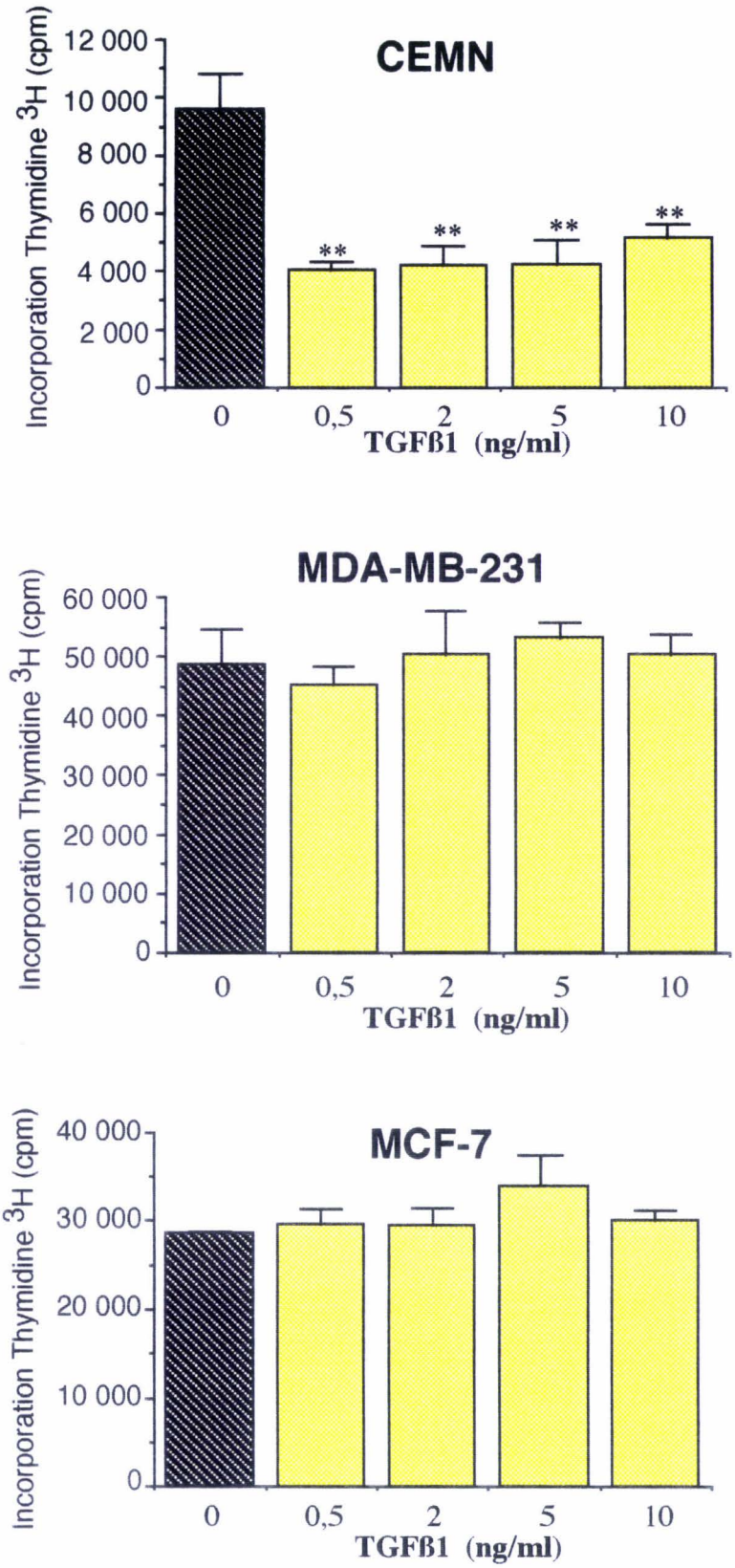
Afin de définir les conditions optimales d'utilisation de ces agents, notamment pour l'étude de la différenciation cellulaire, nous avons traité les cellules épithéliales mammaires à différentes concentrations pendant des temps variant de 24 heures à 8 jours. La concentration et la durée optimales ont été déterminées comme celles entraînant le maximum d'inhibition de la prolifération sans effet cytotoxique. Ainsi, les traitements des cellules ont été menés pendant 4 jours à la concentration de 2 ng/ml (80 pM) pour le TGFß1, 1 mM pour le NaB et 10^{-5} M pour le RA. La viabilité des cellules traitées a été vérifiée par le test d'exclusion au bleu Trypan. D'autre part, nous avons observé la reprise de la prolifération cellulaire dès l'arrêt des traitements.

Nous présenterons tout d'abord les effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Puis, nous considérerons les effets de ces agents au niveau ultrastructural avant de décrire les résultats relatifs à l'étude des 2 marqueurs de différenciation recherchés (l'épisialine et l'α-lactalbumine).

A) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires

1°) Effet du TGFß1 sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires

Nos résultats (figure 18) montrent qu'un traitement au TGFß1 pendant 24 heures diminue d'environ 50% l'incorporation de thymidine tritiée des CEMN cultivées en milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes) et ce, quelle que soit la concentration utilisée (0,5 à 10 ng/ml). Par contre, des concentrations inférieures à 0,5 ng/ml ne modifient pas l'incorporation de ^{3}H thymidine (résultats non montrés).



BU
LILLE I

Figure 18 : Effet du TGFß1 sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Les cellules épithéliales mammaires sont cultivées en milieu B1 pour les CEMN (cf. Matériels et Méthodes) et en milieu EMEM 10% SVF pour les cellules cancéreuses mammaires. Elles sont traitées 24 heures au TGFß1 aux concentrations indiquées . La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. Les valeurs résultent de la moyenne de trois expériences indépendantes, leur signicativité est calculée par rapport aux cellules non traitées, elle est indiquée par ** ($p < 0,01$).

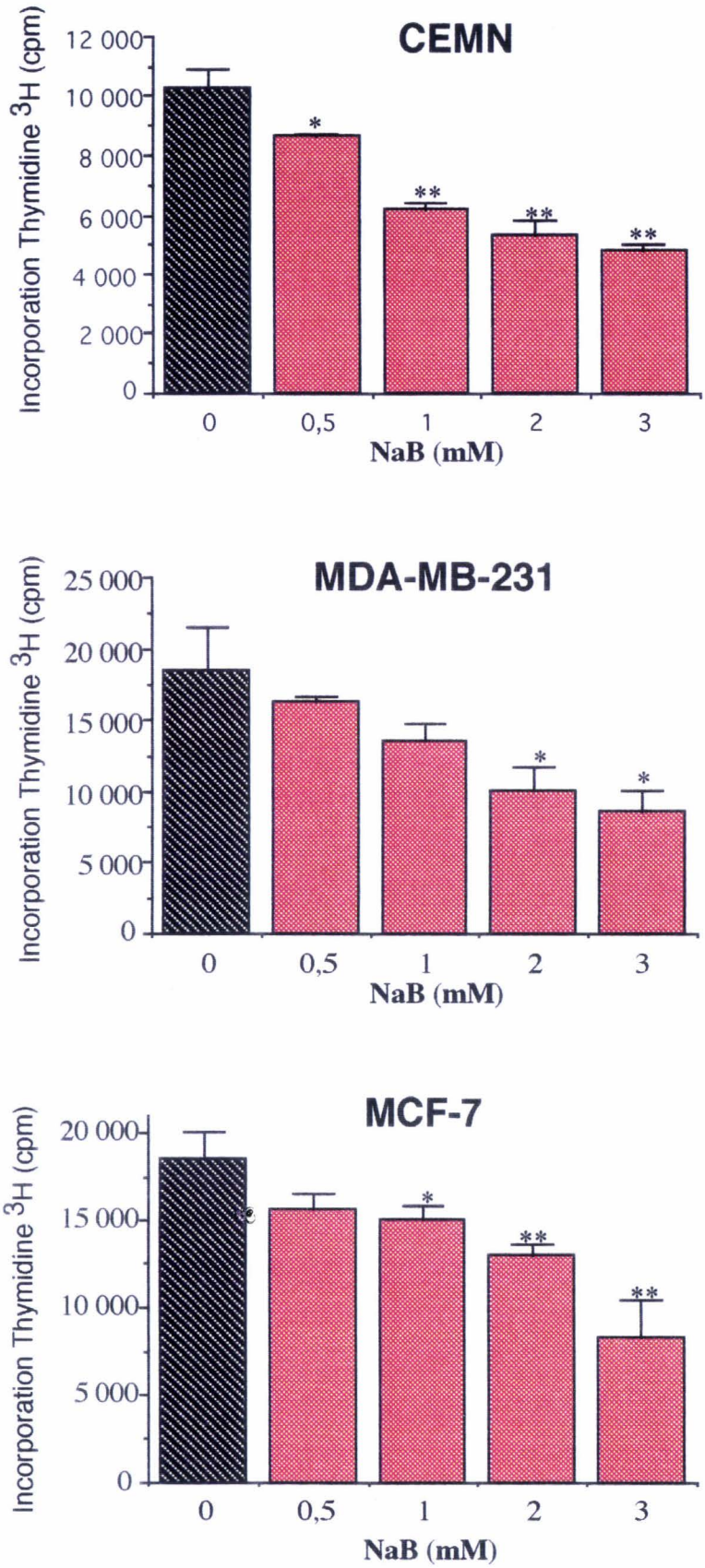


Figure 19 : Effet du NaB sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Les celllules, cultivées en milieu B1 pour les CEMN (cf. Matériels et Méthodes) et en milieu EMEM 10% SVF pour les cellules cancéreuses, sont traitées pendant 24 heures au NaB aux concentrations indiquées. La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes. Leur signicativité est calculée par rapport aux cellules non traitées, elle est indiquée par ** ($p < 0,01$), * ($p<0,05$).

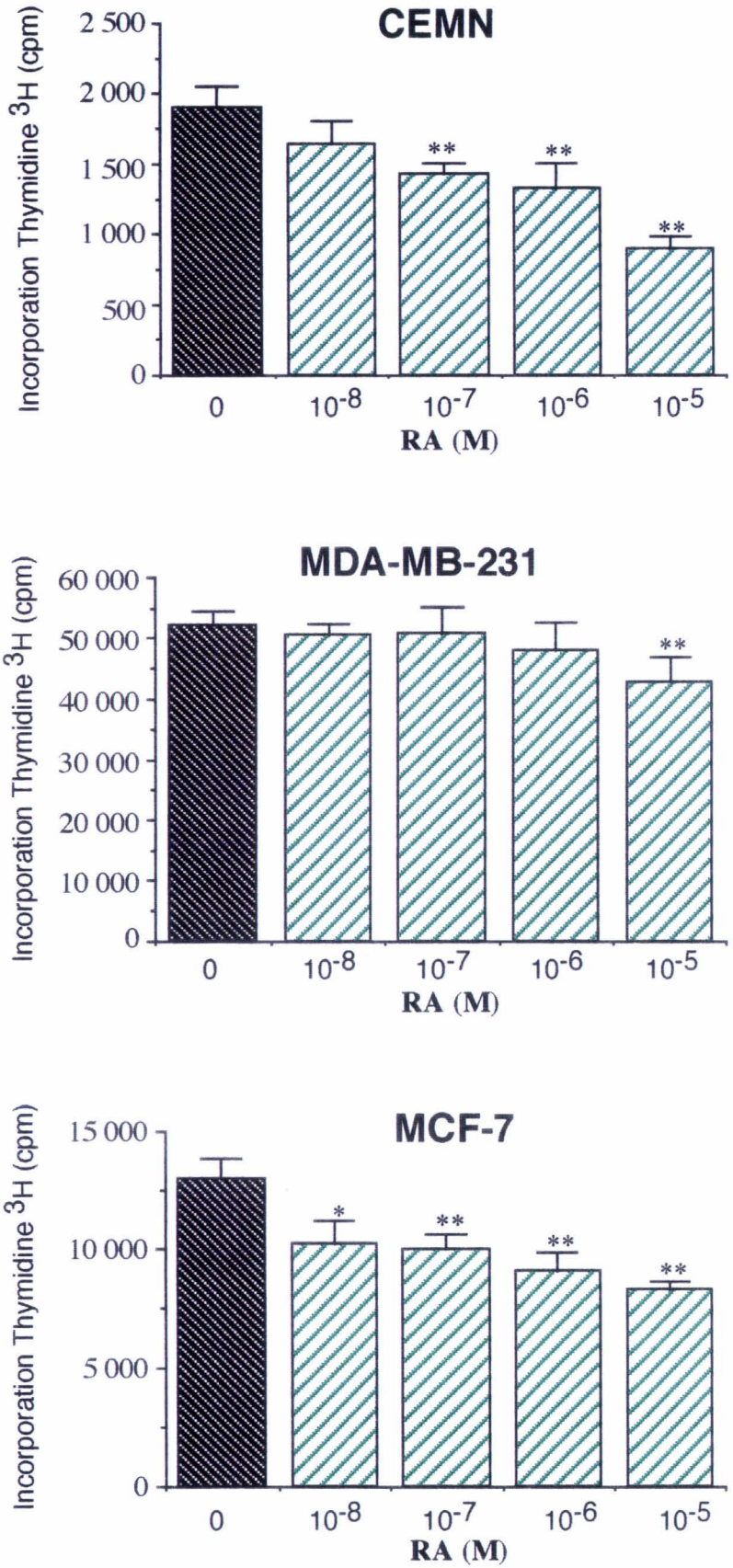


Figure 20 : Effet du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Les cellules sont traitées au RA aux concentrations indiquées pendant 96 heures en milieu B1 pour les CEMN (cf. Matériels et Méthodes) et en milieu EMEM 10% SVF pour les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. Les valeurs résultent de la moyenne de trois expériences indépendantes, leur significativité est calculée par rapport aux cellules non traitées, elle est indiquée par ** ($p < 0,01$) , * ($p < 0,05$).

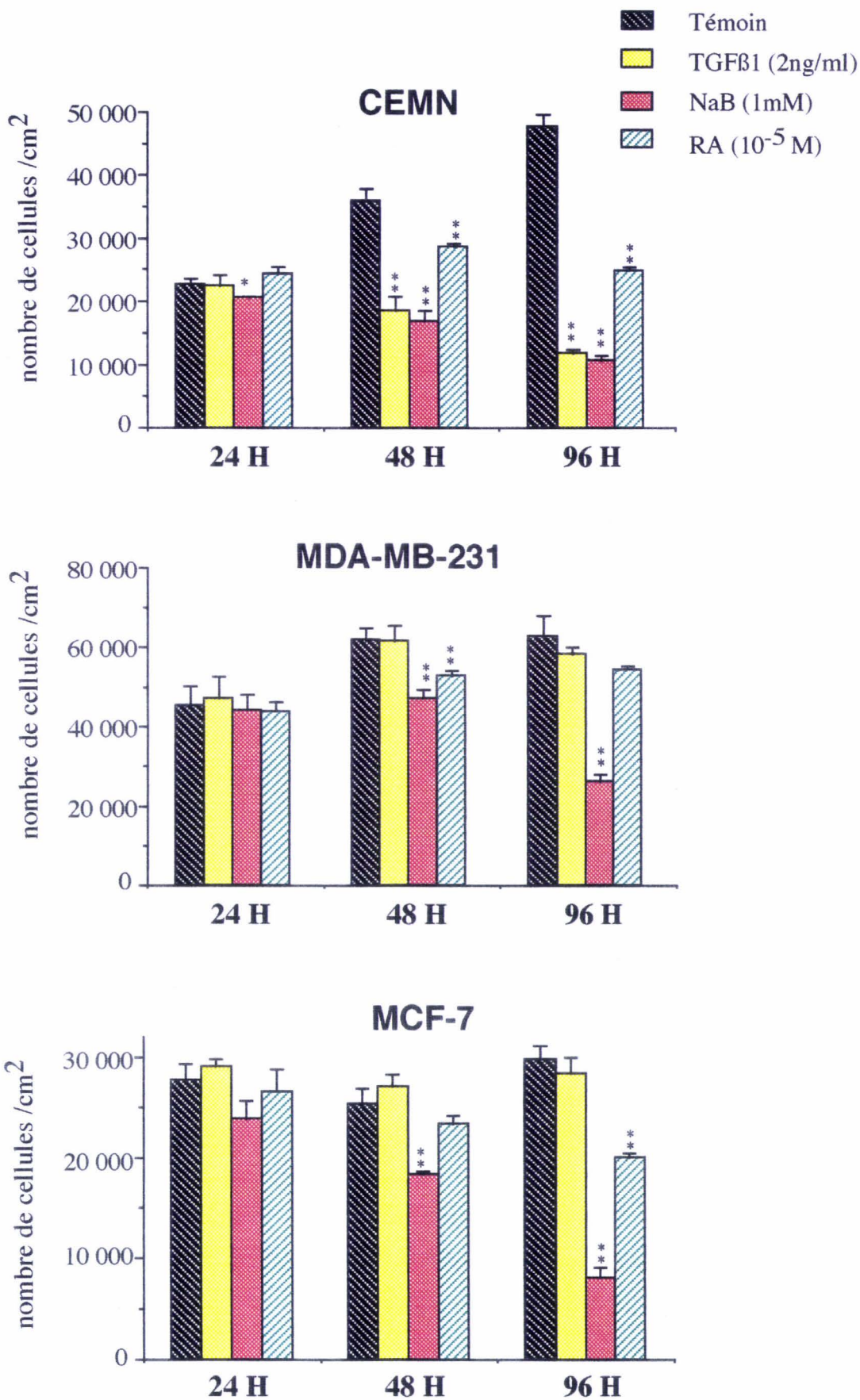


Figure 21 : Effet du TGFß1, du NaB et du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Les cellules sont traitées en milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes) pour les CEMN et en milieu EMEM 10% SVF pour les cellules cancéreuses pendant des temps variant de 24 à 96 heures. Les cellules sont décollées par une solution de trypsine/EDTA et comptées à l'aide d'un hématocytomètre. Les résultats correspondent à la moyenne de trois comptages cellulaires d'une expérience représentative des 6 expériences effectuées, ils sont exprimés en nombre de cellules/cm^2. Leur signicativité est calculée par rapport aux cellules non traitées (Témoin), elle est indiquée par ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$).

A l'inverse, les cellules épithéliales mammaires cancéreuses (MDA-MB-231 et MCF-7) ne présentent pas de modification de leur incorporation de thymidine tritiée après un traitement de 24 heures au TGFß1 en milieu EMEM 10% SVF (figure 18).

Sachant que l'effet du TGFß1 sur la prolifération cellulaire peut varier en fonction du niveau de sérum présent dans le milieu de culture (Vivien et al., 1993), nous avons également apprécié l'effet du TGFß1 sur la prolifération cellulaire en absence de sérum et nous avons observé que le sérum ne semble pas influencer l'effet du TGFß1 quel que soit le type cellulaire considéré (résultats non montrés).

Par ailleurs, la dinimution de la prolifération des CEMN traitées au TGFß1 (2ng/ml) est amplifiée avec la durée du traitement : le TGFß1 diminue le nombre de CEMN de 50% après 48 heures de traitement et de 75% après 96 heures (figure 21).

Par contre, la prolifération des cellules épithéliales mammaires cancéreuses n'est pas modifiée de façon significative par addition de TGFß1, quel que soit le temps d'action de ce facteur (figure 21).

2°) Effet du NaB sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires

Les résultats obtenus (figure 19) indiquent qu'après 24 heures de traitement, le NaB diminue de façon dose-dépendante l'incorporation de ^{3}H thymidine des 3 types cellulaires étudiés. Bien que le NaB inhibe à la concentration de 3 mM de l'ordre de 55% l'incorporation de thymidine tritiée des trois types cellulaires, les CEMN semblent toutefois plus sensibles à l'effet antiprolifératif de ce facteur. En effet, la concentration de 1 mM entraîne pour ces cellules une diminution de l'incorporation de ^{3}H thymidine de 40% alors que cette même concentration n'induit pas de variations significatives pour les cellules MDA-MB-231 et seulement 20% d'inhibition pour les cellules MCF-7.

Cependant, à la concentration de 1 mM, l'effet inhibiteur du NaB augmente avec la durée du traitement pour les 3 types cellulaires étudiés (figure 21) : il atteint 80% pour les CEMN, 58% pour les cellules MDA-MB-231 et 73% pour les cellules MCF-7 après 96 heures de traitement. Par ailleurs, un traitement de 48 heures réduit de moitié le nombre de CEMN

alors que seule une diminution de 25 à 30% est observée pour les cellules cancéreuses mammaires, confirmant ainsi une sensibilité plus importante des CEMN au NaB.

3°) Effet du RA sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires

Quelle que soit la concentration utilisée, un traitement de 24 à 48 heures n'affecte pas l'incorporation de thymidine tritiée de chacun des types cellulaires utilisés. Toutefois, après un traitement de 4 jours (figure 20), nous avons observé un effet inhibiteur dépendant de la dose de RA sur l'incorporation de ^{3}H thymidine des CEMN et des cellules MCF-7. Bien que ces deux types cellulaires présentent une même réduction de leur incorporation de thymidine tritiée aux concentrations de 10^{-7} M et 10^{-6} M (25 à 30% d'inhibition), la prolifération des CEMN est cependant plus affectée que celle des cellules MCF-7 à la concentration de 10^{-5} M (53% et 36% respectivement). A cette même concentration, les cellules MDA-MB-231 n'ont montré qu'une légère diminution de leur incorporation en ^{3}H thymidine (20%).

Après 4 jours de traitement, le RA à la concentration de 10^{-5} M diminue de moitié le nombre de CEMN, il ne produit aucun effet sur la prolifération des cellules MDA-MB-231 et diminue celle des cellules MCF-7 de 33% (figure 21).

B) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la différenciation des cellules épithéliales mammaires

1°) Effets au niveau ultrastructural

a) Les CEMN

Les CEMN non traitées par les inhibiteurs de prolifération gardent leur polarité sur le support plastique (figure 22 A) : en particulier, elles présentent des microvillosités au niveau de leur surface apicale, caractéristique de cellules épithéliales bordant les canaux mammaires. Leur cytoplasme contient des microfilaments d'actine (encore appelés fibres de stress), répartis en

paquets (figure 22 B) et essentiellement localisées au niveau du pôle basal de la cellule (figure 22 A). Cette répartition pourrait rendre compte des tensions basales existant au sein de la cellule et permettant le maintien de la cellule dans une position horizontale, fermement attachée au substrat de culture. Les CEMN renferment peu de réticulum endoplasmique (figure 22 A) ; on remarque que le cytoplasme est riche en polyribosomes libres. Par ailleurs, ces cellules en l'absence de tout traitement, contiennent quelques gouttelettes lipidiques (figure 22 A et B).

Le TGFß1 et le RA n'entraînent aucune modification ultrastructurale des CEMN. A l'inverse, le NaB modifie l'ultrastructure de ces cellules : les CEMN présentent une forme moins étirée (figure 22 C et D), les fibres de stress sont localisées autour du noyau (figure 22 D) et le cytoplasme est riche en gouttelettes lipidiques à proximité desquelles se trouve un appareil de Golgi bien développé (figure 22 C). D'autre part, on remarque la présence de vacuoles autophagiques (figure 22 D).

b) Les cellules MDA-MB-231

Ces cellules, qui ne présentent pas de polarité (figure 23 A), possèdent des vésicules de pinocytose au niveau de leurs deux faces. D'autre part, elles montrent des caractères relatifs à un phénotype peu différencié, voir indifférencié. On remarque en effet, un rapport noyau/cytoplasme élevé, ainsi qu'un cytoplasme pauvre en organites et en composants du cytosquelette.

En outre, aucun agent utilisé n'a modifié l'ultrastructure des cellules.

c) Les cellules MCF-7

Les cellules MCF-7 non traitées (figure 23 B) sont nettement polarisées. Le pôle apical est garni de microvillosités, caractéristique des cellules épithéliales bordant les canaux mammaires. Leur cytoplasme, contrairement à celui des cellules MDA-MB-231, présente un cytosquelette formé par des paquets de fibres de stress (figure 23 C) bien que moins développé que celui des CEMN. Les cellules MCF-7 apparaissent comme des cellules métaboliquement très actives puisqu'elles possèdent de nombreuses mitochondries entourées par du réticulum endoplasmique granuleux (figure 23 C).

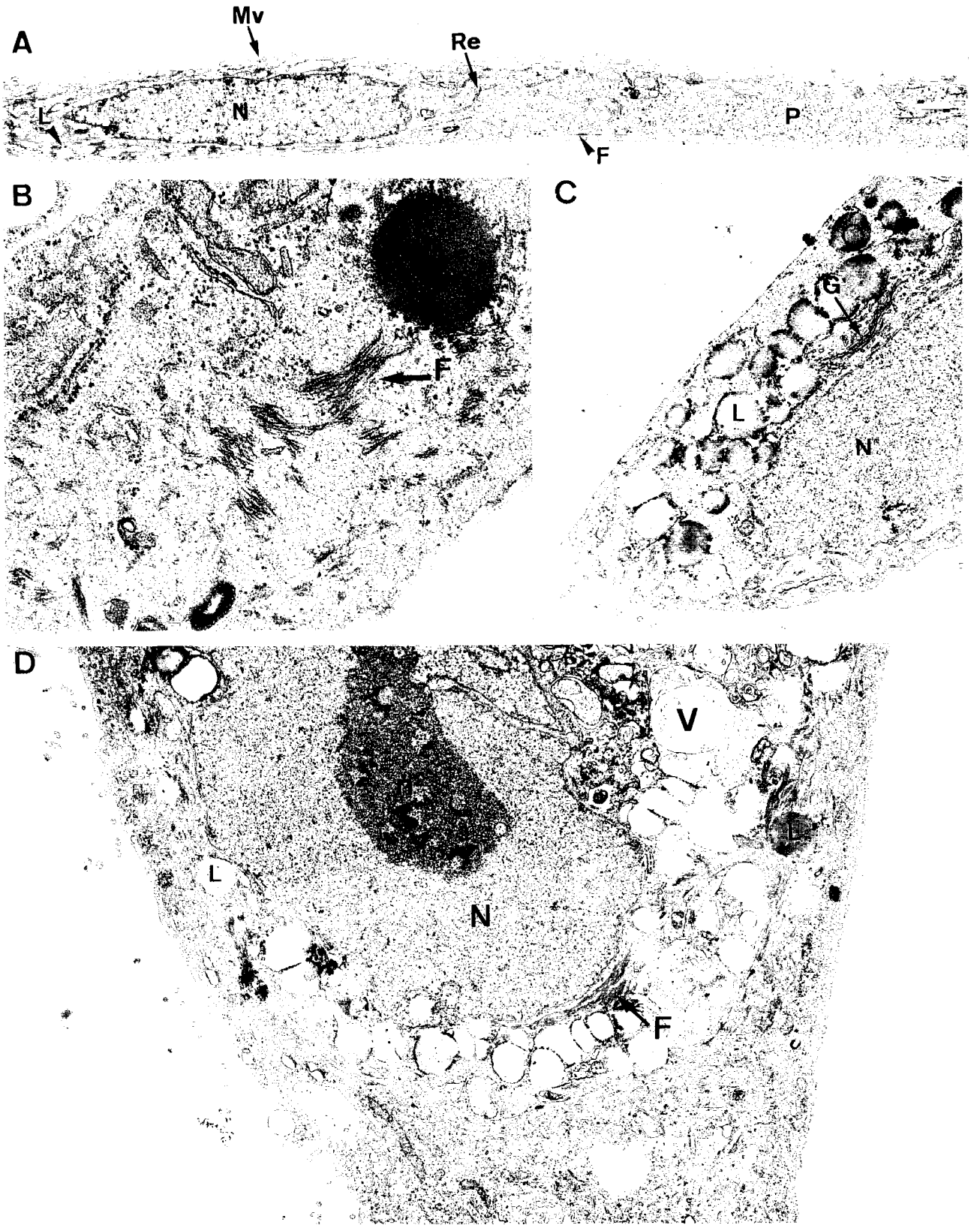


Figure 22 : Ultrastructure des cellules épithéliales mammaires normales traitées ou non au NaB (1 mM) pendant 4 jours.
A et **B** : CEMN non traitées (grossissement x 7 500 et 33 000 respectivement).
C et **D** : CEMN traitées au NaB (grossissement x 13 000 et 10 000 respectivement).
N : noyau, n : nucléole, L : gouttelette lipidique, Mv : microvillosités, Re : réticulum endoplasmique, F : fibres de stress, P : polyribosomes libres, G : appareil de Golgi, V : vacuole autophagique.

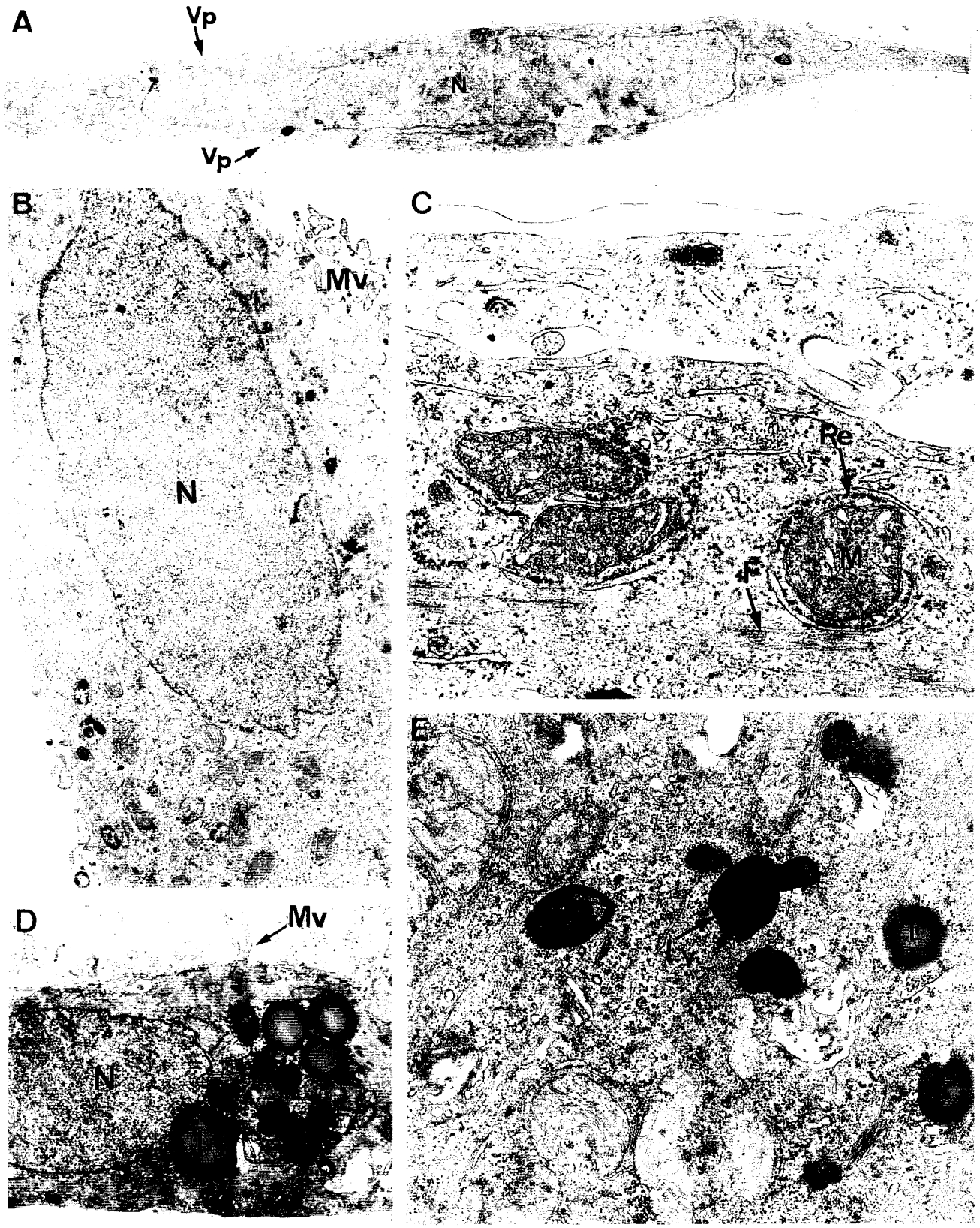


Figure 23 : Ultrastructure des cellules épithéliales mammaires cancéreuses traitées ou non pendant 4 jours au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M).
A : MDA-MB-231 non traitées (grossissement x 5 800).
B et **C** : MCF-7 non traitées (grossissement x 7 500 et 38 000 respectivement).
D : MCF-7 traitées au NaB (grossissement x 7 000).
E : MCF-7 traitées au RA (grossissement x 20 000).
N : noyau, Vp : vésicule de pinocytose, Mv : microvillosités, M : mitochondrie, Re : réticulum endoplasmique, F : fibres de stress, L : gouttelette lipidique, Ly : lysosome secondaire.

Le TGFß1 ne modifie pas l'ultrastructure des cellules MCF-7. A l'inverse, le NaB induit l'apparition de gouttelettes lipidiques et une augmentation du nombre de microvillosités de la surface apicale (figure 23 D). Le RA entraîne également l'apparition de gouttelettes lipidiques dont la quantité est toutefois nettement plus faible que celle des cellules traitées au NaB, il induit par ailleurs la formation de lysosomes secondaires (figure 23 E).

2°) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la production d'épisialine et d'α-lactalbumine des cellules mammaires

a) Production de l'épisialine (EMA)

La détection de l'épisialine au niveau des cellules épithéliales mammaires a été effectuée dans un premier temps par ICC. L'immunomarquage observé est identique et de très forte intensité quel que soit le type cellulaire considéré, que les cellules soient traitées ou non par le TGFß1, le NaB ou le RA (résultat non montré).

La production d'épisialine a été appréciée par test ELISA. Nos résultats (figure 24) montrent que les trois types de cellules épithéliales mammaires étudiées expriment l'épisialine (EMA) notamment les CEMN qui présentent une valeur de D.O trois fois supérieure à celle des lignées cancéreuses mammaires.

Le TGFß1 induit des modifications des quantités d'EMA variables selon le type cellulaire ; sur les CEMN, il provoque une diminution de 60% de la quantité d'épisialine mais ne produit pas d'effet significatif sur les cellules MDA-MB-231 alors qu'il multiplie d'un facteur 2 la quantité d'EMA des cellules MCF-7.

L'effet du NaB sur cette glycoprotéine est moins hétérogène que celui du TGFß1. Le NaB induit une augmentation de la quantité d'épisialine de 40% pour les CEMN et de 230% pour les cellules MCF-7 mais il ne produit aucun effet sur les cellules MDA-MB-231. Ainsi, les MCF-7 traitées au NaB expriment la même quantité d'EMA que les CEMN non traitées (Témoin).

Le RA produit un effet significatif seulement sur la quantité d'épisialine des CEMN. Toutefois, l'augmentation observée est de faible amplitude (30%).

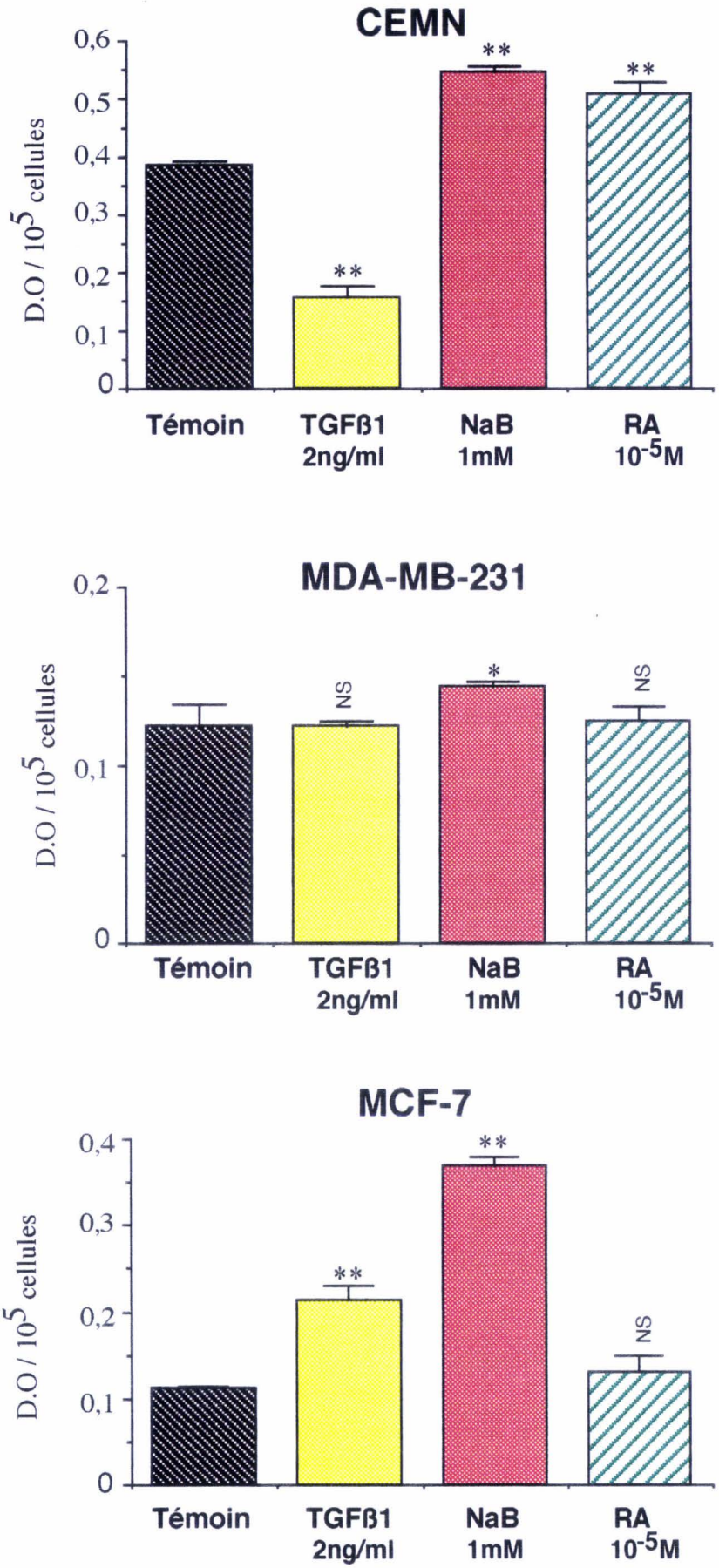


Figure 24 : Détection de l'épisialine (EMA) par test ELISA. Les résultats correspondent à la moyenne de 6 détections, ils sont exprimés en D.O (490 nm)/10^5 cellules. Leur significativité est calculée par rapport aux cellules non traitées (Témoin), elle est indiquée par ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$) ou par NS (non significatif).

b) Détection de l'α-lactalbumine par ICC

Lorsque les cellules sont non traitées (Témoin), l'immunoréactivité de l'anticorps anti-α-lactalbumine est plus importante pour les CEMN et les cellules MCF-7 que pour les cellules MDA-MB-231 (figure 25).

Un traitement des cellules au TGFß1 ou au RA ne modifie pas leur immunomarquage (résultat non montré).

Le NaB par contre, induit des modifications de l'immunoréactivité de l'anticorps, variables selon le type cellulaire (figure 25). Un traitement au NaB semble augmenter très faiblement l'immunomarquage de l'α-lactalbumine des CEMN, il n'entraîne pas de modification pour les cellules MDA-MB-231 et il augmente fortement l'immunoréactivité de l'anticorps au sein du cytoplasme des cellules MCF-7.

Sur cette figure, on retrouve les modifications morphologiques des cellules, précédemment décrites, après traitement au NaB. On remarquera également que les cellules MDA-MB-231 n'ont pas conservé leur intégrité structurale ; cet artefact résulte de la nécessité de perméabiliser assez fortement leur membrane cellulaire afin de permettre la pénétration de l'anticorps anti-α-lactalbumine.

c) Production de l'α-lactalbumine

En l'absence de traitement, les CEMN apparaissent comme étant les cellules qui produisent la plus grande quantité d'α-lactalbumine (de l'ordre de 700 ng/100 000 cellules) (figure 26). Cette quantité correspond au double de celles observées pour les deux lignées cancéreuses mammaires qui montrent toutes les deux une production d'α-lactalbumine de l'ordre de 350 ng/100 000 cellules.

Le TGFß1 et le RA n'exercent aucune variation significative des quantités d'α-lactalbumine quel que soit le type cellulaire considéré.

Un traitement au NaB n'entraîne qu'une très légère augmentation de la quantité d'α-lactalbumine produite par les CEMN (15%), il n'exerce aucun effet sur les cellules MDA-MB-231 et augmente fortement (130%) celle produite par les cellules MCF-7. Aussi, comme pour la

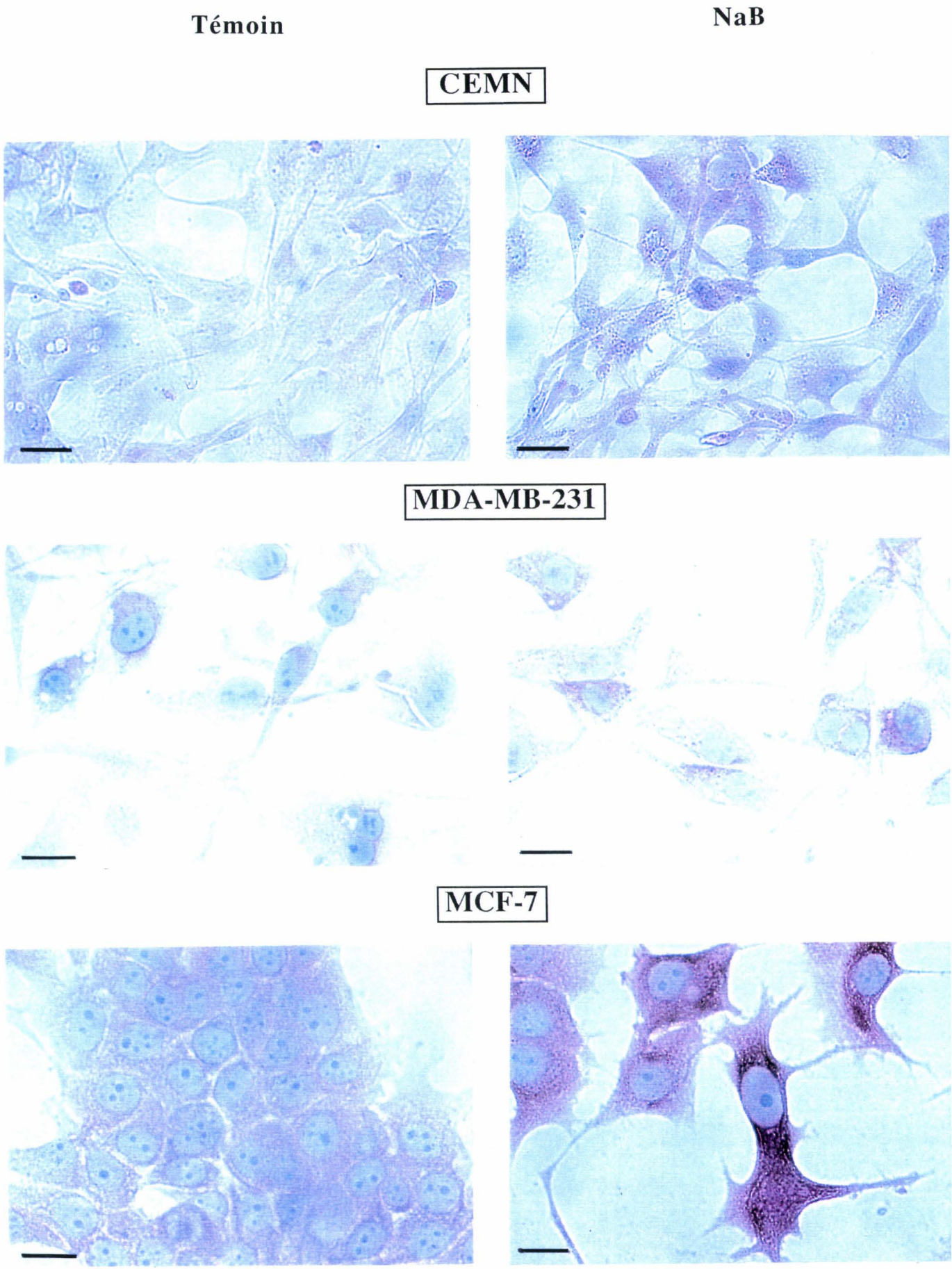


Figure 25 : Immunolocalisation de l'α-lactalbumine dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses traitées ou non au NaB (1 mM) pendant 4 jours. Le trait correspond à 9 µm.

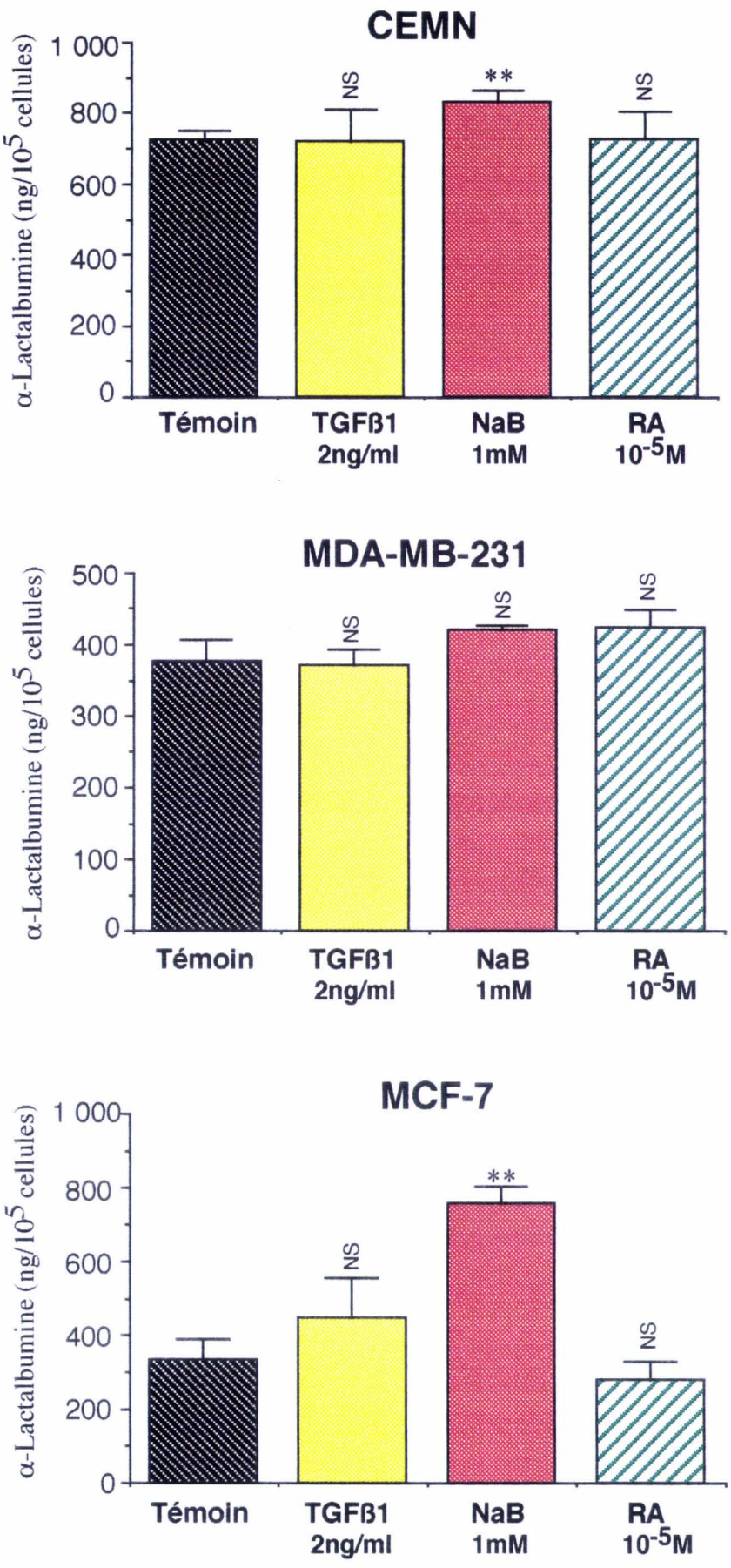


Figure 26 : Détection de l'α-lactalbumine par test ELISA. Les résultats correspondent à la moyenne de 6 déterminations, ils sont exprimés en ng/10^5 cellules. La significativité des résultats des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées (Témoin) est indiquée par ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$) ou par NS (non significatif).

quantité d'EMA, cette augmentation induite par le NaB amène les cellules MCF-7 à exprimer la même quantité d'α-lactalbumine que les CEMN lorsqu'elles ne sont pas traitées.

IV) Discussion

Nos résultats montrent que chacun des trois agents utilisés agit de façon particulière sur les cellules épithéliales mammaires et que cette action diffère en fonction du statut normal ou cancéreux de ces cellules. Nous examinerons donc successivement les effets de chacun des trois agents.

A) Effets du TGFß1 sur les cellules épithéliales mammaires

Nous avons observé que la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) est inhibée par le TGFß1 : ce facteur inhibe leur prolifération de façon maximale dès les plus faibles doses utilisées dans ce travail et cet effet est amplifié avec la durée du traitement. Ce résultat est en accord avec de précédentes observations menées sur des cellules épithéliales mammaires normales d'origines variées. En effet, des inhibitions de la prolifération par le TGFß1 ont déjà été rapportées pour des cellules humaines (Hosobuchi et al., 1989 ; Valvérius et al., 1989 ; Takahashi et al., 1990), des cellules murines (Etheir et Van de Velde, 1990 ; Mieth et al., 1990) ou encore des cellules bovines (Woodward et al., 1995).

Par ailleurs, nous avons montré qu'à l'inverse des CEMN, les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ne modifient pas leur prolifération sous l'influence du TGFß1. Les nombreuses études conduites sur les cellules épithéliales mammaires cancéreuses ont fourni des résultats très controversés. Ainsi, il a été montré que les cellules MDA-MB-231 sont soit insensibles (Kalkhoven et al., 1995b), soit sensibles à l'effet inhibiteur du TGFß1 (Knabbe et al., 1987 ; Arteaga et al., 1988-1990 ; Zugmaier et al., 1989). D'autre part, les effets de ce facteur de croissance sur la prolifération de la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 ont été largement documentés et comme pour la lignée MDA-MB-231, les travaux ont décrit soit une résistance

(Arteaga et al., 1988 ; Zugmaier et al., 1989 ; Akavaag et al., 1990 ; Sun et al., 1994), soit une sensibilité à l'action anti-prolifératrice du TGFß1 (Knabbe et al., 1987 ; Arrick et al., 1990 ; Kalkhoven et al., 1995b-1996 ; Mazars et al., 1995 ; Vogel et Abel, 1995). Ces différences observées dans la réponse au TGFß1 peuvent être dues en partie aux conditions de culture. En effet, il a été montré *in vitro* que l'effet inhibiteur du TGFß1 sur un grand nombre de lignées cellulaires tumorales et notamment la lignée MCF-7, dépendait de la présence d'acides gras poly-insaturés (Newman 1990) dont la teneur varie fortement d'un sérum à un autre ; ceci pourrait expliquer la variabilité des réponses observées par les différents travaux menées sur les cellules malignes traitées au TGFß. Par ailleurs, Fernandez-Pol et al. (1986) ont décrit que ce facteur stimulait la prolifération des cellules MDA-MB-231 cultivées en présence de SVF alors qu'il inhibait leur croissance en milieu dépourvu de sérum. Dans notre travail, nous avons contrôlé qu'en absence de sérum, les cellules épithéliales mammaires gardaient le même comportement vis à vis du TGFß1. D'autre part, il convient de souligner que des dérives génétiques peuvent survenir pour des lignées cellulaires variées cultivées à long terme au sein de différents laboratoires. Ces dérives peuvent aboutir à des modifications de la sensibilité des cellules aux facteurs de croissance, notamment au TGFß1. En effet, il a été montré que des cellules MCF-7 cultivées à long terme devenaient résistantes à l'effet antiprolifératif du TGFß1, cette résistance étant corrélative d'une perte de récepteur de haute affinité de type II pour ce facteur de croissance (Mazars et al., 1995). De même, pour de nombreuses cellules tumorales humaines telles que les cellules de rétinoblastome (Kimchi et al., 1988), les cellules de carcinome de peau (Ichijo et al., 1990 ; Reiss et Stash, 1990), les cellules d'hépatome (Inagaki et al., 1993 ; Hasegawa et al., 1995), les cellules leucémiques (Kadin et al., 1994), les cellules cancéreuses gastriques (Park et al., 1994), les cellules cancéreuses de pancréas (Freeman et al., 1995), les cellules de cancer du côlon (Wang et al., 1996) et les cellules de cancer du sein (Arteaga et al., 1988 ; Laiho et al., 1990b ; Sun et al., 1994 ; Kalkhoven et al., 1995b ; Mazars et al., 1995), une insensibilité au TGFß1 a été corrélée à un faible niveau d'expression ou à une absence de récepteurs de haute affinité pour ce facteur de croissance.

Ainsi, dans ce travail, nous avons montré que dans nos conditions expérimentales, les cellules épithéliales mammaires cancéreuses contrairement aux cellules normales sont

insensibles à l'effet antiprolifératif du TGFß. Une telle différence de comportement entre la prolifération de cellules normales et de cellules malignes de même origine soumises à l'action de ce facteur de croissance a déjà été rapportée pour d'autres types cellulaires : la prolifération de mélanocytes est inhibée par le TGFß alors que celle de cellules de mélanomes n'est pas affectée par ce facteur de croissance (Krasagakis et al., 1994) ; il en est de même pour les lymphocytes et les cellules de lymphomes (Kopper et al., 1994). Par ailleurs, au niveau de la peau, le TGFß inhibe la formation de tumeurs bénignes alors qu'il stimule la progression tumorale (Cui et al., 1996).

L'arrêt de la prolifération induite par le TGFß1 peut dans certains cas, entraîner la différenciation cellulaire. Ce facteur induit la différenciation de cellules épithéliales normales telles que les cellules bronchiques (Masui et al., 1986), les cellules intestinales (Kurokawa et al., 1987) ou les hépatocytes (Sanchez et al., 1995) mais il peut également avoir un effet différenciateur sur des cellules cancéreuses telles que des cellules du côlon (Hafez et al., 1992 ; Chakrabarty et Huang , 1995) ou des cellules leucémiques (Bombara et Ignotz, 1992 ; Burger et al., 1994). Par ailleurs, le TGFß peut potentialiser l'action différenciatrice de l'acide rétinoïque, des esters de phorbol et de la vitamine D3 sur des types cellulaires variés telles que des cellules prostatiques (Danielpour, 1996), des cellules d'ostéosarcomes (Bonewald et al., 1992) ou des cellules leucémiques (Testa et al., 1993 ; Fiorelli et al., 1994 ; Taipale et al., 1994a). Le seul effet différenciateur du TGFß1 observé dans ce travail a été obtenu sur les cellules MCF-7 pour lesquelles ce facteur de croissance a doublé la quantité d'épisialine. A l'inverse, un traitement des CEMN au TGFß1 a conduit à une réduction de la production de cet antigène membranaire, ce qui pourrait représenter une forme de "dédifférenciation". Ce résultat n'est pas sans rappeler les travaux de Miettinen et al. (1994) menés sur des cellules épithéliales mammaires normales de souris (cellules NMuMG). Ces auteurs ont en effet montré que le TGFß1 entraîne une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux et une augmentation de marqueurs mésenchymateux conduisant ainsi à la transdifférenciation des cellules épithéliales mammaires en cellules à caractère fibroblastique. Sur les cellules MDA-MB-231, le TGFß1 n'a conduit à aucune modification de l'expression de l'épisialine. Bien que le TGFß1 puisse induire une certaine différenciation des cellules MCF-7, il semble toutefois que son effet différenciateur soit

limité puisqu'aucun des types cellulaires étudiés n'a montré une augmentation de sa quantité d'α-lactalbumine après traitement au TGFß1. Cette observation n'est pas surprenante compte tenu du rôle inhibiteur du TGFß dans le développement de la glande mammaire *in vivo*. En effet, outre son action inhibitrice de la croissance des bourgeons mammaires (Silberstein et Daniel, 1987 ; Daniel et Robinson, 1992), le TGFß influence le fonctionnement même de la glande mammaire en inhibant la sécrétion de protéines du lait notamment la caséine ß (Robinson et al., 1993) et l'α-lactalbumine (Yamamoto et al., 1994) dans le milieu de culture d'explants mammaires de souris gestantes. De même dans des souris transgéniques, une surexpression du TGFß1 au niveau de la glande mammaire s'oppose à la fois au développement lobuloalvéolaire et à la production des protéines du lait au cours de la gestation (Jhappan et al., 1993). Toutefois, cet effet du TGFß varie en fonction de l'état de différenciation initial des explants mammaires : ce facteur de croissance inhibe la sécrétion de caséine ß d'explants mammaires issus de souris en gestation alors qu'il n'inhibe pas cette sécrétion lorsque les explants mammaires proviennent de souris en lactation (Sudlow et al., 1994). De la même façon, un effet variable du TGFß1 dépendant de l'état de différenciation initial des cellules mammaires pourrait être à l'origine des résultats opposés, décrits par Walker-Jones et al. (1989) et nous-mêmes, sur la production d'EMA des cellules épithéliales mammaires normales. En effet, contrairement à ces auteurs, nous avons montré une diminution de l'épisialine après action du TGFß1, suggérant une action "dédifférenciatrice" de ce facteur de croissance sur les cellules mammaires normales. Une telle influence du TGFß1 sur la différenciation cellulaire a d'ailleurs été rapportée pour des cellules épithéliales mammaires de souris en culture pour lesquelles le TGFß s'oppose à la synthèse de caséine ß induite par le déxaméthasone et la prolactine (Mieth et al., 1990).

L'ensemble de ces résultats montre que les effets du TGFß sur la différenciation cellulaire sont complexes. Il est probable qu'*in vivo* ce facteur de croissance exerce des effets indirects sur la différenciation de l'épithélium mammaire en agissant sur le stroma adjacent, notamment en impliquant des variations dans la production de la matrice extracellulaire. En effet, il a été décrit que les cellules épithéliales mammaires ne peuvent répondre de façon optimale à la différenciation induite par les hormones lactogènes que lorsqu'elles sont

cocultivées avec des cellules du mésenchyme (fibroblastes ou adipocytes) ou lorsqu'elles sont cultivées en présence de matrice extracellulaire (Lin et Bissel, 1993). On sait par ailleurs, que les fibroblastes mammaires synthétisent du TGFß1 (Coletta et al., 1990 ; Butta et al., 1992 ; Benson et al., 1996 ; Dong-Le Bourhis et al., 1997) et que ce facteur de croissance est capable d'induire la synthèse de composants de la matrice extracellulaire (Rizzino, 1988 ; Stampfer et al., 1993). En outre, beaucoup d'activités biologiques du TGFß apparaissent être dues à ses effets sur la matrice extracellulaire (Massagué, 1990). Ainsi, si le TGFß1 requiert de telles interactions epithélio-mésenchymateuses pour exercer son effet différenciateur sur les cellules épithéliales mammaires, il n'est pas étonnant que dans nos conditions de culture, ce facteur ait entrainé des effets limités sur les cellules étudiées.

B) Effets du NaB sur les cellules épithéliales mammaires

Le NaB a été initialement utilisé pour ses effets anti-prolifératifs et anti-tumoraux, puis des études ont montré que ces effets étaient le résultat d'une induction de différenciation (Prasad, 1980). Ainsi, cet agent est capable d'inhiber la prolifération et d'induire la différenciation de types cellulaires variés tels que les cellules de neuroblastomes (Prasad, 1980), les cellules leucémiques (Leder et Leder, 1975), les cellules de tératocarcinomes (Kosaka et al., 1991), les cellules de cancer du côlon (Tsao et al., 1982 ; Barnard et Warwick, 1993 ; Ho et al., 1994) ou encore les cellules de cancer du sein (Abe et Kufe, 1984a, b-1986 ; Graham et Buick, 1988 ; Guilbaud et al., 1990).

Nous avons observé que le NaB réduit fortement la prolifération des trois types épithéliaux mammaires étudiés. Cette diminution de la prolifération est fonction de la dose et est augmentée avec la durée du traitement. En outre, le NaB agit sur la différenciation des CEMN et des cellules cancéreuses MCF-7. D'une part, il augmente leur quantité d'EMA et d'α-lactalbumine et d'autre part, il accroît le contenu en gouttelettes lipidiques des CEMN et induit la formation de gouttelettes de lipides dans le cytoplasme des cellules MCF-7. La différenciation induite par le NaB est toutefois beaucoup plus importante pour les cellules MCF-7 : cet agent

triple leur quantité d'EMA et double leur quantité d'α-lactalbumine. L'effet du NaB sur la production d'EMA des cellules cancéreuses MCF-7 a déjà été rapporté par Guilbaud et al. (1990). Néanmoins, bien que l'EMA soit un antigène membranaire isolé à partir de globules gras du lait, il n'est pas spécifique de la glande mammaire et est actuellement utilisé comme indicateur de différenciation de cellules épithéliales au sens large (Sloane et Ormerod, 1981 ; To et al., 1981). Aussi, l'étude de l'expression de l'α-lactalbumine, antigène spécifique de la glande mammaire, nous a permis de préciser l'effet du NaB sur la différenciation des cellules épithéliales mammaires tant par analyse immunocytochimique des cellules traitées que par mesure de la quantité de cet antigène par test ELISA. Il a par ailleurs été décrit que le NaB augmente l'expression d'un antigène de haut poids moléculaire détectable dans le lait humain (Abe et Kufe, 1984b), antigène dont la sécrétion est également accrue par cet agent (Abe et Kufe, 1986). Toutefois, ni les travaux antérieurs portant sur l'épisialine, ni ceux portant sur des antigènes spécifiques du lait n'ont comparé l'effet du NaB sur les cellules cancéreuses mammaires à celui des cellules normales. Nous avons montré qu'en absence de tout traitement, les CEMN expriment plus d'EMA et d'α-lactalbumine que les cellules cancéreuses MCF-7 et sont par conséquent plus différenciées que ces dernières. Cependant, un traitement au NaB conduit les cellules MCF-7 à exprimer les mêmes quantités des deux marqueurs de différenciation étudiés que les CEMN lorsqu'elles sont non traitées. Ainsi, le NaB est capable d'induire la différenciation des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en ramenant ces cellules à un niveau d'expression normal de marqueurs de différenciation alors que sur les CEMN, cellules déjà fortement différenciées, cet agent ne peut entraîner qu'un effet différenciateur limité.

Nous avons constaté que les cellules cancéreuses MDA-MB-231 présentent, malgré leur ultrastructure de cellules très peu différenciées, un niveau détectable d'α-lactalbumine, niveau égal d'ailleurs à celui des cellules MCF-7, cellules possédant par contre des caractéristiques ultrastructurales de cellules épithéliales bordant les canaux mammaires. Ce fait n'est pas surprenant puisqu'il a été décrit par ailleurs que des marqueurs biochimiques de glande mammaire totalement différenciée peuvent également être exprimés par les cellules cancéreuses mammaires (Pich et al., 1976 ; Arklie et al., 1981). En outre, l'influence du NaB sur la

différenciation des cellules MCF-7 s'oppose à l'insensibilité des cellules MDA-MB-231 pour ce facteur. Cette différence de comportement entre ces 2 lignées vis à vis du NaB n'est pas sans rappeler les travaux de Graham et Buick (1988) qui ont élargi l'étude du NaB à 6 lignées de cancer du sein, hormono-dépendantes ou non, dont les lignées MCF-7 et MDA-MB-231. Ces auteurs ont observé que, si le NaB provoque pour toutes les lignées étudiées, une inhibition de la croissance et des modifications morphologiques semblables, seules les trois lignées exprimant les récepteurs aux oestrogènes présentent des signes de différenciation (accumulation de lipides et de glycoprotéines membranaires de globules gras du lait). Toutefois, étant donné que cette différenciation ne peut être bloquée par les anti-oestrogènes, ces auteurs n'ont pas pu établir le rôle des récepteurs aux oestrogènes dans les changements phénotypiques induits par le NaB. L'expression des récepteurs aux oestrogènes serait probablement un marqueur des types cellulaires capables de se différencier en une lignée à caractère sécrétoire sous l'influence du NaB et il reste possible que les lignées ne possédant pas de récepteurs aux oestrogènes seraient aussi induites à se différencier mais en une lignée à caractère non sécrétoire. Toutefois, l'analyse ultrastructurale et le niveau d'EMA des cellules MDA-MB-231 observés dans notre travail après traitement au NaB, révèlent que ce type cellulaire n'est pas différenciable par cet agent, le NaB n'entrainant aucune modification phénotypique des cellules MDA-MB-231.

Ainsi, les cellules MCF-7, cellules tumorales déjà différenciées et peu invasives sont capables de se différencier davantage sous l'influence du NaB, de sorte à exprimer les mêmes quantités de marqueurs de différenciation que les cellules épithéliales mammaires normales, alors que les cellules MDA-MB-231, cellules peu différenciées et hautement invasives, représentant par conséquent un stade plus avancé dans le développement tumoral, échappent au contrôle de la différenciation. A l'opposé, il semble que les cellules mammaires normales, fortement différenciées, ne peuvent plus se différencier davantage sous l'effet du NaB.

C) Effets du RA sur les cellules épithéliales mammaires

Dans notre travail, nous avons montré que le RA diminue la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) et des celules cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 alors qu'il inhibe peu la prolifération des cellules cancéreuses hormono-indépendantes MDA-MB-231. Ces résultats relatifs aux cellules cancéreuses sont conformes à ceux précédemment observés. En effet, il a été rapporté que le RA inhibait la prolifération des cellules cancéreuses possédant des récepteurs aux oestrogènes telles que les cellules MCF-7, tandis que les cellules ne possédant pas de récepteurs aux oestrogènes, telles que les cellules MDA-MB-231, étaient insensibles à cet agent (Lacroix et Lippman, 1980 ; Fontana et al., 1987-1990 ; Van der Burg et al., 1993). En outre, le RA a été présenté comme un facteur anti-oestrogénique puisqu'il diminue la stimulation de la prolifération induite par les oestrogènes sur les cellules hormono-sensibles (Fontana et al., 1990) et qu'il inhibe par ailleurs la transcription des gènes induits par les oestrogènes (Demirpence et al., 1994). Toutefois, la nature de la relation existant entre l'expression des récepteurs aux oestrogènes et la sensibilité au RA reste inconnue.

D'autre part, il a été suggéré que le mécanisme d'inhibition de la croissance des cellules par le RA impliquerait la régulation de la production de facteurs de croissance et/ou de récepteurs de facteurs de croissance et/ou de la transduction du signal (Sporn et al., 1986). Ainsi, le RA diminue la stimulation de la prolifération induite par l'IGF1 sur les cellules MCF-7 (Fontana et al., 1991 ; Li et al., 1994) en augmentant la production des IGFBP notamment de l'IGFBP3, protéine qui lie l'IGF avec une très forte affinité (Adamo et al., 1992). De la même façon, un pré-traitement des cellules épithéliales mammaires cancéreuses au RA inhibe la stimulation de la prolifération induite par le TGFα (Halter et al., 1993). A côté de cet effet du RA sur le contrôle de facteurs de croissance régulant positivement la croissance cellulaire, cet agent est également capable d'induire la synthèse du TGFß1 sur de nombreux types cellulaires tels que les kératinocytes (Glick et al., 1989 ; Batova et al., 1992), les cellules leucémiques (Taipale et al., 1994a ; Turley et al., 1995) ou encore les cellules prostatiques (Danielpour, 1996). Sachant, d'une part que les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses synthétisent et sécrètent du TGFß1 (Zajchowski et al., 1988 ; Arrick et al., 1990) et d'autre

part, qu'elles sont inhibées par ce facteur de croissance (Knabbe et al., 1987 ; Valvérius et al., 1989 ; Arrick et al., 1990), on pourrait supposer que la régulation de leur prolifération par le RA résulte d'une augmentation de la production de TGFß1 qui agirait de manière autocrine et/ou paracrine. Toutefois, si cette hypothèse peut se révéler correcte pour les CEMN, il n'en est pas de même pour les cellules MCF-7 dont la prolifération est inhibée par le RA mais non modifiée par le TGFß1.

Bien que les rétinoides soient connus pour leur effets antiprolifératifs sur les cellules cancéreuses mammaires, la régulation de la différenciation cellulaire a été peu étudiée. Nous avons montré que le RA induit une augmentation de la quantité d'EMA des CEMN, qu'il entraîne l'apparition de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules MCF-7 mais qu'il n'a pas d'effet différenciateur sur les cellules MDA-MB-231. Une augmentation de la quantité de lipides après traitement au RA a déjà été décrite pour la lignée cancéreuse mammaire T47D (Lopez-Boado et al., 1994). Dans ce travail, les auteurs ont également mis en évidence que le RA induisait la synthèse de lactoferrine. Par ailleurs, il a été montré que la lignée cancéreuse mammaire T47D, lignée hormono-dépendante, pouvait acquérir un phénotype de cellule luminale après traitement au RA (Jing et al., 1996).

Comme le RA n'a induit aucune modification des quantités d'α-lactalbumine quelles que soient les cellules épithéliales mammaires étudiées, il semble qu'il soit dans notre système, un inducteur de différenciation plus faible que le NaB. Ce fait a déjà été remarqué sur les cellules MCF-7 pour lesquelles il a été décrit que contrairement au NaB, le RA était incapable d'augmenter l'EMA, d'induire la synthèse de gouttelettes lipidiques et d'augmenter la synthèse de glycoprotéines de haut poids moléculaire détectables dans le lait humain (Abe et Kufe, 1984b ; Guilbaud et al., 1990). De même, le NaB est un inducteur de différenciation plus puissant que le RA sur les cellules de cancer du côlon humain (Tsao et al., 1982). Ainsi, bien que le RA soit capable d'induire une forte différenciation de cellules cancéreuses telles que des cellules de tératocarcinomes (Strickland et Mahdavi, 1978 ; Webb et al., 1986 ; De Luca, 1991 ; Atencia et al., 1994) ou des cellules leucémiques (Breitman et al., 1983 ; Reiss et al., 1985), il semble que son effet soit faible sur les cellules de cancer du sein.

En résumé, le TGFß1 inhibe la prolifération et entraîne une "dédifférenciation" des cellules normales et, malgré une absence d'effet sur la croissance des cellules tumorales, il est capable d'induire une certaine différenciation des cellules MCF-7. Le NaB est à la fois un inhibiteur de prolifération de tous les types de cellules épithéliales mammaires étudiés, cancéreuses ou non et un inducteur de différenciation à l'exception des cellules cancéreuses MDA-MB-231. Le RA inhibe la prolifération des CEMN et des cellules cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 mais ces deux types cellulaires ne manifestent qu'une légère réponse différenciatrice à ce facteur. Les cellules cancéreuses hormono-indépendantes MDA-MB-231 restent insensibles au RA.

Au regard de l'ensemble de ces résultats, il apparaît qu'une induction de différenciation n'est pas obligatoirement liée à une inhibition de prolifération. En effet, les CEMN montrent une prolifération fortement réduite sous l'influence du TGFß1, cet effet toutefois ne s'accompagne pas d'une augmentation de différenciation mais au contraire d'une "dédifférenciation" de ces cellules. A l'inverse, ce facteur n'affecte pas la croissance des cellules MCF-7 alors qu'il est capable dans une certaine mesure d'induire leur différenciation. Par ailleurs, la capacité de différenciation des cellules mammaires dépend de leur état de différenciation initial. Ainsi le NaB, puissant inhibiteur de prolifération et inducteur de différenciation dans notre système, entraîne un bel effet différenciateur sur les cellules cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 puisqu'il les conduit à exprimer les mêmes taux d'épisialine et d'α-lactalbumine que les cellules normales. Alors que pour ces dernières, dont l'état initial de différenciation est déjà élevé, il n'entraîne qu'un effet limité. En outre, bien que les cellules cancéreuses MDA-MB-231 présentent une inhibition de leur prolifération sous l'influence du NaB, il semble que ces cellules fortement invasives et possédant des caractéristiques de cellules indifférenciées, soient plus difficiles à contrôler puisqu'aucun effet différenciateur n'est observé après traitement.

CHAPITRE 2

CHAPITRE 2

Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires.

I) Introduction

Au cours de la progression tumorale dans le cancer du sein, les cellules épithéliales de la glande mammaire prolifèrent, perdent leur différenciation et envahissent le mésenchyme, formant alors une masse tumorale qui pourra disséminer à travers l'organisme. Ainsi, les capacités des cellules cancéreuses à proliférer et à migrer ont un rôle crucial dans le phénomène d'invasion tumorale.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le TGFß1, le NaB et le RA étaient capables de réguler la prolifération et/ou la différenciation des cellules épithéliales mammaires, nous analyserons à présent la capacité de ces agents à influencer le processus de migration cellulaire. La mobilité cellulaire requiert l'activation de nombreux gènes : sont associées au processus migratoire les activités des protéines du système de la plasmine et des métalloprotéases qui dégradent la matrice extracellulaire et permettent ainsi à la cellule de se déplacer. Ces enzymes sont largement exprimées dans les cellules tumorales (Evers et al., 1982 ; Dano et al., 1985 ; Nishino et al., 1988 ; Gaylis et al., 1989 ; Duffy et al., 1990 ; Jänicke et al., 1990). La dégradation de la matrice extracellulaire implique l'action de la collagénase et de la stromélysine dont les précurseurs sont activés par la plasmine (figure 27). La plasmine, sérine protéase est le produit de transformation du plasminogène par les activateurs du plasminogène notamment de type urokinase (uPA). En outre, il est indéniable que l'uPA a un rôle dans les processus métastatiques : d'une part la surexpression de cet activateur du plasminogène augmente le potentiel métastatique de cellules de mélanome et de cellules cancéreuses prostatiques (Yu et Schultz, 1991 ; Achbarou et al., 1994) et d'autre part, des anticorps dirigés spécifiquement contre l'uPA sont capables de bloquer la métastase de cellules de cancer du poumon (Ossowski et al., 1991 ; Kobayashi et al., 1994).

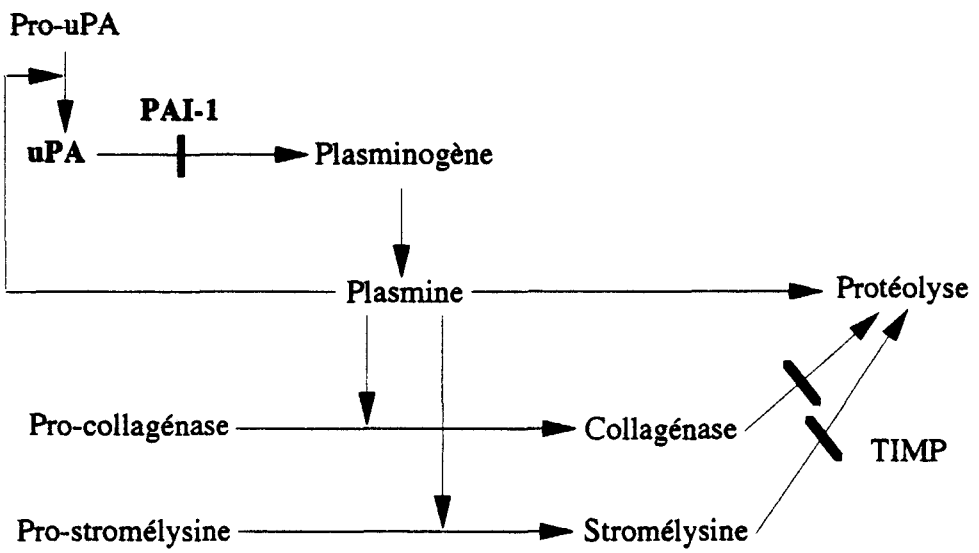


Figure 27 : Régulation de la protéolyse de la matrice extracellulaire par le système uPA/PAI-1. L'uPA permet la transformation du plasminogène en plasmine, la plasmine active alors les précurseurs de la collagénase et de la stromélysine ainsi que le précurseur de l'uPA. PAI-1 inhibe l'action de l'uPA alors que les TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) inhibent celle de la collagénase et de la stromélysine.

L'activité enzymatique de l'uPA est régulée par deux inhibiteurs spécifiques : PAI-1 et PAI-2 (Andreasen et al., 1990). Le PAI-1 est un inhibiteur rapide et spécifique de l'uPA et peut être le régulateur majeur de l'activation du plasminogène *in vivo* (Loskutoff et al., 1993).

Dans ce travail, nous analyserons dans un premier temps la régulation du système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires traitées ou non au TGFß1, au NaB et au RA, puis nous étudierons la conséquence des modifications des activités uPA *in vitro* sur le décollement des cellules de leur support de culture.

II) Matériels et méthodes

A) Conditions de culture

Les cellules épithéliales mammaires sont ensemencées dans du milieu B1 pour les CEMN (cf Matériels et Méthodes chapitre 1) et dans du milieu EMEM 10% SVF pour les cellules cancéreuses. L'ensemencement est réalisé à des densités variables en fonction de la vitesse de prolifération de chacun des types cellulaires étudiés (cf chapitre 1) et de sorte qu'au moment des mesures, la confluence des cellules soit au maximun de 70%. Quarante huit heures après l'ensemencement, les cellules sont rincées 2 fois par du PBS puis sont traitées pendant 24 heures au TGFß1 (2ng/ml), au NaB (1mM) ou au RA (10^{-5} M) en milieu EMEM sans rouge de phénol et dépourvu de SVF.

B) Mesure de l'activité uPA et de la quantité de PAI-1

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Costar). Après les 24 heures de traitement au TGFß1, au NaB ou au RA, le milieu de culture est récupéré et centrifugé à 13 000 g (Sigma 202 MK) pendant 10 min. à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires. La couche cellulaire est lysée 15 min. à 4°C par 1 ml de tampon 100 mM

Tris/HCl pH7,6, 2 mM EDTA et 0,4% Triton X-100 puis est récupérée par grattage, le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 13 000 g (20 à 30 min., 4°C). Tous les échantillons sont alors immédiatement aliquotés et congélés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse de l'activité uPA et le niveau de PAI-1.

Pour chacun des traitements, le nombre de cellules est déterminé par comptage (cellules de Malassez) de boîtes cultivées en parallèle dans les mêmes conditions.

1°) Mesure de l'activité uPA

L'activité uPA est déterminée selon le protocole précédemment décrit par Reinartz et al. (1993). Ce protocole utilise un substrat chromogène spécifique de la plasmine, le H-D-Valyl-L-Leucyl-Lysine-p-nitroanilide dihydrochloride (S-2251, Sigma).

Cinquante µl de lysat cellulaire ou de milieu de culture sont incubés à 37 °C (pendant des temps variants entre 6 et 8 heures) en présence de 50µl de S-2251 (solution à 1,5 mM en tampon 0,1 M de phosphate de sodium pH7,3, 10 mM EDTA, 0,02% d'azide de sodium et 0,01% de Triton X-100) et 50µl de plasminogène (Sigma) à 60 µg/ml dans des plaques de microtritation de 96 puits (Falcon). La libération de la paranitroaniline du S-2251 est appréciée au lecteur de plaques (Dynatech MR 700) par mesure de la densité optique (D.O) du contenu des puits à 405 nm. Des contrôles correspondant à du tampon seul et à des échantillons incubés sans plasminogène sont effectués en parallèle. Pour chacune des conditions de culture, les mesures ont été réalisées au cours de 3 expériences indépendantes avec pour chacune des expériences 3 déterminations. Les résultats sont rapportés en D.O pour 1 000 cellules.

2°) Mesure de la quantité de PAI-1

Les quantités de PAI-1 ont été estimées au moyen d'un kit de détection (Imubind Tissue PAI-1 ELISA Kit, American Diagnostic Inc.) selon le protocole préconisé par le fabriquant.

Cinquante µl de lysat cellulaire ou de milieu de culture sont déposés dans les puits de la plaque de microtritration, le dépôt est maintenu une nuit à 4°C en chambre humide. Après

aspiration du contenu des puits, les puits sont lavés 4 fois par le tampon de lavage (PBS pH7,4, 0,1% Triton X-100) et 100 µl d'anticorps anti-PAI-1 biotinylé (Anticorps murin anti PAI-1 humain) sont ajoutés pendant une heure à température ambiante. Les puits sont à nouveau lavés 4 fois puis sont incubés (une heure à température ambiante) en présence de 100µl d'une solution de streptavidine-peroxydase fraîchement préparée. Après 4 rinçages, 100µl de perborate 3, 3', 3, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) sont ajoutés pendant 20 min. à température ambiante, la réaction enzymatique est stoppée par addition de 50 µl de H_2SO_4 (0,5 M). Les niveaux de PAI-1 sont quantifiés en mesurant l'absorbance à 450 nm (lecteur de plaques Dynatech MR 700) et en comparant les valeurs obtenues avec celles de la courbe étalon réalisée à partir de solutions standard de PAI-1 (1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ng/ml) fournies dans le kit de détection. Pour chaque condition, les quantités de PAI-1 ont été estimées en double et l'expérience a été réalisée 3 fois. Les résultats sont rapportés en ng/1 000 cellules.

C) Observation du détachement des cellules de leur support de culture

Pour cette expérience, les cellules sont incubées en présence de plasminogène, pro-enzyme transformée en plasmine sous l'action de l'uPA. Aussi, afin de s'assurer que la spécificité du détachement cellulaire est due à l'action de la plasmine activée par l'uPA, simultanément au plasminogène seront ajoutés de l'aprotinine (inhibiteur de sérine protéases à spectre large) ou des anticorps neutralisant anti-uPA.

Les CEMN et les cellules MDA-MB-231 sont cultivées dans des plaques de 24 puits (Costar). Après 24 heures de traitement au TGFß1 ou au NaB en milieu EMEM 0% SVF, les cellules sont lavées 2 fois par du PBS dépouvu de Ca^{2+} et de Mg^{2+}, puis sont incubées à 37° C en présence ou non de plasminogène (Sigma) à raison de 0,4 UI/ml. Le traitement au plasminogène est réalisé en présence ou en absence d'aprotinine (Sigma) à 100 UI/ml ou d'anticorps anti-uPA (American Diagnostica Inc.) à 10µg/ml. Après 30 minutes à une heure d'incubation, la couche cellulaire est lavée 2 fois par du milieu sans sérum afin d'élinimer les réactifs et les cellules détachées. Les cellules restées attachées au support de culture sont alors

observées en microscopie photonique, les prises de vue ont été effectuées avec un appareil Olympus IMT-2 sur film Kodak T-MAX 400 ASA.

III) Résultats

Les détections des activités uPA et des quantités de PAI-1 doivent être réalisées en milieu EMEM sans rouge de phénol et dépourvu de sérum. Nous avons contrôlé que dans ces conditions de culture, la prolifération des cellules épithéliales mammaires après traitement par les inhibiteurs de prolifération était identique à celle décrite dans le chapitre précédent.

A) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires

Nos résultats (figure 28) montrent qu'en l'absence de traitement, les CEMN présentent une activité uPA 10 fois plus importante que celle des cellules MDA-MB-231 et ce, aussi bien au niveau du lysat cellulaire que dans le milieu de culture. Par ailleurs pour ces 2 types cellulaires, il existe autant d'activité uPA associée au lysat cellulaire que rejetée dans le milieu de culture.

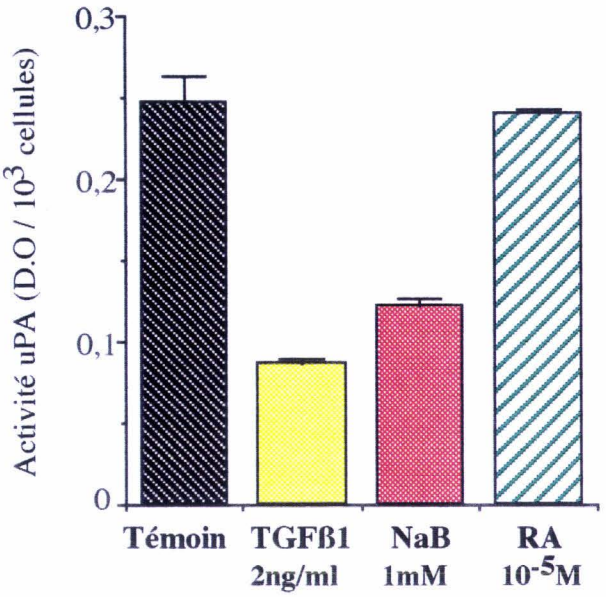
Pour les cellules MCF-7, nous n'avons détecté aucune activité uPA lorsque ces cellules sont non traitées ou traitées au NaB ou au RA. Seul un traitement par le TGFß1 conduit à la détection d'une activité uPA, toutefois la valeur de D.O obtenue est très faible (de l'ordre de 0,005 pour 1 000 cellules) et révèle une activité de la protéase 4 à 5 fois inférieure à celle des cellules MDA-MB-231 lorsqu'elles sont non traitées.

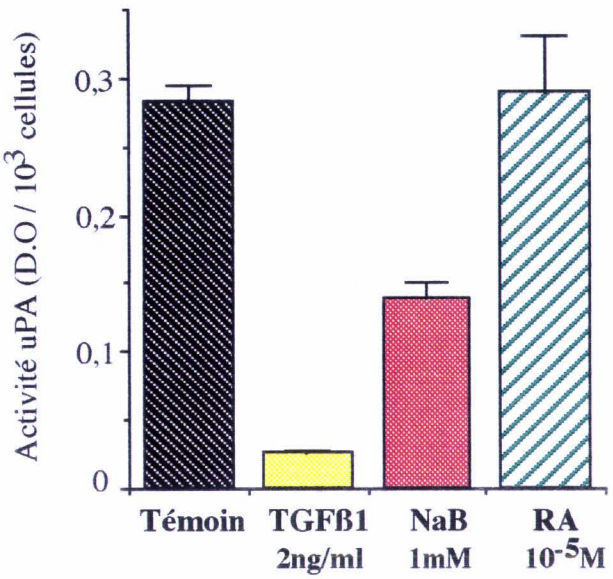
Un traitement au TGFß1 diminue l'activité uPA des CEMN dans les 2 compartiments considérés (figure 28). Il réduit de 65% l'activité uPA associée aux cellules et de 90% celle sécrétée dans le milieu de culture. A l'inverse pour les cellules MDA-MB-231, le TGFß1 induit une forte augmentation de l'activité uPA (figure 28), il la multiplie d'un facteur 3 au niveau du lysat cellulaire et d'un facteur 11 au niveau du milieu de culture.

Lysat cellulaire

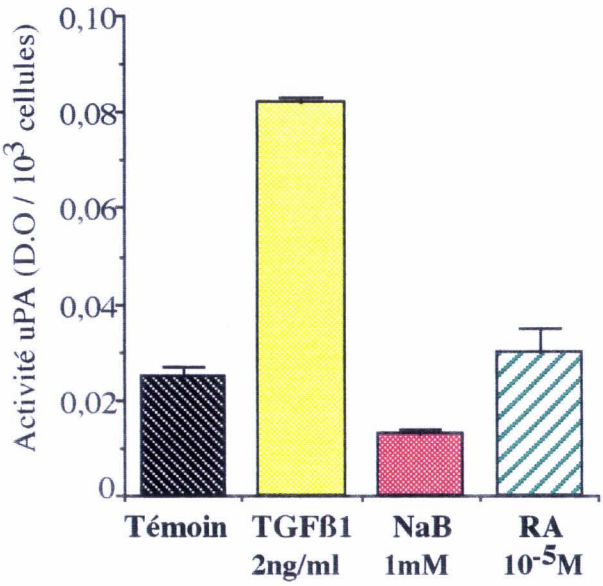
Milieu de culture

CEMN





MDA-MB-231



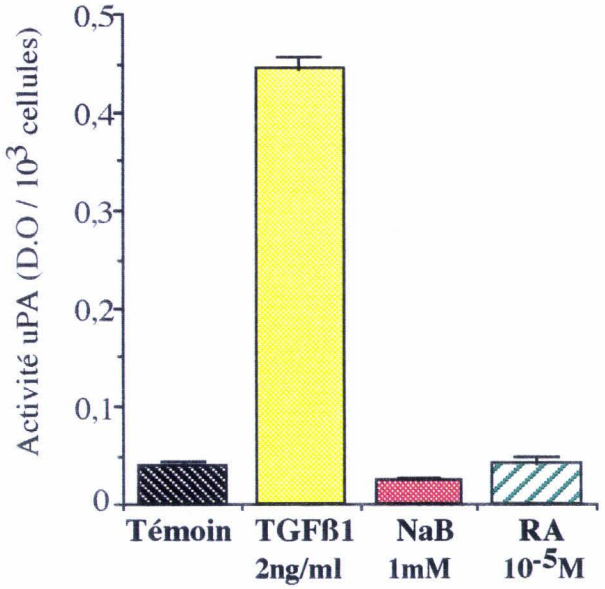


Figure 28 : Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur l'activité uPA des cellules épithélilales mammaires CEMN et MDA-MB-231. Les cellules sont traitées 24 heures au TGFß1 (2 ng/ml), au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M) en milieu EMEM 0% SVF. Les activités uPA associées aux cellules et sécrétées dans le milieu de culture ont été déterminées par l'utilisation d'un substrat chromogène (cf Matériels et Méthodes). Les résultas rapportés correspondent à la moyenne de 3 mesures d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes, ils sont exprimés en D.O /1 000 cellules.

Contrairement au TGFß1, le NaB a un effet homogène sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires : il diminue pour les 2 types cellulaires considérés l'activité de la protéase de 50% par rapport à celle des cellules non traitées quel que soit le compartiment cellulaire étudié.

Le RA n'induit pas de modification des activités uPA des CEMN et des cellules MDA-MB-231.

B) Effets du TGFß1 et du NaB sur la production de PAI-1

Les résultats rapportés figure 29 montrent que lorsque les CEMN et les cellules MDA-MB-231 sont non traitées, elles expriment sensiblement les mêmes quantités de PAI-1. La quantité de PAI-1 sécrétée est plus importante que celle associée aux cellules. En outre, ces 2 types cellulaires présentent les mêmes variations de leurs quantités de PAI-1 après traitement par le TGFß1 ou le NaB.

Ainsi, le TGFß1 induit une augmentation des quantités de l'inhibiteur du plasminogène. Il les multiplie d'un facteur 5 à 6 au niveau du lysat cellulaire et d'un facteur 110 dans le milieu de culture.

Le NaB par contre, n'entraîne pas de modification des niveaux de PAI-1 des cellules épithéliales mammaires.

Nous avons décrit dans le paragraphe précédent qu'un traitement au RA ne modifiait pas l'activité uPA des cellules mammaires. Par conséquent, nous n'avons pas recherché les quantités de PAI-1 après traitement par cet agent.

C) Effets du TGFß1 et du NaB sur le détachement cellulaire

Après une heure d'incubation en présence de plasminogène, les CEMN non traitées s'arrondissent et se détachent du support de culture (figure 30). Par contre, bien qu'elles

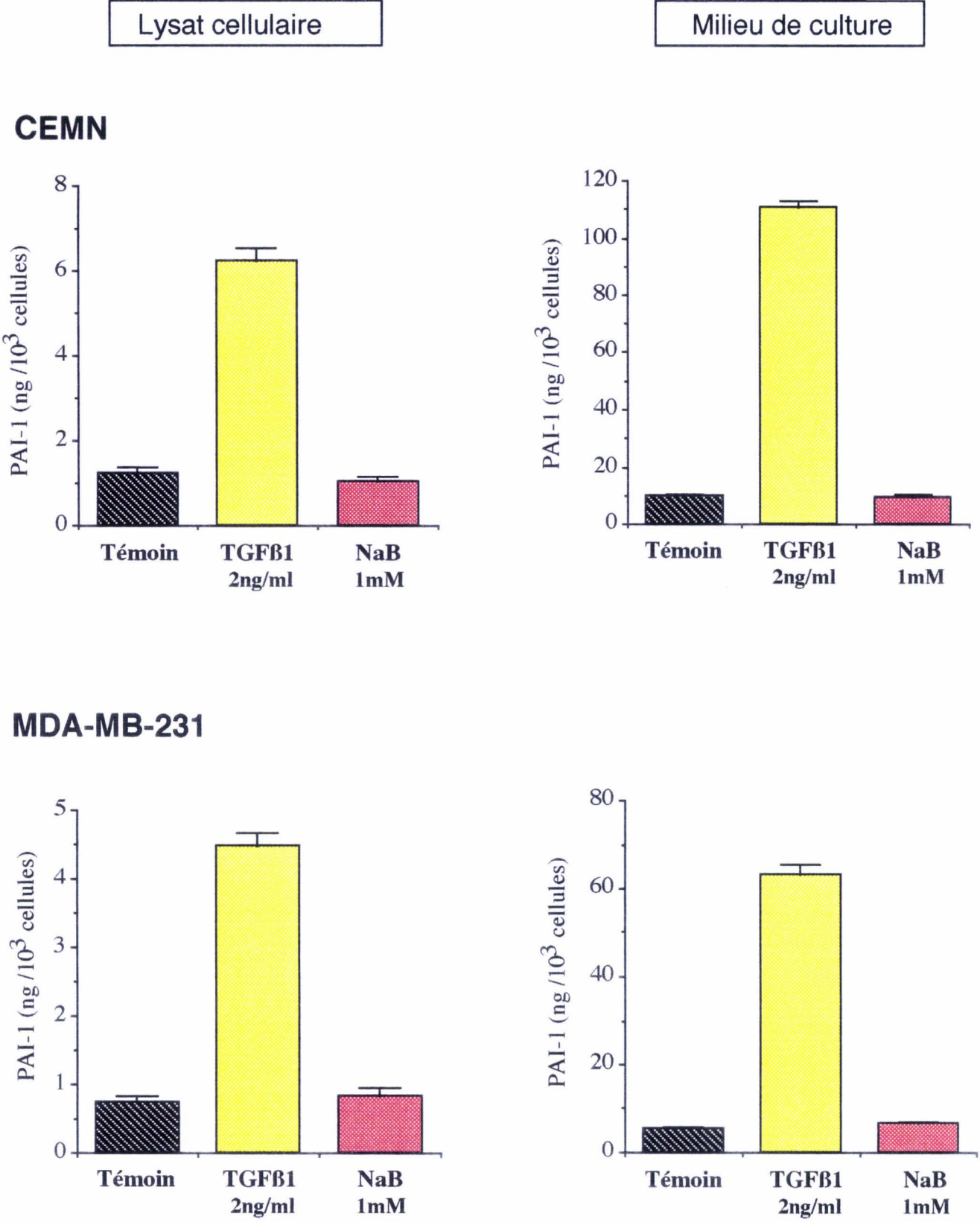


Figure 29 : Effets du TGFß1 et du NaB sur le niveau de PAI-1 des cellules épithéliales mammaires CEMN et MDA-MB-231. Les cellules sont traitées au TGFß1 (2 ng/ml) ou au NaB (1 mM) pendant 24 heures en milieu EMEM 0% SVF. Les quantités de PAI-1 présentes dans les lysats cellulaires et sécrétées dans les milieux de culture ont été déterminées par test ELISA. Les valeurs rapportées correspondent à la moyenne de 2 expériences avec pour chacune d'elle 2 déterminations. Les résultats sont exprimés en ng / 1 000 cellules.

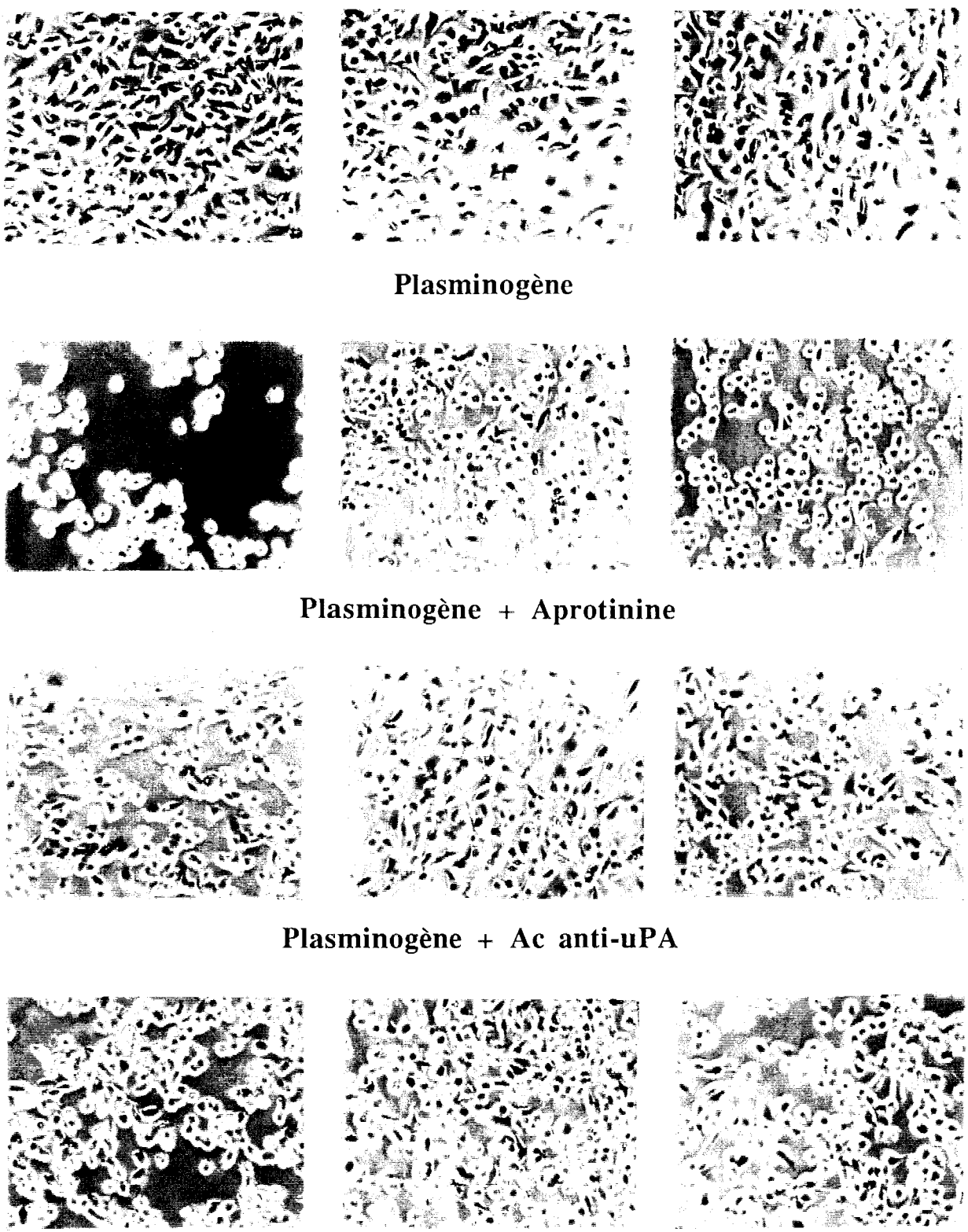


Figure 30 : Effets du TGFß1 et du NaB sur le détachement des CEMN. Les cellules sont traitées 24 heures au TGFß1 (2 ng/ml) ou au NaB (1 mM) en milieu dépourvu de SVF, elles sont ensuite lavées et incubées en présence de plasminogène (0,4 UI/ml) pendant une heure à 37°C. Simultanément au plasminogène sont ajoutés ou non de l'aprotinine (100 UI/ml) ou des anticorps anti-uPA (10 µg/ml). Avant la réalisation des prises de vues, les cellules décollées du fond des boîtes de culture sont éliminées par rinçages avec du milieu EMEM 0% SVF.

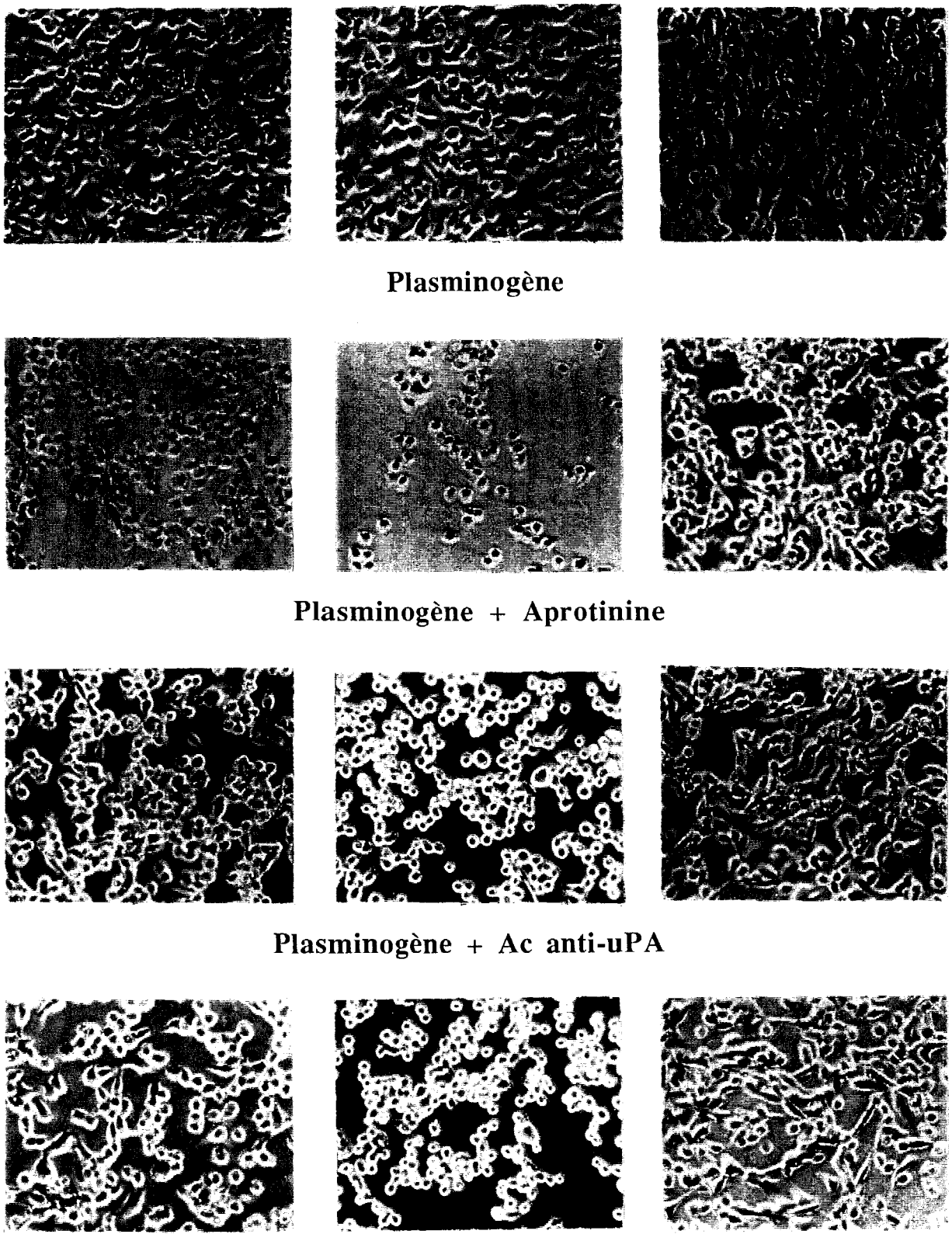


Figure 31 : Effets du TGFß1 et du NaB sur le détachement des cellules MDA-MB-231. Les cellules traitées 24 heures au TGFß1 (2 ng/ml) ou au NaB (1 mM) en milieu EMEM 0% SVF sont lavées et incubées en présence ou non de plasminogène (0,4 UI/ml) pendant 30 min. à 37°C. L'incubation avec le plasminogène est également réalisée en présence d'aprotinine (100 UI/ml) ou d'anticorps anti-uPA (10 µg/ml). Les prises de vues sont réalisées après élimination par rinçages des cellules décollées des supports de culture.

acquièrent une forme ronde après traitement au TGFß1, aucun décollement des cellules n'est observé.

Les cellules MDA-MB-231 non traitées et mises en présence de plasminogène ne montrent pas de modifications morphologiques après 30 minutes (figure 31). Toutefois, lorsqu'elles sont traitées au TGFß1 et placées dans les mêmes conditions, elles deviennent plus rondes et se décollent du fond de la boîte de culture.

Lorsque les CEMN sont traitées au NaB, elles prennent également une configuration plus arrondie en présence de plasminogène (figure 30), toutefois peu de cellules se détachent du support de culture. Un traitement au NaB des cellules MDA-MB-231 n'entraîne ni de changement de la morphologie des cellules ni de décollement cellulaire après incubation en présence de plasminogène (figure 31).

Par ailleurs, l'addition simultanée d'aprotinine ou d'anticorps anti-uPA au plasminogène (figures 30 et 31) inhibe dans tous les cas le décollement des cellules, montrant ainsi que l'effet observé est spécifique de la plasmine activée par l'uPA.

IV) Discussion

Nos résultats montrent que des facteurs capables de réguler la prolifération et/ou la différenciation des cellules épithéliales mammaires peuvent influencer le système uPA/PAI-1 de ces cellules. Cette régulation propre à chacun des facteurs étudiés semble dépendre du statut normal ou cancéreux des cellules épithéliales mammaires. Aussi, après avoir discuté des activités uPA et des niveaux de PAI-1 relatifs aux cellules épithéliales mammaires étudiées, nous envisagerons successivement l'effet du TGFß1, du NaB et du RA sur le système uPA/PAI-1 en relation avec leur effet sur la prolifération cellulaire.

A) Activités uPA et niveaux de PAI-1 des cellules épithéliales mammaires

Nos résultats révélent que les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) possèdent une activité uPA plus importante que les cellules cancéreuses. Ce résultat paraît contradictoire avec des travaux antérieurs (Jankun et al., 1991-1993). En effet, il a été rapporté d'une part que la transformation maligne de fibroblastes *in vitro* conduit à une augmentation du contenu intracellulaire en uPA (Jankun et al., 1991) et d'autre part que l'épithélium des tissus cancéreux mammaires présente plus d'uPA que celui des tumeurs bénignes et des tissus sains (Jankun et al., 1993). Cependant, les auteurs ont détecté l'uPA par immunocytochimie et n'ont pas analysé l'activité de la protéase. Or, il est possible que la quantité d'uPA observée ne reflète pas correctement l'activité protéolytique, cette activité étant régulée par des fateurs tels que PAI-1, PAI-2 et uPA-R (Andreasen et al., 1990 ; Blasi, 1993).

Concernant les cellules cancéreuses, nous avons montré que les cellules MDA-MB-231, hormono-indépendantes et hautement invasives, présentent une activité uPA beaucoup plus importante que les cellules MCF-7, non métastatiques et hormono-dépendantes chez lesquelles d'ailleurs l'activité uPA est pratiquement indétectable. Une corrélation entre la sécrétion de l'activateur du plasminogène et le pouvoir invasif des cellules a déjà été rapportée dans le cas de lignées cancéreuses prostatiques (Keer et al., 1991). Ces observations ne sont pas surprenantes puisque l'uPA est une enzyme capable de dégrader la matrice extracellulaire et les membranes basales et par conséquent, peut jouer un rôle dans les phénomènes d'invasion des cellules cancéreuses et la formation de métastases (Duffy, 1992 ; revue dans Yamashita et al., 1992). D'ailleurs, l'uPA a été détecté par immunocytochimie au niveau des zones invasives de tumeurs pulmonaires induites expérimentalement chez la souris ainsi que dans les tissus adjacents en voie de dégradation (Skiver et al., 1984). En outre, des anticorps dirigés contre l'uPA inhibent l'invasion tumorale et les métastases (Ossowski et Reich, 1983 ; Ossowski et al., 1991). Par ailleurs, il est intéressant de constater que les cellules MCF-7 qui poussent en s'aggrégeant les unes aux autres grâce à des cadhérines de surface (Révillion et al., 1993) et ne sont pas par conséquent disposées à migrer, ne montrent pas d'activité uPA.

Face à l'absence d'activité uPA des cellules MCF-7, nous n'avons pas analysé leur capacité à se détacher du support de culture en présence de plasminogène et nous n'avons pas recherché les niveaux de PAI-1 de cette lignée. Néanmoins, nous avons constaté que les cellules mammaires normales ou cancéreuses MDA-MB-231 expriment sensiblement les mêmes quantités de PAI-1. Cette observation paraît toutefois contradictoire avec celle rapportée par Jankun et al. (1993) puisque ces auteurs ont décrit une plus forte expression de PAI-1 dans les tumeurs mammaires que dans les tissus sains. Par ailleurs, Newman et al. (1990) ont décrit une diminution de PAI-1 avec le phénotype transformé de cellules de rein, cellules NRK. Cependant, leur travail porte sur des cellules de même origine transformées expérimentalement.

B) Effets du TGFß1 sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires

Nous avons observé que bien que le TGFß1 ait des effets ambivalents sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires (diminution pour les cellules normales et augmentation pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231), il induit toutefois un effet similaire sur la synthèse de l'inhibiteur de cette protéase qui se trouve multiplié d'un même facteur quel que soit le type cellulaire considéré. A travers les nombreux travaux menés sur le système uPA/PAI-1 après traitement des cellules au TGFß1, nous avons retrouvé ces influences. En effet, ce facteur de croissance est capable de moduler positivement ou négativement l'uPA en fonction du type cellulaire, ses effets s'excercent soit au niveau des ARNm, de la protéine elle même ou de son activité. Ainsi, il induit une régulation positive de l'uPA pour des cellules fibroblastiques (Laiho et al., 1986 ; Hamilton et al., 1991), des macrophages (Falcone et al., 1993), des cellules épithéliales bronchiques (Gerwin et al., 1990), des cellules endothéliales de capillaire, cellules BME (Pepper et al., 1990), des cellules de cancer du poumon humain (Keski-Oja et al., 1988a ; Lund et al., 1991), des cellules cancéreuses prostatiques (Desruisseau et al., 1996) et des cellules épithéliales mammaires humaines (Stampfer et al., 1993) alors qu'il induit une régulation négative au niveau de cellules endothéliales de capillaires, cellules BCE (Saksela et

al., 1987 ; Flaumenhaft et al., 1992), de kératinocytes (Wikner et al., 1990) et de cellules épithéliales de rein (Wagner et al., 1996). A l'inverse, l'influence du TGFß1 sur le PAI-1 semble unanime. A notre connaissance, seules des augmentations de l'inhibiteur du plasminogène ont été rapportées et ceci pour de nombreux systèmes aussi variés que des cellules de cancer du poumon (Lund et al., 1991 ; Albo et al., 1994), des cellules épithéliales bronchiques (Gerwin et al., 1990), des fibroblastes (Hamilton et al., 1993a ; Cao et al., 1995), des cellules de fibrosarcomes (Laiho et al., 1987), des chondrocytes (Campbell et al., 1994), des monocytes (Hamilton et al., 1993b), des hépatocytes (Hopkins et al., 1992), des cellules endothéliales (Pepper et al., 1990-1991), des kératinocytes (Wikner et al., 1990), des cellules rénales (Newman et al., 1990), des cellules épithéliales mammaires (Stampfer et al., 1993) ainsi que des cellules cancéreuses prostatiques (Desruisseau et al., 1996).

Dans le chapitre précédent, nous avons observé que le TGFß1 inhibait la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN). En outre, nous venons de décrire que ce facteur de croissance d'une part est capable de diminuer l'activité uPA et d'augmenter le niveau de PAI-1 de ces cellules et d'autre part, qu'il s'oppose à leur décollement du support de culture en inhibant leur activité uPA. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs menés sur des fibroblastes humains pour lesquels il a été observé que le TGFß1 diminuait l'expression de protéases telles que la collagènase et l'uPA alors qu'il augmentait l'expression d'inhibiteurs de protéases tels que le PAI-1 et l'inhibiteur de protéinase tissulaire (TIMP) (Laiho et al., 1986 ; Overall et al., 1991). Un effet du TGFß1 identique à celui que nous avons observé sur les CEMN a également été décrit dans le cas de cellules endothéliales de capillaires (Saksela et al., 1987) et de kératinocytes (Wikner et al., 1990). Nos résultats toutefois différent de ceux rapportés par Stampfer et al. (1993) puisque ces auteurs ont décrit une augmentation importante à la fois des ARNm et des protéines uPA et PAI-1 après traitement au TGFß1 des cellules épithéliales mammaires normales. Cependant, dans leur travail ils n'ont pas analysé l'activité uPA. Il convient par ailleurs de préciser que dans leur condition expérimentale, la majorité des cellules normales présente un phénotype différent de celui des CEMN utilisées dans ce travail. En effet, les auteurs ont mené leur recherche sur des cellules moins matures, probablement dérivées de la couche basale des canaux mammaires alors que la majorité des CEMN étudiées

dans ce travail présente un phénotype de cellules luminales (Berthon et al., 1992). Aussi, il est possible que ces différences phénotypiques puissent rendre compte en partie des différences observées sur la régulation du système uPA/PAI-1 après traitement au TGFß1. En outre, pour un même type cellulaire, le TGFß1 peut entraîner des réponses ambivalentes en fonction des conditions de culture. Ainsi, l'effet antiprolifératif du TGFß1 sur les cellules épithéliales, dont les cellules épithéliales mammaires, peut varier en fonction de l'âge de la culture (Hosobuchi et Stampfer, 1989 ; Rundhaug et al., 1992 ; Smith, 1994) ou de la densité cellulaire (Smith, 1994). De même, la différenciation induite par le TGFß1 peut varier en fonction de l'état de différenciation initial des cellules : ce facteur de croissance ne peut accroître la différenciation de kératinocytes normaux que lorsque ceux-ci sont déjà induits à se différencier par une culture en milieu à haute teneur en calcium (Matsumoto et al., 1990). Par conséquent, on peut concevoir que la capacité du TGFß1 à réguler le système uPA/PAI-1 puisse également varier en fonction de ces mêmes conditions.

Nous avons montré précédemment que le TGFß1 n'affectait pas la croissance des cellules MDA-MB-231. Malgré cette absence d'effet sur la prolifération cellulaire, il est toutefois capable d'augmenter fortement leur activité uPA et leur niveau de PAI-1. Une telle dissociation des effets du TGFß1 a déjà été rapportée pour des cellules de cancer du poumon humain (Keski-Oja et al., 1988a, b). En effet, bien que ce facteur de croissance n'inhibe pas la prolifération de ces cellules, il induit des modifications de l'expression de composants de la matrice extracellulaire et augmente leur activité protéolytique. De même, Geiser et al. (1992) ont observé que des lignées cancéreuses de vessie et de côlon humains dont la croissance n'était pas inhibée par le TGFß1, montraient après traitement par ce facteur une augmentation de leur synthèse de fibronectine, de collagène de type IV et de PAI-1.

Ainsi, un traitement au TGFß1 de la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 conduit à une forte augmentation de l'activité uPA associée aux cellules ainsi que celle synthétisée dans le milieu de culture. Par ailleurs, les cellules MDA-MB-231 traitées au TGFß1 puis incubées en présence de plasmine s'arrondissent et se décollent du support de culture plus rapidement que les cellules non traitées. Ce décollement peut être contrecarré par l'addition d'un anticorps anti-uPA ou d'aprotinine, inhibiteur de protéase à sérine telle que l'uPA. Ces observations révèlent

que l'activité uPA induite par le TGFß1 entraîne l'activation de la plasmine qui dégrade la matrice extracellulaire et favorise ainsi le décollement des cellules. De plus, le TGFß1 accroît également le niveau de PAI-1 des cellules MDA-MB-231. Ces résultats sont analogues à ceux décrits par Desruisseau et al. (1996) sur les cellules cancéreuses prostatiques pour lesquelles le TGFß1 augmente l'expression des ARNm de l'uPA ainsi que son niveau protéique et la quantité de PAI-1 dans le milieu de culture. Nos observations rappellent en outre celles rapportées par Arnoletti et al. (1995) : ces auteurs ont montré que pour la lignée MDA-MB-231, le TGFß1 augmente d'une part l'expression de l'uPA associée aux cellules et d'autre part le niveau de PAI-1 dans le milieu de culture mais, contrairement à notre observation, aucune modification de l'expression de l'uPA dans le milieu de culture n'a été rapportée après traitement par le TGFß1. Cependant, les auteurs ont mesuré la quantité d'uPA (par test ELISA), or celle ci ne traduit pas nécessairement l'activité de la protéase. Des augmentations simultanées de l'uPA et de son inhibiteur PAI-1 sous l'effet du TGFß1 ont également été décrites pour d'autres systèmes tels que les cellules épithéliales bronchiques (Gerwin et al., 1990), des cellules de cancer du poumon humain (Keski-Oja et al., 1988a, b ; Lund et al., 1991) et des cellules endothéliales (Pepper et al., 1990). Dans le cas de cellules cancéreuses, les augmentations de l'uPA et de PAI-1 peuvent être considérées comme complémentaires : l'augmentation de l'uPA associée aux cellules induit la dégradation des protéines à proximité de la cellule, favorisant ainsi son décollement tandis qu'une augmentation de PAI-1 empêche une dégradation en aveugle de la matrice extracellulaire qui pourrait priver la cellule invasive de son ancrage nécessaire à la locomotion cellulaire. Par ailleurs, il a été rapporté récemment que PAI-1 peut promouvoir le décollement des cellules en interagissant avec la vitronectine indépendamment de son activité inhibitrice de protéase (Deng et al., 1996).

Le TGFß1 est produit par une grande variété de cellules sous une forme latente inactive pouvant être activée *in vivo* sous l'action d'enzymes protéolytiques telles que la plasmine. Nous venons de décrire que ce facteur de croissance diminuait l'activité uPA des CEMN et qu'il augmentait celle des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Sachant qu'en outre ces deux types cellulaires sont capables de produire du TGFß1 (Valvérius et al., 1989 ; Arrick et

al., 1990), il est possible que ce facteur de croissance en augmentant la production de plasmine des cellules MDA-MB-231 entraîne pour ces cellules cancéreuses mammaires une boucle de contrôle positif de la protéolyse induite par la plasmine. Par contre, au niveau des cellules normales, le TGFß1 en diminuant la production de plasmine régulerait négativement sa propre activation ainsi que la protéolyse.

C) Effets du NaB sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires

Le NaB, contrairement au TGFß1, a un effet homogène sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires : il diminue leur activité uPA et ne modifie pas leur quantité de PAI-1. Bien que cet agent soit connu depuis longtemps d'une part comme facteur antitumoral à la fois *in vivo* et *in vitro* (revue dans Prasad, 1980 ; Planchon, 1992) et d'autre part comme inducteur de différenciation de nombreux types cellulaires cancéreux, ses effets sur les processus de migration et d'invasion cellulaires sont très peu documentés. Seuls deux travaux menés sur des cellules de cancer du côlon ont montré que le NaB régulait la balance uPA/PAI-1 de façon à réduire nettement l'activité de l'activateur du plasminogène (Reeder et al., 1993 ; Antalis et Reeder, 1995). Cette observation est d'ailleurs en accord avec nos résultats. Dans le chapitre précédent, nous avons observé que le NaB réduit fortement la prolifération des cellules épithéliales mammaires et qu'il est capable d'induire leur différenciation. Ainsi, cet agent pourrait empêcher le développement tumoral en inhibant la prolifération et l'invasion cellulaires ainsi qu'en induisant la différenciation cellulaire.

D) Effets du RA sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires

Le RA est capable de réguler positivement l'activateur du plasminogène pour de nombreux types cellulaires normaux ou cancéreux tels que des chondrocytes (Meats et al., 1985), des cellules endothéliales (Kojima et Rifkin, 1993), des fibroblastes de peau et des kératinocytes (Varani et al., 1994), des promyélocytes (Tapiovaara et al., 1994), des cellules de tératocarcinome (Strickland et al., 1980), des cellules de carcinome embryonnaire de souris (Egletis et Sherman, 1983), des cellules cancéreuses prostatiques (Liu et Rabbani, 1995) ainsi que des cellules de carcinome mammaire de souris (Mira-y-Lopez, 1991). Cependant, aucun des travaux précédemment cités n'a corrélé cette régulation positive de l'uPA à un phénomène de détachement ou de migration cellulaire. Dans notre travail, le RA n'a induit aucune modification des activités uPA des cellules épithéliales mammaires. Cet absence d'effet du RA est en accord avec le travail de Desruisseau et al. (1996) mené sur des lignées cancéreuses prostatiques. Néanmoins, la migration cellulaire ne dépend pas uniquement de l'uPA, elle implique de nombreuses molécules notamment d'autres protéases et leurs inhibiteurs. Par conséquent, on ne peut pas exclure un rôle éventuel du RA dans les phénomènes de migration cellulaire.

En conclusion, ce travail montre que les effets du TGFß1 sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires peuvent être dissociés de ses effets sur le système uPA/PAI-1. Il apparaît que le TGFß1 est un puissant inhibiteur de la prolifération et de l'activité uPA des cellules mammaires normales. A l'inverse, pour les cellules cancéreuses, il peut promouvoir leur invasion et leur propriété métastatique en augmentant leur activité uPA et leur niveau de PAI-1 mais sans altérer leur prolifération. Le NaB semble être un inhibiteur puissant de la croissance tumorale en réduisant à la fois la prolifération et l'invasion cellulaires.

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3

Etude des sites de haute affinité pour le FGF-2 des cellules épithéliales mammaires traitées au TGFß1, au NaB et au RA.

I) Introduction

L'effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules mammaires a été largement étudié (cf. introduction générale). Toutefois, bien que le FGF soit capable de stimuler la prolifération de cellules épithéliales mammaires, nos connaissances sur la régulation de ses récepteurs en relation avec la prolifération et la différenciation cellulaires sont limitées. Selon Fernig et al. (1990-1992), les cellules épithéliales de glande mammaire normale et de tumeurs bénignes ne porteraient pas de récepteurs du FGF alors que les cellules intermédiaires entre le type épithélial et myoépithélial en seraient largement pourvues. Cependant, ces observations ne donnent aucune indication quant au rôle du FGF sur les cellules épithéliales au cours de la transition prolifération/arrêt de la prolifération/différenciation puisque les observations rapportées par les auteurs sont effectuées sur des types cellulaires différents et non sur un même type cellulaire évoluant de la croissance vers la quiescence.

Dans un chapitre précédent, nous avons montré que le TGFß1, le NaB et le RA étaient capables d'inhiber la prolifération et/ou d'induire la différenciation de cellules épithéliales mammaires. Nous disposons donc de situations expérimentales variées permettant d'étudier la régulation de l'expression des FGFR au cours de la transition prolifération/arrêt de la prolifération/différenciation. Dans un premier temps, nous analyserons la liaison du FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires en culture traitées ou non par les inhibiteurs de prolifération et/ou inducteurs de différenciation. Puis des dosages radiorécepteurs permettront d'apprécier si les agents utilisés entraînent une modification du nombre de sites de haute affinité pour le FGF-2 ainsi qu'une modification de l'affinité de ces sites pour le facteur de croissance.

II) Matériels et méthodes

A) Conditions de culture

Sachant qu'il peut exister une diminution du nombre de FGFR à mesure que la densité cellulaire augmente (Veomett et al., 1989), les dosages radiorécepteurs sont dans tous les cas réalisés sur des cultures de cellules présentant 60 à 70% de confluence. Ainsi, les cellules épithéliales mammaires sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Costar) à des densités variables en fonction de la vitesse de prolifération propre à chaque type cellulaire étudié (cf. chapitre 1) : 30 000 cellules par boîte pour les CEMN et les cellules MCF-7 et 15 000 cellules par boîte pour les cellules MDA-MB-231. Quarante huit heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées ou non pendant 4 jours au TGFß1 (2 ng/ml), au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M) dans 1,5 ml de milieu EMEM contenant 10% de SVF pour les cellules cancéreuses mammaires et dans du milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1) pour les CEMN.

B) Marquage du FGF-2 par l'iode 125

Le FGF-2 est iodiné selon une méthode utilisant la chloramine T comme décrit par Hondermarck et al. (1990b). Un µg de FGF-2 (Amersham) est dilué dans 100 µl de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) contenant 1% de polyéthylène glycol 1000 (Sigma) et incubé en présence de 0,5 mCi de ^{125}INa (Amersham) pendant 60 secondes. 20 µl d'une solution de chloramine T (Sigma) à 0,5 mg/ml sont alors ajoutés pendant 30 s. La réaction d'oxydation est arrêtée par addition d'un excès de N-acétyl tyrosine (100 µl d'une solution à 100 mM). Le FGF-2 ainsi radiomarqué est séparé de l'^{125}I libre par chromatographie d'affinité sur un gel de 50 mg d'héparine Sepharose CL-6B (Pharmacia) préalablement équilibré par un tampon phosphate 0,1 M contenant 2 M NaCl. La radioactivité de chaque fraction d'élution est estimée par comptage γ (compteur LKB Wallac). L'activité spécifique du ^{125}I FGF-2 utilisée dans ce

travail est en moyenne de 100 000 cpm/ng. L'activité biologique du FGF-2 est vérifiée avant et après radiomarquage par la mesure de la poussée de neurites de cellules PC12, cellules de phéochromocytome de rat capables de se différencier en neurones sous l'effet du FGF-2 (Togari et al., 1983).

C) Liaison du ^{125}I FGF-2 sur les cellules épithéliales mammaires en culture

Les concentrations en FGF-2 radiomarqué et en FGF-2 froid utilisées sont telles que seuls les sites de haute affinité pour ce facteur de croissance peuvent être analysés (les sites de basse affinité seront considérés au cours du prochain chapitre).

Après 4 jours de traitement, les cellules épithéliales mammaires sont rincées 2 fois par un milieu dépourvu de SVF, puis lavées rapidement (15 s) par un tampon 2 M NaCl, 20 mM acétate de sodium (pH 4) afin d'enlever le FGF endogène. La couche cellulaire est ensuite rincée successivement par du PBS pH 8,5 et par du milieu dépourvu de SVF. Les liaisons non spécifiques sont bloquées par une incubation des cellules en présence d'un milieu EMEM contenant 0,15% de gélatine (milieu de saturation) pendant 30 min. à 37°C, les boîtes de culture sont alors mises à refroidir 30 min. à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées, 2 heures à 4°C et sous agitation, en présence de milieu de saturation contenant 3,6 ng/ml (200 pM) de ^{125}I FGF-2 puis lavées 2 fois au PBS pH 7 et 2 fois par un tampon 2 M NaCl, 20 mM Hepes pH 7,4 afin d'éliminer la fraction de ^{125}I FGF-2 liée aux sites de basse affinité ; elles sont ensuite lysées par 1 ml de NaOH 0,5 M. La radioactivité du lysat cellulaire, qui correspond au ^{125}I FGF-2 fixé sur les sites de haute affinité (Moscatelli, 1987) est mesurée au compteur γ (compteur LKB Wallac). Les résultats rapportés correspondent à la moyenne de 4 valeurs, l'expérience a été réalisée 3 fois. Afin de déterminer la fixation non spécifique, des cellules cultivées en parallèle sont incubées simultanément en présence de ^{125}I FGF-2 et d'un excès de 100 fois de FGF-2 froid. Par ailleurs, le nombre de cellules a été estimé par comptage (cellule de Malassez) à partir de boîtes de culture différentes cultivées dans les mêmes conditions.

D) Dosages radiorécepteurs par saturation

La préparation des cellules avant incubation en présence de FGF radiomarqué est identique à celle décrite dans le paragraphe précédent. Pour les dosages radiorécepteurs, les cellules sont incubées avec des doses croissantes de ^{125}I FGF-2 (0,5 à 200 pM) 2 heures à 4°C, sous agitation. Elles sont lavées successivement 2 fois au PBS, 2 fois 15 s par 1 ml de tampon 2 M NaCl, 20 mM Hepes pH 7,4 puis 2 fois 15 s par 1 ml de tampon 2 M NaCl, 20 mM acétate de sodium pH 4. La radioactivité libérée au cours des lavages par le tampon acide 2 M NaCl et représentant la fraction de ^{125}I FGF-2 liée aux sites de haute affinité (Moscatelli, 1987) est estimée par comptage γ (compteur LKB Wallac). La fixation non spécifique est appréciée en présence d'un excès de 100 fois de FGF-2 non marqué. Les données obtenues ont été analysées à l'aide du programme LIGAND (Munson et Rodbard, 1980) ; les résultats sont exprimés en fonction du nombre de cellules. Chaque point de la représentation de Scatchard correspond à la moyenne de 2 boîtes, l'expérience a été réalisée 3 fois.

III) Résultats

Dans un premier temps, nous rapporterons les effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la fixation du ^{125}IFGF-2 des cellules épithéliales mammaires. Puis, les données relatives aux dosages radiorécepteurs (représentation de Scatchard) permettront de déterminer le nombre de sites de fixation du FGF-2 des cellules mammaires, traitées ou non, ainsi que l'affinité de ces sites pour leur ligand.

A) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la liaison du ^{125}IFGF-2 des cellules épithéliales mammaires

Les résultats présentés (figure 32) indiquent qu'en l'absence de tout traitement (témoin), la quantité de FGF-2 radiomarqué liée aux sites de haute affinité des cellules épithéliales mammaires diffère selon le statut normal ou cancéreux ; les CEMN fixant 2 fois moins de FGF-2 que les lignées cancéreuses. Lorsque les cellules mammaires sont traitées au TGFß1, au NaB ou au RA, les valeurs obtenues (figure 32) présentent de grands écarts types conduisant à des différences non significatives entre les divers traitements.

B) Etude par saturation de la fixation du ^{125}IFGF-2 sur les sites de haute affinité des cellules mammaires en culture

Dans un soucis de commodité de présentation des résultats, nous avons retracé sur une même courbe (figure 33) les linéarisations de Scatchard obtenues après analyse, à l'aide du programme LIGAND (Munson et Rodbard, 1980), des données relatives à chacun des traitements.

Dans un premier temps, il convient de remarquer que quels que soient le type cellulaire ou les conditions de culture (cellules traitées ou non), la fixation spécifique du ^{125}IFGF-2 est très faible : $B/F < 0,05$.

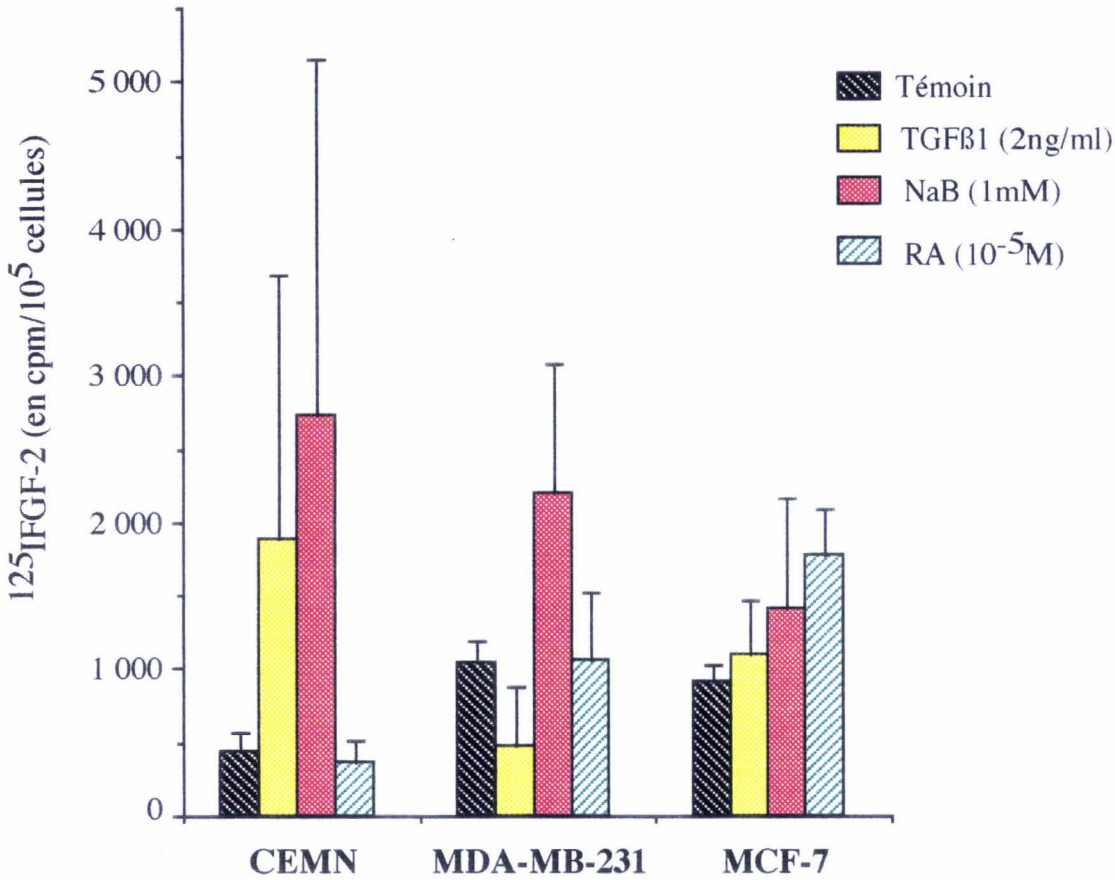


Figure 32 : Liaison du ^{125}IFGF-2 sur ses sites de haute affinité au niveau des cellules épithéliales mammaires traitées ou non au TGFß1, au NaB ou au RA pendant 4 jours en milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1) pour les CEMN et en milieu EMEM 10% SVF pour les lignées cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7. Les cellules ont été incubées en présence de 200 pM de FGF-2 radiomarqué, 2 heures à 4°C. La quantité de^{125}IFGF-2 fixée aux sites de haute affinité a été déterminée selon la méthode décrite par Moscatelli (1987). La liaison non spécifique a été appréciée par un excès de 100 fois en FGF-2 froid. Les résultats correspondent à la moyenne de 4 valeurs issues de 2 expériences indépendantes.

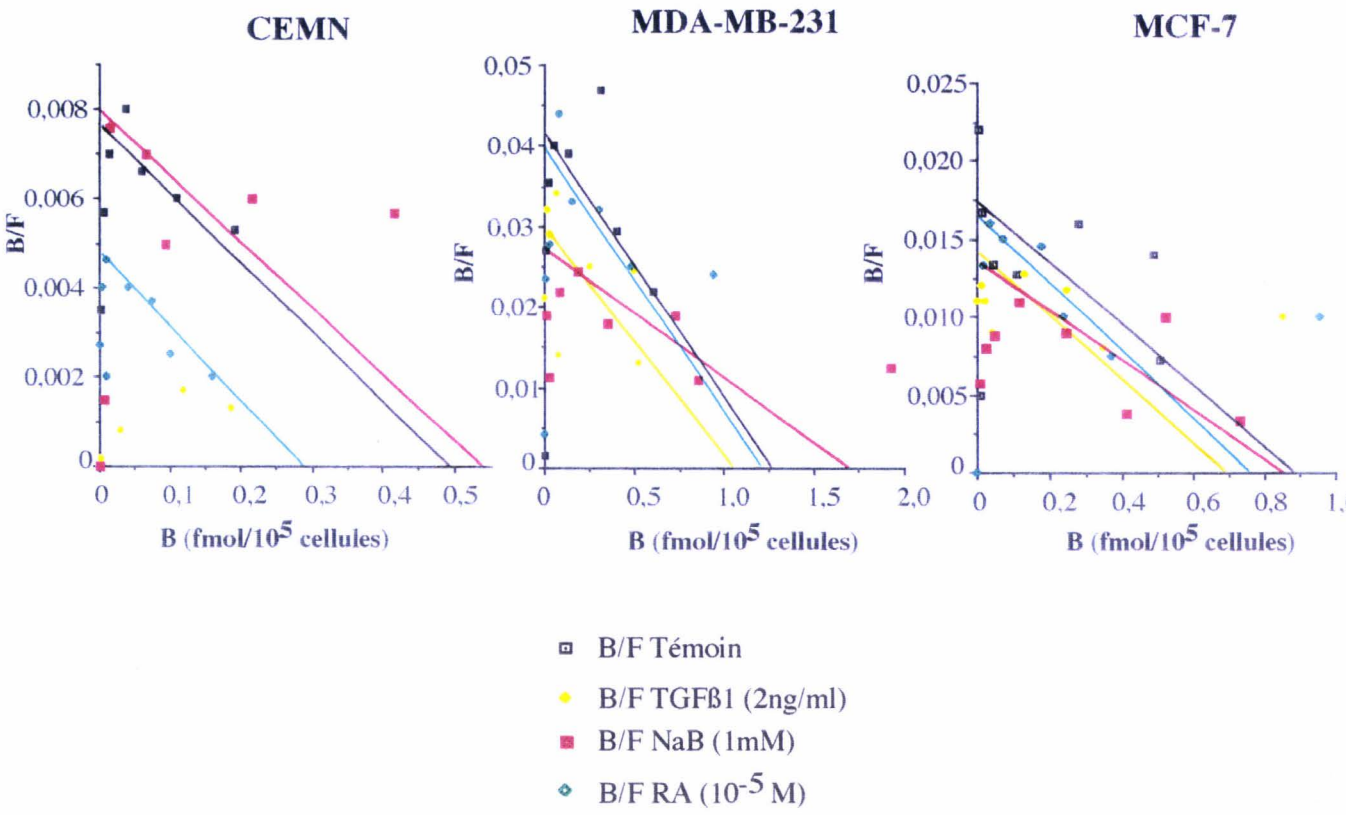


Figure 33 : Analyse de Scatchard de la liaison du ^{125}IFGF-2 sur les sites de haute affinité des cellules épithéliales mammaires traitées ou non au TGFß1, au NaB ou au RA pendant 4 jours dans du milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1) pour les CEMN et dans un milieu EMEM 10% SVF pour les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Les cellules sont incubées avec des doses croissantes de ^{125}IFGF-2 (0,5 à 200 pM) pendant 2 heures à 4 °C. La proportion de FGF radiomarqué fixée aux sites de haute affinité a été appréciée selon le protocole décrit par Moscatelli (1987). La liaison non spécifique a été déterminée par un excès de 100 fois en FGF-2 froid.

		Témoin	TGFß1 (2 ng/ml)	NaB (1 mM)	RA (10^5 M)
CEMN	Sites/cellule	2900	ND	3200	1700
	Kd (pM)	6,4	ND	6,8	6,1
MDA-MB-231	Sites/cellule	7200	6400	10100	6900
	Kd (pM)	27	33	68	27
MCF-7	Sites/cellule	5300	4100	5000	4600
	Kd (pM)	51	48	65	48

Tableau 1 : Caractéristiques des sites de liaison de haute affinité pour le FGF-2 des cellules épithéliales mammaires traitées ou non au TGFß1, au NaB ou au RA pendant 4 jours . Les valeurs rapportées ont été déduites des courbes de Scatchard présentées ci-dessus. Kd : Constante de dissociation, ND : non détecté.

Par ailleurs, l'étude par saturation de la fixation du ^{125}IFGF-2 sur cellules entières ne nous a pas permis de présenter de belles linéarisations de Scatchard et ce quels que soient le type cellulaire et les conditions de culture considérés. Aussi, les caractéristiques des sites de fixation déduites à partir de ces droites et rassemblées dans le tableau 1 sont à analyser avec prudence. Il semble (tableau 1) que les CEMN, traitées ou non, possèdent moins de sites de fixation de haute affinité pour le FGF-2 que les cellules cancéreuses mammaires mais que l'affinité de ces sites soit plus grande avec un Kd de 6 pM par rapport à 27 pM et 51 pM pour les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 respectivement.

D'une manière générale, les traitements utilisés n'induisent pas ou peu de modifications à la fois du nombre de sites de haute affinité et de l'affinité de ces sites pour le FGF-2. Les variations les plus importantes observées sont d'une part, une diminution de 40% de la quantité des sites de fixation du FGF-2, sans modification du Kd, après traitement des CEMN au RA et d'autre part, une augmentation (140%) du nombre de sites de haute affinité pour le FGF-2 des cellules MDA-MB-231 après traitement au NaB ; cette augmentation est accompagnée d'une réduction de leur affinité pour le ligand. En outre, les résultats relatifs au traitement des CEMN par le TGFß1 n'ont pas permis d'obtenir de courbe de Scatchard car la liaison spécifique du FGF-2 radiomarqué était trop faible.

IV) Discussion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les sites de fixation de haute affinité pour le FGF-2 des cellules épithéliales mammaires traitées ou non au TGFß1, au NaB ou au RA. En regard des résultats obtenus, nous analyserons et critiquerons dans un premier temps la méthodologie utilisée dans ce travail, puis nous exposerons les connaissances relatives aux sites de haute affinité pour le FGF-2 des cellules épithéliales mammaires ainsi que leur régulation selon l'état de prolifération et de différenciation des cellules.

Afin d'étudier les sites de fixation de haute affinité du FGF-2 des cellules épithéliales mammaires, nous avons utilisé la technique décrite par Moscatelli en 1987. Bien que cette méthode ait été utilisée sur de nombreux types cellulaires tels que les cellules rénales BHK, des cellules endothéliales, des cellules d'hépatome et des cellules de mélanome (Moscatelli et al., 1987-1988), des neurones (Walicke et al., 1989), des fibroblastes (Veomett et al., 1989 ; Kikuchi et al., 1992), des astroblastes (Labourdette et al., 1990), des cellules de Leydig (Murono et al., 1992), des cellules de tératocarcinomes (Moscatelli, 1994) ou encore des cellules leucémiques (Liuzzo et Moscatelli, 1996), elle ne nous a pas permis d'obtenir des résultats aussi concluants que ceux présentés dans les travaux précédemment cités.

Selon Moscatelli (1987), le FGF-2 radiomarqué est libéré de ses sites de basse affinité par lavages des cellules avec un tampon 2 M NaCl pH 7,5 et de ses sites de haute affinité par lavages avec un tampon 2 M NaCl à pH acide (pH 4). Dans cette étude, nous nous sommes placés dans des conditions telles que seuls les sites de haute affinité du FGF-2 puissent être caractérisés. En effet, les concentrations de FGF-2 radiomarqué et de FGF-2 froid utilisées sont trop faibles pour déterminer les quantités de sites de basse affinité des cellules épithéliales mammaires. Toutefois, les rinçages par le tampon 2M NaCl pH 7,5 étaient nécessaires pour retirer la fraction de FGF-2 radiomarquée liée aux HSPG (sites de basse affinité du FGF-2) présents en grande quantité dans les membranes de certains types de cellules épithéliales mammaires (Peyrat et al., 1991) et dans la matrice extracellulaire (Delehedde et al., 1997). Beaucoup de travaux ont décrit deux rinçages par chacun des tampons 2 M NaCl pH 7,5 et pH 4 (Moscatelli, 1988-1994 ; Kikuchi et al., 1992 ; Luizzo et Moscatelli, 1996) alors que d'autres

travaux menés sur des types cellulaires différents n'ont rapporté qu'un seul rinçage (Moscatelli, 1987) ou trois rinçages (Labourdette et al., 1990). Dans ce travail, nous avons effectué deux rinçages comme dans la plupart des études rapportées ci-dessus. Des remarques sur cette méthode des rinçages sélectifs ont été rapportées (Moscatelli, 1994 ; Liuzzo et Moscatelli, 1996), elles précisent que les rinçages de forte concentration saline d'une part peuvent abîmer certains types cellulaires et d'autre part qu'ils doivent être effectués rapidement de façon à minimiser le décollement des cellules et à ne pas extraire du ^{125}I FGF-2 des récepteurs de haute affinité par les rinçages à pH 7,5. Afin d'exclure la possibilité d'une perte de cellules, nous avons vérifié par observation au microscope que les cellules épithéliales mammaires étudiées n'étaient pas décollées des fonds de boîtes de culture et par le test d'exclusion au bleu Trypan, nous avons contrôlé que les cellules n'étaient pas endommagées après les lavages à forte concentration saline.

Le premier résultat que nous avons présenté pour les dosages radiorécepteurs est que la liaison spécifique du FGF-2 radiomarqué aux cellules épithéliales mammaires en culture est très faible, conduisant par conséquent à un rapport B/F inférieur à 0,05. Cette liaison spécifique nous paraissait faible mais il semble qu'un rapport B/F de cet ordre de grandeur soit fréquent pour les travaux utilisant la technique de Moscatelli sur des types cellulaires variés tels que les astroblastes (Labourdette et al., 1990), les fibroblastes (Kikuchi et al., 1992), les cellules de Leydig (Murono et al., 1992) ou les cellules leucémiques (Liuzzo et Moscatelli, 1996) et, aucun de ces travaux n'a discuté les faibles valeurs de B/F obtenues. Néanmoins, en travaillant avec des valeurs aussi faibles, il apparaît que des petites variations dans la détection de la liaison du FGF-2 à ses récepteurs puissent être à l'origine des grands écarts types observés au cours de ce travail. Par ailleurs, dans la plupart des travaux utilisant la technique de Moscatelli, les résultats ont été rapportés sous la forme de courbe de Scatchard. Cependant, l'analyse précise des expériences de dosages radiorécepteurs nécessite également l'observation des courbes de déplacement ou de saturation or, dans de nombreuses publications, ces données ne sont pas présentées (Moscatelli, 1988 ; Veomett et al., 1989 ; Labourdette et al., 1990 ; Kikuchi et al., 1992). En outre, Yayon et al. (1991) ont exposé des résultats sous la même forme que celle que nous avons rapporté (figure 32), toutefois dans leur travail ne figure aucun écart type bien que

les auteurs précisent que les résultats présentés correspondent à la moyenne d'une expérience parmi au moins 2 expériences indépendantes. Aussi, il est probable que d'autres auteurs aient rencontré avec cette méthode les mêmes problèmes de significativité des résultats mais nous sommes dans l'impossibilité de l'affirmer.

Les problèmes de détermination des FGFR par dosages radiorécepteurs sur cellules entières pourraient être dus à une quantité trop faible de FGFR au niveau des cellules épithéliales mammaires pour lesquelles, nous avons détecté entre 3 000 et 7 000 sites par cellule. Cette quantité est beaucoup plus faible que celle rapportée par Peyrat et al. (1991) sur les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7. Il faut cependant souligner que ces auteurs n'ont pas effectué leur étude sur des cellules entières mais sur des préparations membranaires sans sélection des seules membranes plasmiques et il est possible que ces différences de méthodes puissent être en partie à l'origine des résultats dissemblables observés entre les deux travaux. En effet, bien que jusqu'à présent rien n'ait été décrit sur la fixation du FGF-2 aux membranes de noyau, de mitochondries, de lysosomes ou encore de réticulum endoplasmique des cellules épithéliales mammaires, il a été détecté par immunocytochimie la présence de FGFR au sein des noyaux et des vésicules cytoplasmiques de lignées mammaires en culture dont les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 (Johnston et al., 1995a). Par ailleurs, il a été rapporté pour d'autres systèmes la présence de FGFR au niveau de la matrice nucléaire (Maher, 1996) et l'existence d'une glycoprotéine (MG-160) capable de fixer le FGF au niveau de l'appareil de Golgi (Gonatas et al., 1995). De plus, lorsque la liaison du FGF-2 est réalisée sur des cellules en culture, non décollées du fond de boîte, une seule face de la cellule est accessible au facteur de croissance alors que sur des fractions membranaires toute la surface des membranes plasmiques est disponible pour la fixation du FGF. Enfin, dans notre méthode, la matrice extracellulaire est gardée intacte, or celle-ci est très riche en HSPG (Delehedde et al., 1997), molécules décrites comme sites de basse affinité pour le FGF-2. Il a d'ailleurs été montré que la matrice extracellulaire de cellules endothéliales contient 1,5 x 10^{12} sites de basse affinité du FGF-2/mm^2 (Bashkin et al., 1989). Ceci pourrait rendre compte dans notre système d'une capture du FGF-2 radiomarqué au sein de la matrice extracellulaire empêchant ainsi ce facteur de croissance d'accéder à ses sites de haute affinité et conduisant par conséquent à une

sous estimation de leur quantité. En outre, il convient de préciser que de nombreux dosages radiorécepteurs effectués sur cellules entières selon le protocole décrit par Moscatelli conduisent à la détection de sites de haute affinité pour le FGF-2 en faible quantité (Moscatelli, 1987-1994 ; Kikuchi et al., 1992 ; Murono et al., 1992 ; Liuzzo et Moscatelli, 1996) en rapport probablement avec la faible valeur de B/F. Par conséquent, ceci pourrait également justifier du nombre de FGFR, largement inférieur à celui décrit par Peyrat et al. (1991), obtenu dans notre étude.

Nous avons constaté qu'en l'absence de traitement, les CEMN possèdent 2 fois moins de récepteurs de haute affinité pour le FGF-2 que les cellules cancéreuses mammaires. Ce résultat est en accord avec une étude immunocytochimique portant sur des lignées mammaires normales et cancéreuses pour lesquelles il a été montré, à l'aide d'anticorps variés dirigés contre les différents types de FGFR, que l'immunomarquage est plus important pour les cellules cancéreuses que pour les cellules normales (Johnston et al., 1995a). En outre, d'autres travaux menés sur des cellules épithéliales mammaires de rat (lignées RAMA) ont décrit une apparition de FGFR avec le phénotype malin (Fernig et al., 1993). Ces auteurs ont montré que les cellules épithéliales issues de glandes mammaires normales ou de tumeurs bénignes sont dépourvues de FGFR alors que les cellules provenant de tumeurs malignes présentent ce récepteur. A l'inverse, une étude portant sur des biopsies mammaires humaines a démontré que les cellules cancéreuses expriment moins d'ARNm codant pour les FGFR-1 et R-2 que les cellules normales. Cependant, les auteurs n'ont pas analysé ces récepteurs au niveau protéique (Luqmani et al., 1992). Par ailleurs, il a été montré, d'une part que les gènes codant pour les récepteurs de haute affinité du FGF-2 sont amplifiés dans certains cancers du sein humain (Adnane et al., 1991) et d'autre part, que des lignées cancéreuses mammaires humaines ou des biopsies de cancer du sein surexpriment les ARNm codant pour des FGFR (Theillet et al., 1993 ; Jacquemier et al., 1994 ; McLeskey et al., 1994 ; Penault-Llorca et al., 1995). En outre, Peyrat et al. (1991-1992) ont mis en évidence la présence de récepteurs de haute affinité pour le FGF-2 au niveau de lignées cancéreuses mammaires humaines telles que les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 ainsi que dans 19/36 biopsies de cancer du sein. Comme nous l'avons précedemment décrit, le nombre de sites détectés par ces auteurs au niveau des lignées

cancéreuses mammaires est plus élevé que celui que nous avons déterminé (6 fois plus pour les cellules MDA-MB-231 et 15 fois plus pour les cellules MCF-7). D'autre part dans ce travail, nous avons montré que les Kd des sites de haute affinité des cellules épithéliales mammaires sont compris entre 6 et 50 pM ; ces constantes d'affinité sont plus fortes que celles rapportées par Peyrat et al. (1991) pour les lignées cancéreuses mammaires mais elles correspondent toutefois aux Kd habituellement décrits pour divers types cellulaires tels que des fibroblastes, des cellules épithéliales et myoépithéliales, des cellules endothéliales, des cellules d'hépatome ou des cellules de mélanome (Revue dans Fernig et Gallagher, 1994).

Nous avons observé que les inhibiteurs de prolifération et/ou inducteurs de différenciation utilisés ne modifient pas ou très faiblement le nombre de récepteurs de haute affinité pour le FGF-2 des cellules épithéliales mammaires. Toutefois, des régulations des FGFR en relation avec la prolifération et la différenciation cellulaires ont déjà été rapportées dans d'autres modèles. Il a été décrit qu'une légère diminution du nombre de récepteurs de haute affinité pour le FGF-2 au cours du développement du placenta (Hondermarck et al., 1990b) ou du cerveau (Hondermarck et al., 1992a) était concomitante à la diminution des activités de prolifération cellulaire. Par ailleurs, dans les mélanocytes et les cellules de mélanomes, l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre le FGFR-1 conduit à une réduction significative du pouvoir prolifératif ou tumorigène des cellules épithéliales transfectées, entraînant les cellules vers la voie de la différenciation (Becker et al., 1992). En outre, dans d'autres systèmes tels que le muscle squelettique (Olwin et Hauschka, 1988 ; Templeton et Hauschka, 1992 ; Olwin et al., 1994), les chondrocytes (Iwamoto et al., 1991) ou encore les cellules de tératocarcinome (Pertovaara et al., 1993b), la différenciation est corrélée à une régulation négative des récepteurs du FGF. Toutefois, cette relation différenciation/diminution des FGFR est controversée par d'autres travaux montrant une augmentation des sites de haute affinité du FGF, tant au niveau de leur ARNm que de leur protéine, après induction de la différenciation de cellules de carcinomes embryonnaires (Mummery et al., 1993 ; Moscatelli, 1994 ; Ali et al., 1995). D'autre part, la différenciation de cellules mammaires épithéliales de rat en cellules myoépithéliales conduit à l'apparition de FGFR (Fernig et al., 1990). Par conséquent, face à la diversité des résultats de l'ensemble des

travaux cités ci-dessus, il apparaît difficile à l'heure actuelle de conclure quant à une régulation positive ou négative des FGFR au cours de la différenciation cellulaire.

CHAPITRE 4

CHAPITRE 4

Régulation de la production de protéoglycanes sulfatés des cellules épithéliales mammaires sous l'influence du TGFß1, du NaB et du RA.

I) Introduction

Les activités biologiques du FGF sont assurées par deux classes de sites de fixation, des récepteurs membranaires de haute affinité à activité tyrosine kinase (FGFR) et des sites de basse affinité correspondant à des HSPG. Ces sites de basse affinité sont nécessaires à l'interaction du FGF avec ses récepteurs en assurant une présentation adéquate de ce facteur (revue dans Gallagher, 1994). Outre leur rôle dans l'interaction du FGF-2 avec ses récepteurs de haute affinité, les HSPG peuvent avoir des fonctions importantes dans les activités biologiques du FGF. Ils constituent d'une part un réservoir de facteur de croissance à proximité de la cellule (revue dans Fernig et Gallagher, 1994) et d'autre part, le FGF-2 lié aux HSPG peut être internalisé par une voie distincte des récepteurs et alors entraîner certaines réponses cellulaires telles que l'induction d'uPA (Quarto et Almaric, 1994). Cependant, il a été montré notamment dans notre laboratoire que la présence d'HSPG n'est pas toujours corrélée avec l'activité du FGF-2. Aussi, la lignée MCF-7 possède des récepteurs de haute affinité, mais il n'a pas été détecté de sites de basse affinité alors qu'elle est sensible au FGF-2 (Peyrat et al., 1991). A l'inverse, les cellules MDA-MB-231 qui possèdent un nombre comparable de récepteurs de haute affinité mais sont insensibles à ce facteur de croissance, produisent beaucoup de sites de liaison de basse affinité. Sachant que les sites de basse affinité correspondent à des HSPG, Delehedde et al. (1996-1997) ont purifié ces molécules à partir des cellules cancéreuses mammaires et ont approfondi leur rôle dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2. Ces auteurs ont montré que les HSPG fixant le FGF-2 sont indispensables à son action ; toutefois, une quantité importante et/ou un niveau élevé de sulfatation des HSPG aboutit à une insensibilité des cellules de cancer du sein pour ce facteur de croissance. Ces résultats

démontrent bien le rôle primordial des HSPG dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules cancéreuses mammaires. D'autre part, il avait été également démontré en particulier au cours du développement du placenta de souris et du cerveau de poulet que l'augmentation des HSPG au cours de ce phénomème est accompagnée d'une diminution importante de l'activité prolifératrice et ce, sans modification de la capacité et de l'affinité des récepteurs de haute affinité du FGF-2 (Hondermarck et al., 1990b-1992a, b).

Ayant montré dans le chapitre précédent que les traitements susceptibles d'inhiber la prolifération cellulaire ne modifiaient pas les récepteurs de haute affinité du FGF-2, nous nous proposons dans ce chapitre d'apprécier l'influence de ces traitements sur les HSPG.

II) Matériels et méthodes

Pour analyser la synthèse des protéoglycanes, divers précurseurs radioactifs peuvent être utilisés (la [^{3}H] glucosamine, la [^{14}C] glucosamine, le [^{35}S] sulfate) ; cependant le sulfate radioactif est plus spécifiquement employé pour l'étude des PG sulfatés (Yanagishita et al., 1987). Notre méthode a par conséquent consisté à marquer métaboliquement les cellules par le [^{35}S] sulfate et à récupérer les PG (HSPG et CSPG) sur membranes cationiques. La néosynthèse des protéoglycanes a été appréciée par comptage de la radioactivité fixée sur les membranes.

Par ailleurs, il convient de préciser qu'il a été décrit des modifications dans la structure et la quantité des PG lors de l'arrêt de la prolifération à la confluence (Schmidt et Buddecke, 1990 ; Schmidt et al., 1995). En outre, une étude menée sur des cellules épithéliales mammaires issues de tissus sains et cancéreux a montré qu'il existait dans le cas de cultures primaires de cellules épithéliales mammaires normales des variations dans la synthèse des GAG en fonction de la densité de la culture et de la prolifération cellulaire, cependant sans qu'aucune variation significative n'ait été observée dans le cas de cellules issues de tissus cancéreux et ce quelles que soient les conditions de culture (Emerman et al., 1988). Compte tenu de ces observations,

nous avons étudié les PG des cellules épithéliales mammaires à partir de cultures cellulaires présentant 60 à 70% de confluence quel que soit le type cellulaire et le traitement utilisé.

A) Conditions de culture

Les cellules épithéliales mammaires sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (Greiner) et traitées ou non pendant 4 jours au TGFß1 (2 ng/ml), au NaB (1 mM) ou au RA (10^{-5} M) dans 4 ml de milieu EMEM 10% SVF pour les lignées cellulaires cancéreuses et dans du milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1) pour les CEMN. Les cellules ont été ensemencées à des densités différentes en fonction du type cellulaire et du traitement de sorte qu'au moment de l'addition du sulfate radioactif, elles aient atteint 60 à 70% de confluence (ce qui correspond à la phase exponentielle de croissance pour les cellules non traitées).

B) Isolement des PG des cellules épithéliales mammaires

Les protocoles suivis pour l'isolement des PG et leur liaison aux membranes cationiques ont précédemment été décrits par Rapraeger et Yeaman (1989).

Durant les 24 dernières heures de traitement, les cellules sont incubées en présence de 25 µCi/ml de $Na_2{}^{35}SO_4$ (ICN). Le milieu de culture est récupéré et est additionné du premier rinçage de la couche cellulaire, rinçage effectué par 4 ml de milieu EMEM additionné d'Hepes (20 mM) et de bicarbonate de sodium (2g/ml). L'ensemble est centrifugé pendant 15 min. à 200 g afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires puis est complété avec de l'urée (concentration finale : 8 M) et du Triton X-100 (0,1%). Les cellules sont rincées à nouveau 2 fois par du milieu EMEM, puis décollées et lysées par 2,5 ml de tampon TUT (10 mM Tris/HCl, pH 8, 8 M urée, 0,1% Triton X-100) ; le lysat cellulaire est récupéré par grattage, soniqué sur de la glace pendant 10 secondes et porté à ébullition pendant 5 min.

La densité cellulaire est déterminée par comptage (cellule de Malassez) à partir de boîtes de culture cultivées en parallèle.

C) Liaison des protéoglycanes aux membranes cationiques

Les filtres de Zetaprobe (Biorad) de 30 mm de diamètre sont préhydratés et équilibrés dans un tampon TBS (50 mM Tris/HCl, pH 8, 0,15 M NaCl) sous agitation pendant 30 min. à température ambiante. Ces filtres sont montés dans un appareil de filtration (Dot-Blot, Millipore) et les échantillons sont filtrés sous vide. Chaque puits est rincé par 3 ml de tampon TUT. Les filtres sont ensuite retirés du système de filtration et lavés 4 fois 5 min. sous agitation, 2 fois par 50 ml de tampon 10 mM Tris/HCl, pH 8, 0,1% Triton X-100 et 2 fois par 50 ml d'eau distillée. Après séchage, les filtres sont comptés dans 3 ml de liquide scintillant (compteur ß, LKB Wallac). La radioactivité mesurée correspond à la synthèse des PG totaux. Par ailleurs, les filtres lavés sont traités par 25 ml d'acide nitreux fraîchement préparé (solution à volume égal de nitrite de sodium 0,48 M et d'acide acétique 3,6 M) 2 fois 90 min. à température ambiante et sous agitation. Ce traitement permet d'éliminer les protéohéparanes sulfatés fixés aux membranes cationiques. Les filtres sont ensuite rincés par du tampon TBS contenant 0,65 M NaCl, 60 min. sous agitation, afin d'éliminer les fragments de GAG. Ils sont alors lavés 2 fois à l'eau distillée et mis à sécher. La radioactivité restante est comptée par scintillation. La soustraction des cpm obtenus avant et après traitement à l'acide nitreux permet de quantifier les HSPG.

III) Résultats

A) Incorporation de [^{35}S] sulfate des cellules épithéliales mammaires

1°) Synthèse de PG

Les résultats obtenus (figure 34) montrent que les cellules normales (CEMN) incorporent beaucoup plus de $^{35}SO_4$ que les cellules cancéreuses, soit 2,4 fois plus que les cellules MDA-MB-231 et 6,5 fois plus que les cellules MCF-7. Toutefois, le niveau d'incorporation des cellules normales apparaît, contrairement aux cellules cancéreuses, particulièrement hétérogène d'une préparation de cellules à une autre, et ce de façon indépendante de l'âge des donneurs (seul paramètre connu) ; cette hétérogénéité, se traduisant par de grands écarts types, semble reposer sur l'existence de deux niveaux très différents d'incorporation, l'un se situant à environ 15 000 cpm pour 100 000 cellules, l'autre à un niveau 3 fois supérieur. Les cellules normales se caractérisent aussi par le fait que près des 3/4 des PG néosynthétisés sont rejetés dans le milieu de culture alors que 50% (MCF-7) à 60% au plus (MDA-MB-231) le sont pour les cellules cancéreuses.

2°) Synthèse de HSPG et de CSPG

Les cellules normales (CEMN) synthétisent principalement des CSPG (64%) qui apparaissent majoritaires aussi bien au niveau de la couche cellulaire que dans le milieu de culture (tableau 2). Par contre, les cellules cancéreuses (tableau 3) synthétisent pratiquement de façon égale les deux types de PG (51% d'HSPG et 49% de CSPG pour les cellules MDA-MB-231, 57% d'HSPG et 43% de CSPG pour les cellules MCF-7).

Quantitativement (tableaux 2 et 3), les CEMN synthétisent plus d'HSPG et de CSPG que les cellules MDA-MB-231 qui elles-mêmes en synthétisent plus que les cellules MCF-7. Cependant, la répartition de ces PG dans les deux compartiments (couche cellulaire, milieu de culture) diffère suivant le type de cellules (tableau 4).

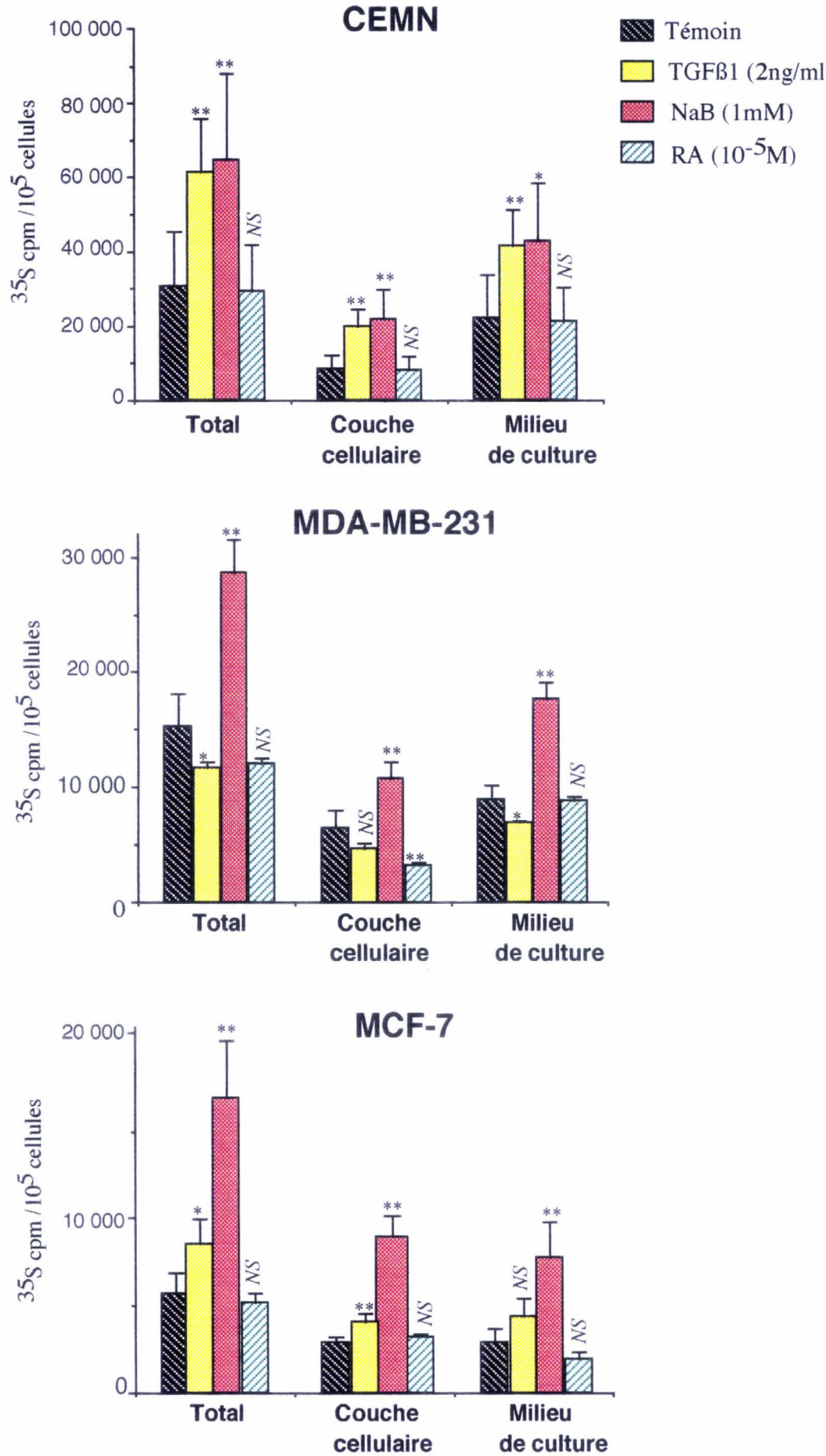


Figure 34 : Incorporation globale de [^{35}S] sulfate dans les PG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. Leur significativité est calculée par rapport aux cellules non traitées (Témoin), elle est indiquée par **($p<0,01$), *($p<0,05$), ou par *NS* (non significatif).

CEMN

	Témoin	TGFß1 (2 ng/ml)	NaB (1 mM)	RA (10-5M)
Couche cellulaire	HSPG **3193** (±1393) 38% CSPG **5187** (±2448) 62%	HSPG **7064** (±1607) ** 36% CSPG **12761** (±3166) ** 64%	HSPG **11075** (±4143) ** 51% CSPG **10729** (±3820) ** 49%	HSPG **3309** (±1328) *NS* 41% CSPG **4778** (±2224) *NS* 59%
Milieu de culture	HSPG **8011** (±4570) 36% CSPG **14311** (±7643) 64%	HSPG **8878** (±4573) *NS* 21% CSPG **32772** (±13215) ** 79%	HSPG **18059** (±10741) * 42% CSPG **24834** (±5592) * 58%	HSPG **5915** (±2193) *NS* 28% CSPG **15280** (±7526) *NS* 72%
Total	HSPG **11204** (±5963) 36% CSPG **19498** (±10091) 64%	HSPG **15942** (±6120) *NS* 26% CSPG **45533** (±16381) ** 74%	HSPG **29134** (±14884) ** 45% CSPG **35563** (±9412) * 55%	HSPG **9224** (±3521) *NS* 32% CSPG **20058** (±9750) *NS* 68%

Tableau 2 : Répartition dans les différents compartiments cellulaires des HSPG et des CSPG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires normales traitées ou non au TGFß1, au NaB ou au RA pendant 4 jours en milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1). Les PG de la couche cellulaire et du milieu de culture sont retenus sur membrane Zeta-probe après une incubation de 24 heures en présence de radiosulfate (25 µCi/ml), ils sont soumis ou non à une digestion par l'acide nitreux comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes, ils sont exprimés en ^{35}S cpm /10^5 cellules. Leur significativité est calculée par rapport à la condition de culture témoin (cellules non traitées), elle est indiquée par **(p<0,01), *(p<0,05) ou par NS (non significatif).

MDA-MB-231

	Témoin	TGFß1 (2 ng/ml)	NaB (1mM)	RA (10-5M)
Couche cellulaire	HSPG **4465** (±1494) 70% CSPG **1940** (±123) 30%	HSPG **2870** (±398) *NS* 61% CSPG **1817** (±199) *NS* 39%	HSPG **8025** (±1011) ** 75% CSPG **2725** (±386) ** 25%	HSPG **2204** (±255) * 68% CSPG **1027** (±360) ** 32%
Milieu de culture	HSPG **3335** (±812) 37% CSPG **5576** (±526) 63%	HSPG **2330** (±97) * 33% CSPG **4648** (±112) * 67%	HSPG **8337** (±384) ** 46% CSPG **9625** (±1085) ** 54%	HSPG **3440** (±830) *NS* 39% CSPG **5420** (± 602) *NS* 61%
Total	HSPG **7800** (±2306) 51% CSPG **7516** (±649) 49%	HSPG **5200** (±495) *NS* 45% CSPG **6465** (±311) * 55%	HSPG **16362** (±1395) ** 57% CSPG **12350** (±1471) ** 43%	HSPG **5644** (±1085) *NS* 47% CSPG **6447** (± 962) *NS* 53%

MCF-7

	Témoin	TGFß1 (2 ng/ml)	NaB (1 mM)	RA (10-5M)
Couche cellulaire	HSPG **1186** (±195) 41% CSPG **1676** (±316) 59%	HSPG **1999** (±27) ** 49% CSPG **2107** (±434) *NS* 51%	HSPG **3827** (±471) ** 42% CSPG **5391** (±800) ** 58%	HSPG **1713** (±321) * 53% CSPG **1491** (±206) *NS* 47%
Milieu de culture	HSPG **2104** (±591) 73% CSPG **768** (±257) 27%	HSPG **2952** (±731) *NS* 67% CSPG **1459** (±326) * 33%	HSPG **4898** (±1533) * 63% CSPG **2835** (±878) ** 37%	HSPG **1294** (±322) *NS* 66% CSPG **672** (±93) *NS* 33%
Total	HSPG **3290** (±786) 57% CSPG **2444** (±632) 43%	HSPG **4951** (±758) * 58% CSPG **3566** (±760) *NS* 42%	HSPG **8725** (±2004) ** 51% CSPG **8226** (±1678) ** 49%	HSPG **3007** (±643) *NS* 58% CSPG **2163** (±299) *NS* 42%

Tableau 3 : Répartition dans les différents compartiments cellulaires des HSPG et des CSPG synthétisés par les cellules épithéliales mammaires tumorales traitées ou non au TGFß1, au NaB ou au RA en milieu EMEM 10% SVF. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes, ils sont exprimés en ^{35}S cpm /10^5 cellules. Leur significativité est calculée par rapport à la condition de culture témoin (cellules non traitées), elle est indiquée par **(p<0,01), *(p<0,05) ou par NS (non significatif).

		CEMN	MDA-MB-231	MCF-7
HSPG	Couche cellulaire	28% (3193)	57% (4465)	36% (1186)
	Milieu de culture	72% (8011)	43% (3335)	64% (2104)
CSPG	Couche cellulaire	26% (5187)	28% (1940)	69% (1676)
	Milieu de culture	74% (14311)	73% (5576)	31% (768)

Tableau 4 : Répartition en % des HSPG et des CSPG des cellules épithéliales mammaires dans les différents compartiments cellulaires étudiés. Les valeurs rapportées ont été calculées à partir des données des colonnes "Témoin" (cellules non traitées) des tableaux 2 et 3. Les chiffres dans les parenthèses rappellent les résultats en cpm/10^5 cellules.

Ainsi, les HSPG sont minoritaires dans la couche cellulaire des CEMN et des cellules MCF-7 (28% et 36% respectivement) par rapport au milieu de culture, alors qu'ils sont en quantité relativement plus importante dans la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231 (57%). A l'inverse, les CSPG des CEMN et des cellules MDA-MB-231 sont minoritaires dans la couche cellulaire (26% et 28% respectivement) alors qu'ils sont majoritaires pour les cellules MCF-7 (69%).

B) Régulation de l'incorporation de [^{35}S] sulfate dans les PG des cellules épithéliales mammaires traitées au TGFß1, au NaB ou au RA.

1°) Régulation de la synthèse de PG

Avant d'analyser l'incorporation de [^{35}S] sulfate dans les PG des cellules épithéliales traitées par les inhibiteurs, nous nous sommes assurés que les traitements employés entraînaient les mêmes effets sur la prolifération que ceux décrits dans le chapitre 1 (TGFß1 : 75% d'inhibition de la prolifération des CEMN et aucun effet sur les cellules cancéreuses ; NaB : 60

à 75% d'inhibition de la prolifération des 3 types cellulaires ; RA : 30 à 50% d'inhibition de la prolifération des CEMN et des cellules MCF-7 et aucun effet sur les cellules MDA-MB-231). En particulier les CEMN, qui comme on vient de le voir se comportent de façon hétérogène en ce qui concerne leur capacité à néosynthétiser des PG sulfatés, ont toutes montré une diminution de leur prolifération après 4 jours de traitement analogue à celle décrite précédemment ; par ailleurs, aucune des cultures de CEMN issues des différents explants n'a pu être stimulée à proliférer sous l'action du FGF-2.

Les résultats obtenus après traitement des cellules par ces agents inhibiteurs (figure 34) montrent des modifications des niveaux d'incorporation de sulfate radioactif, variables selon le type cellulaire.

Le TGFß1 induit une augmentation de 150% à 170% de l'incorporation globale de [^{35}S] sulfate des cellules MCF-7 et des CEMN. L'effet de ce facteur de croissance est davantage marqué au niveau de la couche cellulaire des CEMN pour laquelle il multiplie d'un facteur 2,5 la quantité de PG néosynthétisés. Par contre, pour les cellules MDA-MB-231, un traitement au TGFß1 provoque une légère diminution (24%) de l'incorporation de sulfate radioactif due à une diminution de la quantité de PG du milieu de culture.

Le NaB augmente très nettement (2 à 3 fois) l'incorporation de radiosulfate aussi bien au niveau de la couche cellulaire que du milieu de culture, quelles que soient les cellules épithéliales mammaires étudiées.

Le RA reste sans effet sur l'incorporation globale de radiosulfate des cellules épithéliales mammaires bien qu'il entraîne une diminution significative de 50% de la quantité de PG au niveau de la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231.

Par ailleurs, les traitements au TGFß1 et au NaB n'induisent pas de modification dans la répartition des PG sulfatés de la couche cellulaire et du milieu de culture. Par contre, le RA augmente la proportion de PG néosynthétisés dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231 et diminue celle du milieu de culture des cellules MCF-7 conduisant par conséquent à un effet opposé sur la proportion de PG au niveau de la couche cellulaire.

2°) Régulation de la synthèse d'HSPG et de CSPG

a) PG des cellules epithéliales mammaires traitées par le TGFß1

Globalement, le TGFß1 ne modifie pas les proportions relatives d'HSPG et de CSPG des cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses (tableaux 2 et 3). Toutefois, l'augmentation de la synthèse de PG des CEMN et des cellules MCF-7 traitées par le TGFß1 observée précédemment, se traduit par des modifications de la répartition des PG dans les compartiments cellulaires étudiés.

Pour les CEMN (tableau 2), l'effet le plus marqué s'exerce au niveau de la couche cellulaire qui incorpore 2 fois plus de sulfate radiomarqué dans les HSPG après traitement par le TGFß1 et ce, bien que ce facteur n'induise pas de modification significative dans la production totale d'HSPG. Parallèlement, il multiplie d'un facteur 2,5 la synthèse de CSPG des deux compartiments étudiés.

Pour les cellules MDA-MB-231 (tableau 3), le TGFß1 n'entraîne pas non plus d'effet significatif sur la synthèse totale d'HSPG produit par ces cellules dont la couche cellulaire ne présente d'ailleurs aucune modification de l'incorporation de [^{35}S] sulfate dans ses PG. Par contre, contrairement aux CEMN, une légère diminution (14%) de la production de CSPG (notamment dans le milieu de culture) est observée après traitement au TGFß1.

Le traitement des cellules MCF-7 par le TGFß1 (tableau 3) provoque une augmentation de 1,5 fois de la quantité totale d'HSPG en raison notamment d'une augmentation dans la couche cellulaire. D'autre part, ce facteur de croissance accroît d'un facteur 2 la synthèse de CSPG du milieu de culture de cette lignée cellulaire.

En résumé, le TGFß1 n'a pas un effet homogène sur les PG des cellules épithéliales mammaires : il augmente l'incorporation globale de [^{35}S] sulfate des CEMN et des cellules MCF-7 et plus particulièrement des HSPG et/ou des CSPG de la couche cellulaire et/ou du milieu de culture selon le type cellulaire. Sur les cellules MDA-MB-231, il diminue l'incorporation de sulfate radioactif en diminuant la quantité d'HSPG du milieu de culture.

b) PG des cellules épithéliales mammaires traitées au NaB

Le traitement des cellules épithéliales mammaires au NaB ne modifie pas ou faiblement les proportions d'HSPG et de CSPG pour les 3 types cellulaires étudiés (tableaux 2 et 3). Par contre, il induit des changements importants dans les productions de PG : il augmente la néosynthèse des deux types de PG étudiés aussi bien au niveau de la couche cellulaire que du milieu de culture quel que soit le type cellulaire.

Pour les CEMN, l'effet du NaB intéresse majoritairement les HSPG dont la synthèse est triplée voire quadruplée au niveau de la couche cellulaire ; parallèlement, la synthèse des CSPG est multipliée par un facteur 2.

Sur les cellules MDA-MB-231, le NaB augmente les productions totales d'HSPG et de CSPG respectivement d'un facteur 2 et 1,6. L'effet observé est plus marqué pour les HSPG du milieu de culture (multipliés d'un facteur 2,5 par rapport aux cellules non traitées).

Comme pour les cellules MDA-MB-231 et les CEMN, le NaB accroît les quantités totales d'HSPG et de CSPG des cellules MCF-7. Toutefois, c'est pour ce type cellulaire que l'augmentation totale observée est la plus importante. Les HSPG et les CSPG sont multipliés sous l'influence du NaB d'un facteur 2,5 à 3,7 aussi bien au niveau de la couche cellulaire qu'au niveau du milieu de culture conduisant globalement à un triplement de la production totale d'HSPG et de CSPG.

Ainsi, l'effet du NaB est homogène sur les cellules épithéliales mammaires, il augmente l'incorporation globale de radiosulfate par augmentation des deux types de PG étudiés et ceci sans modification des proportions relatives à chaque type. Pour les cellules MDA-MB-231 et les CEMN, l'effet observé est plus important pour les HSPG avec respectivement une augmentation d'un facteur 2 et 2,6. Pour les cellules MCF-7, bien que l'effet le plus important s'exerce au niveau des CSPG qui sont multipliés par un facteur 3,5, l'augmentation des HSPG induite par cet inhibiteur de prolifération est également conséquente puisqu'ils sont multipliés d'un facteur 2,7 par rapport à la condition de culture témoin.

c) PG des cellules épithéliales mammaires traitées au RA

Le RA n'entraîne pas de modifications importantes des proportions d'HSPG et de CSPG quels que soient le type et le compartiment cellulaires étudiés. De même il ne modifie pas de façon significative les productions totales d'HSPG et de CSPG des cellules épithéliales mammaires (tableaux 2 et 3).

Sur les CEMN, le RA n'induit aucune variation de la production des deux types de PG étudiés aussi bien au niveau de la couche cellulaire que du milieu de culture. Cependant, il diminue de 50% les synthèses d'HSPG et de CSPG de la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231 et il augmente la synthèse d'HSPG de la couche cellulaire des cellules MCF-7 qui se trouve multipliée par un facteur 1,4 par rapport aux cellules non traitées.

En conclusion, un traitement des cellules épithéliales mammaires au RA ne change pas leur incorporation totale (couche cellulaire + milieu de culture) de sulfate radioactif. Seule une diminution de 50% de l'incorporation de radiosulfate est observée au niveau de la couche cellulaire des cellules MDA-MB-231 due à une diminution à la fois des quantités d'HSPG et de CSPG de ce compartiment cellulaire.

IV) Discussion

Nos résultats montrent que les cellules épithéliales mammaires cancéreuses ou non synthétisent des quantités variables de PG sulfatés et que cette synthèse est régulée par des facteurs connus pour inhiber la prolifération cellulaire.

Nous envisagerons d'abord la capacité de biosynthèse de PG sulfatés des cellules épithéliales mammaires et sa régulation par le TGFß1, le NaB et le RA. L'effet de ces inhibiteurs sur la synthèse de PG sera appréciée en considérant l'activité proliféatrice et l'activité uPA des cellules traitées.

A) Biosynthèse de PG sulfatés par les cellules épithéliales mammaires

Nos résultats montrent clairement que les cellules épithéliales mammaires normales synthétisent plus de PG sulfatés, que ce soit des HSPG ou des CSPG, que les cellules cancéreuses. Parmi ces dernières, nous avons observé que les cellules MDA-MB-231 produisent 2 à 3 fois plus de PG (HSPG et CSPG) que les cellules MCF-7 mais autant que la lignée non cancéreuse immortalisée HBL100 (Delehedde et al., 1997). Une telle situation a d'ailleurs déjà été observée après étude des GAG (Chandrasekaran et Davidson, 1979). Ainsi, il semblerait que les cellules hautement invasives (MDA-MB-231) synthétisent plus de PG que les cellules non invasives (MCF-7). Une constatation similaire a été présentée pour des cellules d'adénocarcinomes mammaires de souris (Angello et al., 1982a).

D'autre part, les cellules normales se différencient aussi des cellules cancéreuses par les proportions relatives de CSPG et d'HSPG ; ainsi les cellules normales produisent plus de CSPG que d'HSPG contrairement aux cellules cancéreuses qui synthétisent chacune les deux types de PG en quantité égale. En outre, il apparaît que les cellules MDA-MB-231 produisent plus de CSPG que les cellules MCF-7 et que leur répartition diffère : les CSPG des cellules MDA-MB-231 étant préférentiellement rejetés dans le milieu de culture alors que ceux des cellules MCF-7 sont majoritairement présents dans la couche cellulaire. Les CSPG sont souvent considérés comme des molécules favorisant la migration et l'invasion cellulaires dans de

nombreux systèmes cancéreux ou non tels que les cellules endothéliales (Kinsella et Wight, 1986 ; Henke et al., 1996), les cellules cardiaques (Funderburg et Markwald, 1986) ou encore les cellules de mélanomes (Faasen et al., 1992). Une augmentation de la quantité de CSPG synthétisés pourrait favoriser la migration cellulaire et l'invasion métastatique en diminuant les capacités d'interaction des cellules avec les autres molécules de la matrice extracellulaire (David et Bernfield, 1982 ; Pejler et David, 1987). Cependant, si cette corrélation peut rendre compte des différences entre les cellules cancéreuses étudiées, elle ne peut s'appliquer aux cellules normales qui présentent dans nos conditions le plus haut taux de synthèse des CSPG.

Comme pour les CSPG, nous avons constaté que les CEMN produisent plus d'HSPG que les cellules cancéreuses. Il en est d'ailleurs de même pour la lignée HBL100 qui synthétise plus d'HSPG que la lignée MDA-MB-231 (Delehedde et al., 1997). Toutefois, ce résultat n'est pas en accord avec celui décrit par Emerman et al. (1988). En effet, ces auteurs ont montré que les cellules épithéliales mammaires tumorales synthétisent plus d'HSPG que les cellules saines issues de mammoplasties réductionnelles et ce, bien que les HSPG soient présentés comme des composants minoritaires dans les biopsies mammaires tumorales (Takeuchi et al., 1976 ; Iozzo, 1988 ; Mangakis et al., 1990 ; Alini et Losa, 1991 ; Losa et Alini, 1993). De la même manière que pour les CSPG, la synthèse des HSPG des cellules cancéreuses en culture semble corrélée avec le pouvoir invasif de ces cellules. Ainsi, comme Delehedde et al. (1996), nous avons montré que les cellules hautement invasives et hormono-indépendantes, MDA-MB-231 synthétisent beaucoup plus d'HSPG que les cellules MCF-7 non métastatiques et hormono-dépendantes. Par ailleurs, *in vitro*, les HSPG apparaissent donc comme les composés prédominants des cellules épithéliales mammaires humaines les plus invasives et les moins différenciées (Mangakis et al., 1990 ; Delehedde et al., 1995b-1996). Cette corrélation des HSPG avec le potentiel métastatique a été décrit pour d'autres systèmes tels que les cellules de mélanomes (Caux et al., 1992 ; Moczar et al., 1993), les cellules tumorales de poumon et de foie (Timar et al., 1987-1995).

Actuellement, il n'est pas encore clairement établi si des modifications dans la répartition des PG des cellules épithéliales mammaires sont une caractéristique de la croissance et de l'invasion tumorales. En effet, certains travaux ont montré une augmentation des composés de

type CSPG dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus sains (Takeuchi et al., 1976 ; Alini et Losa, 1991) tandis que d'autres ont décrit une augmentation des composés de type HSPG (Mangakis et al., 1990). En outre, pour un même type de PG, des résultats contradictoires ont été décrits ; Mangakis et al. (1990) ont observé une corrélation entre une grande quantité d'HSPG et un haut degré de malignité des tumeurs mammaires tandis que Alini et Losa (1991) ont rapporté une diminution du contenu en HSPG dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus sains. Nos résultats montrent que les cellules invasives et faiblement différenciées (MDA-MB-231) produisent plus d'HSPG que les cellules MCF-7 plus différenciées. Cependant, il apparaît difficile d'y associer une relation avec le potentiel métastatique puisque les cellules épithéliales mammaires normales en culture primaire produisent davantage d'HSPG que les cellules MDA-MB-231. Toutefois, une constatation importante est que les types cellulaires possédant le plus d'HSPG (CEMN et MDA-MB-231) ne sont pas stimulés à proliférer en présence de FGF-2. En outre, Delehedde et al. (1997) ont observé que les cellules ayant le plus d'HSPG (HBL100 et MDA-MB-231) étaient capables de fixer des plus grandes quantités de FGF-2 que les cellules MCF-7, ce qui pouvait rendre compte de leur insensibilité à ce facteur de croissance, les HSPG exerçant une compétition vis à vis des récepteurs membranaires pour le FGF-2. Ces auteurs ont montré que les HSPG peuvent moduler positivement ou négativement la réponse des cellules épithéliales mammaires au FGF-2, et ce en fonction de leur quantité mais également en fonction de leur degré de sulfatation.

B) Régulation de la biosynthèse des PG sulfatés par les cellules épithéliales mammaires

Nos résultats montrent que le TGFß1 exerce ou non une stimulation de la production de PG en fonction du type cellulaire traité alors que les deux autres inhibiteurs utilisés soit stimulent la synthèse de PG pour tous les types cellulaires étudiés (cas du NaB) soit n'exercent aucun effet sur cette synthèse (cas du RA). Dans tous les cas, l'effet des inhibiteurs sur la

synthèse de PG concerne pratiquement de la même façon les HSPG et les CSPG. Nous considérerons les effets obtenus avec chacun des inhibiteurs en recherchant une corrélation avec la prolifération et l'activité uPA induites par ces agents.

1°) Effets du TGFß1, du NaB et du RA sur la synthèse des PG

Il apparaît que le TGFß1 stimule la synthèse des PG des CEMN et des cellules cancéreuses MCF-7 alors qu'il diminue légèrement celle des cellules MDA-MB-231. Cet effet ambivalent du TGFß1 a déjà été signalé sur de nombreux types cellulaires sur lesquels il régule positivement ou négativement la production de PG (Bassols et Massague, 1988 ; Mauviel et al., 1995). Lorsque le TGFß stimule la production de GAG, il apparaît que ce sont les chondroitines/dermatanes sulfates qui sont concernés plutôt que les héparanes sulfates (Bassols et Massague, 1988). Il en est de même pour les CEMN, cellules dont la production de CSPG est la plus stimulée par le TGFß1 (tant dans la couche cellulaire que dans le milieu de culture) ; par contre, la production de ce type de PG reste inchangée dans les cellules cancéreuses traitées dans les mêmes conditions à l'exception toutefois, de la production de CSPG des cellules MCF-7 qui est augmentée uniquement au niveau du milieu de culture. Une observation semblable a été rapportée pour les fibroblastes de peau (Locci et al., 1993) et des cellules de mélanomes (Heredia et al., 1996).

L'effet du TGFß1 sur la production d'HSPG par les cellules mammaires apparaît légèrement différent de celui concernant les CSPG. En effet, le TGFß1 augmente la production d'HSPG uniquement au niveau de la couche cellulaire à la fois des CEMN mais aussi des cellules MCF-7. Ce résultat est analogue à celui rapporté pour les cellules du cancer du côlon (Dodge et al., 1990) ou de tubules rénaux (Humes et al., 1993).

Il apparaît donc que l'effet du TGFß1 dépend du type cellulaire et qu'il n'a pas un effet propre à un compartiment cellulaire ou à une catégorie de PG. Ainsi, il augmente la synthèse des HSPG uniquement au niveau des couches cellulaires et celle des CSPG majoritairement dans les milieux de culture. Un tel effet hétérogène du TGFß a déjà été décrit pour des cellules endothéliales glomérulaires (Kasinath, 1993).

Contrairement au TGFß1 dont l'effet sur la synthèse de PG varie d'un type cellulaire à l'autre, le NaB stimule la synthèse des CSPG et des HSPG de tous les types cellulaires étudiés et ceci dans les deux compartiments cellulaires considérés (couche cellulaire et milieu de culture). On connait peu l'effet du NaB sur la production de PG. Seule a été observée une redistribution des HSPG dans les cellules tranformées de rein qui, en présence de NaB, retrouvent une répartition de leurs HSPG identique à celle des cellules normales (Hayman et al., 1982) ; d'autre part, une induction de la différenciation par le NaB de cellules d'érythroleucémie est associée à une augmentation de l'expression d'une forme particulière de HSPG, le perlecan (Grassel et al., 1995).

A l'inverse du NaB, le RA n'a qu'un effet limité sur la synthèse des PG des cellules mammaires et cet effet ne concerne que les cellules cancéreuses. Ainsi, on observe, selon le type cellulaire, une diminution (cellules MDA-MB-231) ou une augmentation (cellules MCF-7) de la synthèse des HSPG de la couche cellulaire ; les CSPG sont par contre régulés négativement par le RA et ce seulement pour les cellules MDA-MB-231. Néanmoins, dans tous les cas, la synthèse totale (couche cellulaire plus milieu de culture) de PG reste inchangée après action du RA. Cet effet disparate du RA n'est pas sans rappeler certains résultats obtenus sur d'autres types cellulaires. Sur des tissus variés normaux ou néoplasiques, épithéliaux ou mésenchymateux, le RA modifie la synthèse des GAG (Shapiro et Poon, 1976 ; Jetten et al., 1979 ; King et Tabiowo, 1981 ; Reiss et al., 1985) ; ainsi Lotan (1980) a rapporté que le RA diminue la synthèse des GAG de cellules mésenchymateuses indifférenciées et de chondrocytes et qu'il augmente celle de fibroblastes et de cellules épithéliales. En fait, la majeure partie des travaux portant sur la régulation des PG par l'acide rétinoïque a été effectuée sur le modèle cartilagineux où il a été montré que ce composé réduit la production de PG de cartilage articulaire de boeuf (Campbell et Handley, 1987 ; Morales et Roberts, 1992 ; Morales, 1994 ; Von den Hoff et al., 1994) ; cet effet peut d'ailleurs être favorisé ou contrecarré par le TGFß (Morales et Roberts, 1992 ; Von den Hoff et al., 1994). Le RA peut avoir des effets opposés sur un même type de PG au sein de systèmes différents. Ainsi, il diminue l'expression du biglycan et augmente celle de la décorine au niveau de chondrocytes en culture (Pearson et Sasse, 1992) alors que sur des fibroblastes de peau, il n'a pas d'effet sur la production de

biglycan mais il diminue la synthèse de la décorine (Kahari et al., 1995). La régulation de la synthèse des molécules de la matrice extracellulaire sous l'influence du RA a également été étudiée dans le cas de cellules de tératocarcinome pour lesquelles il a été décrit une augmentation des PG, de la laminine B1 et du collagène de type IV (Kapour et Prehm, 1983 ; Grover et al., 1987). Le rétinol peut aussi accroître la synthèse de composants de la matrice extracellulaire ; il augmente en particulier l'expression d'antigènes de la membrane basale et l'expression de la fibronectine sur des cellules de carcinome embryonnaire de souris (Egletis et Sherman, 1983).

En conclusion, il apparaît que chacun des trois agents utilisés régule de façon propre la synthèse des PG sulfatés des cellules épithéliales mammaires. Le TGFß1 produit des effets variés sur cette synthèse dépendant à la fois du type cellulaire, du compartiment cellulaire (couche cellulaire ou milieu de culture) et du type de PG. A l'inverse du TGFß1, le NaB a un effet homogène pour toutes les cellules épithéliales mammaires étudiées, il augmente nettement la synthèse d'HSPG et de CSPG au sein des deux compartiments cellulaires considérés. Enfin, le RA n'exerce qu'une faible influence sur la production de PG des cellules épithéliales mammaires, celle-ci est hétérogène et n'intéresse que les cellules cancéreuses.

2°) Synthèse des PG et prolifération cellulaire

Suivant le type d'inhibiteur utilisé, on observe (cas du TGFß1 et du NaB) ou non (cas du RA) une corrélation entre le ralentissement de la prolifération et l'augmentation de la synthèse de PG. Nous analyserons chacun de ces deux cas de figure.

a) Le TGFß1 et le NaB inhibent la prolifération cellulaire tout en modifiant la synthèse de PG

Nous avons montré précédemment que le TGFß1 diminue la prolifération des CEMN mais qu'il était sans effet sur celle des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Outre son action inhibitrice de la prolifération des cellules normales, nous venons de constater qu'il est capable d'induire la production de PG par ces cellules. Silberstein et al. (1990) ont montré de la même façon que le TGFß augmente la synthèse des PG de la matrice extracellulaire de cellules

de glande mammaire de souris dont il inhibe la prolifération. Toutefois, bien qu'il n'ait pas d'effet sur la croissance des cellules MCF-7, il augmente cependant mais modestement la quantité de PG et notamment d'HSPG de cette lignée tumorale. Le fait que le TGFß puisse accroître la synthèse de composants de la matrice extracellulaire de cellules dont il n'inhibe pas la prolifération a déjà été rapporté pour des cellules épithéliales mammaires normales et transformées (Stampfer et al., 1993) ainsi que pour d'autres types cellulaires (Ignotz et Massague, 1986 ; Roberts et al., 1986 ; Fine et Goldstein, 1987 ; Ignotz et al., 1987). Cependant, dans notre modèle, il apparaît néanmoins que si on considère uniquement les effets du TGFß1 sur la synthèse de PG correspondant à une augmentation de synthèse au moins supérieure à 2 fois, la corrélation inhibition de prolifération/augmentation de production de PG, notamment d'HSPG de la couche cellulaire, se trouve vérifiée pour les CEMN. En effet, nous avons montré que le TGFß1 n'a aucun effet sur la prolifération des cellules cancéreuses étudiées mais seulement des effets limités voire nuls sur la production de PG, en particulier sur les HSPG de la couche cellulaire.

L'influence du NaB sur les cellules épithéliales mammaires apparaît encore plus évidente que celle du TGFß1 puisque les trois types cellulaires étudiés augmentent leur synthèse de PG dans les deux compartiments et diminuent leur prolifération sous l'influence de ce facteur. Cette augmentation de PG concerne à la fois les CSPG et les HSPG, PG pour lesquels une corrélation avec la prolifération existe dans certains modèles biologiques.

Ainsi, des variations dans la nature et la quantité des PG en fonction de l'état de prolifération au cours du développement mammaire ont été décrites. Les cellules du tissu postérieur du bourgeon de la glande mammaire en cours de maturation (donc des cellules qui ne prolifèrent plus) synthétisent essentiellement des composés de type CSPG (Silberstein et Daniel, 1982). Une corrélation entre la modification des CSPG et la multiplication des cellules a également été présentée dans le cas des cellules hématopoïétiques pour lesquelles il a été remarqué que l'incorporation de [^{35}S] sulfate dans les CSPG des cellules quiescentes est 4 fois supérieure à celle des cellules en prolifération (Rodriguez et al., 1995).

De même que pour les CSPG, une relation entre la modification des quantités d'HSPG et la prolifération cellulaire a été établie pour différents systèmes notamment au niveau du

cerveau d'embryon de poulet ou du placenta, où une diminution de la prolifération au cours du développement a été corrélée à une augmentation des composés de type HSPG (Hondermarck et al., 1990b-1992a, b). D'autre part, sur des fibroblastes normaux il a été montré qu'une augmentation des composés de type HSPG est liée à une réduction de la croissance cellulaire due à l'âge de la culture, à une confluence cellulaire ou encore à une privation de SVF (Matuoka et al., 1985-1989).

L'arrêt de la prolifération peut parfois se manifester par une différenciation cellulaire plus au moins poussée comme cela est le cas pour les CEMN et les cellules MCF-7 traitées au NaB. De telles variations de PG au cours de la différenciation ont été rapportées pour les cellules de phéochromocytome de rat PC12 (Margolis et al., 1987), des cellules nerveuses (Daw et Riopelle, 1994), des cellules épithéliales de tubule proximal de rein (Lelongt et al., 1993) ou des cellules de cancer du côlon (McBain et al., 1990). Dans la glande mammaire, il a été décrit des modifications des PG au cours de la mise en place de la lactogenèse (Beck et al., 1993) ou encore au cours de la différenciation des cellules épithéliales mammaires humaines en culture (Peterson et al., 1992).

Il a été suggéré que le NaB peut exercer ses effets sur la différenciation cellulaire via une augmentation d'AMPc (revue dans Prasad et al., 1980). Vandewalle et al. (1991) ont montré que l'AMPc induit la différenciation de cellules cancéreuses mammaires. A cette différenciation est associée une augmentation de l'incorporation de [^{35}S] sulfate des cellules épithéliales mammaires cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7 due à un accroissement des quantités d'HSPG (Revillion et al., 1993).

b) Le RA inhibe la prolifération cellulaire sans modifier la synthèse de PG

Bien que le RA soit un agent différenciateur puissant pour certains types cellulaires (Breitman et al., 1983 ; Atencia et al., 1994), les cellules épithéliales mammaires ne sont pas ou peu induites à se différencier sous l'effet du RA dans nos conditions de culture. En outre, nous avons précédemment montré que le RA n'a pas d'effet inhibiteur sur la prolifération des cellules MDA-MB-231 mais qu'il réduisait la croissance des cellules MCF-7 et CEMN. Cependant, sur ces deux derniers types cellulaires, il n'entraîne pas de variation des quantités de PG. Par

conséquent, contrairement au NaB, il est impossible de corréler les effets du RA sur la production de PG à ceux sur la prolifération cellulaire. Une dissociation des effets du RA a déjà été rapportée par ailleurs. Ainsi, la lignée monoblastique U-937 ou les cellules leucémiques HL-60 induites à se différencier sous l'action du RA montrent une diminution de leur production en CSPG (Reiss et al., 1985 ; Kolset et al., 1988) ; les auteurs ont montré que ces effets sont totalement indépendants.

3°) Synthèse de PG et activité uPA

Outre leur action sur la prolifération cellulaire, les inhibiteurs utilisés modifient aussi la production d'uPA tout en altérant la synthèse de PG et notamment d'HSPG. Ainsi, le TGFß1 diminue l'activité uPA des CEMN tout en augmentant la synthèse d'HSPG de la couche cellulaire alors que, à l'inverse ce même facteur augmente l'activité uPA des cellules MDA-MB-231 tout en diminuant la production d'HSPG du milieu de culture. Par contre, aucun effet n'a été observé sur les cellules MCF-7, cellules ne possédant pas de niveau détectable d'uPA. De même, le NaB diminue l'activité uPA des CEMN et des cellules MDA-MB-231 alors qu'il augmente leur synthèse d'HSPG. Il semble donc exister une corrélation entre l'activité uPA et la production d'HSPG régulées par le TGFß1 et le NaB : une diminution de l'activité uPA étant associée à une augmentation de la synthèse d'HSPG. Par contre pour le RA, il semble à nouveau impossible d'établir une relation entre les différents effets de cet agent sur les cellules épithéliales mammaires. En effet, bien qu'il modifie la synthèse d'HSPG des cellules cancéreuses MDA-MB-231, il n'exerce aucun effet sur leur activité uPA.

Il apparaît donc que les mécanismes d'action du RA sur la prolifération et l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires diffèrent manifestement de ceux utilisés par le TGFß1 et le NaB en particulier en ne faisant pas intervenir les PG, notamment les composés de type HSPG.

CHAPITRE 5

CHAPITRE 5

Effets d'une augmentation exogène de polysaccharides sulfatés sur les cellules épithéliales mammaires.

I) Introduction

Au cours du chapitre précédent, nous avons observé que l'inhibition de la prolifération et la diminution de l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires après traitement au TGFß1 ou NaB étaient corrélées à une augmentation de la synthèse de protéoglycanes de type héparane sulfate (HSPG). Afin de vérifier le rôle éventuel des HSPG dans le contrôle de la prolifération et l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires, nous avons fourni aux cellules un environnement riche en molécules "heparine like", par apport de polysaccharides sulfatés, et nous avons analysé si cet environnement influençait ou non la croissance des cellules et leur système uPA/PAI-1.

Les polysaccharides sulfatés sont considérés comme des antagonistes de certains facteurs de croissance et notamment du FGF ; ils agiraient essentiellement par compétition en séquestrant les facteurs de croissance présentant une affinité pour les domaines "heparine like" de la matrice extracellulaire (Wellstein et al., 1991 ; Tardieu et al., 1992 ; Hoffman, 1993 ; Hoffman et Sykes, 1993). Parmi ces substances, on peut signaler l'héparine, le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate, la suramine ou encore les carraghénanes. Notre choix s'est porté sur les carraghénanes, polysaccharides sulfatés isolés d'algues rouges, largement utilisés dans le domaine alimentaire et non toxiques. Ces composés sont formés de n unités disaccharidiques (1-->4)-ß-D-galactopyranosyl-(1-->3)-α-D-galactopyranosyl et le plus souvent de résidus 3,6-anhydrogalactose. Les carraghénanes diffèrent par leur degré de sulfatation ce qui leur confère des propriétés physico-chimiques différentes (Hoffman, 1993). Ils sont capables d'inhiber la liaison du FGF-2 au niveau des ses sites de fixation de haute et de basse affinité (Hoffman et Sykes, 1993). On sait par ailleurs, que le FGF-2 est produit par les cellules épithéliales mammaires (Ke et al., 1993 ; Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-

Marer, 1995) et qu'il est capable de stimuler leur prolifération (Levay-Young et al., 1989 ; Peyrat et al., 1991 ; Delehedde et al., 1995a) et leur activité uPA (Mira-y-Lopez et al., 1986). Aussi, une régulation de la biodisponibilité du FGF-2 de façon endogène par les HSPG ou de façon exogène par les carraghénanes pourrait conduire à une réduction de la croissance cellulaire et à une diminution de l'activité uPA. Les carraghénanes s'avèrent particulièrement intéressant pour réguler l'activité du FGF-2 puisqu'outre leur capacité de séquestration de ce facteur de croissance, ils sont également capables en inhibant les héparanases de s'opposer à la libération du FGF-2 séquestré dans la matrice extracellulaire (Vlodavsky et al., 1990).

Dans ce travail, nous étudierons en premier lieu les effets des carraghénanes iota (ι), kappa (κ) et lambda (λ) sur la prolifération et le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires puis nous analyserons si dans notre modèle, ces polysaccharides sulfatés sont capables de s'opposer à la liaison du FGF-2 sur ses sites de fixation.

II) Matériels et méthodes

A) Matériels

Les carraghénanes Iota (ι), Kappa (κ), Lambda (λ) et l'héparine proviennent de chez Sigma ; les solutions stock sont préparées à la concentration de 5 mg/ml dans de l'eau MilliQ stérile. Afin de dissoudre les carraghénanes, il est nécessaire de chauffer les solutions à 37°C.

B) Conditions de culture

Les cellules sont ensemencées dans du milieu B1 pour les CEMN (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1) et dans du milieu EMEM 10% SVF pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7. L'ensemencement est réalisé à des densités variables en fonction de la vitesse de prolifération de chacun des types cellulaires étudiés (cf chapitre 1) et de sorte qu'au moment des mesures, la confluence des cellules soit au maximun de 70%. Quarante huit heures après l'ensemencement, les cellules sont rincées 2 fois par du PBS puis sont traitées pendant 24 heures aux carraghénanes ι, κ et λ en milieu EMEM sans rouge de phénol et dépourvu de SVF.

C) Evaluation de la prolifération cellulaire

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de culture de 24 puits (Costar) dans 0,5 ml de milieu de culture. Après 24 heures de traitement aux carraghénanes ι, κ et λ aux concentrations variant de 0,1 µg/ml à 100 µg/ml, la prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée comme décrit dans la section matériels et méthodes du chapitre 1. Chacune des mesures a été effectuée 3 fois au cours de 3 expériences indépendantes.

D) Mesure de l'activité uPA et de la quantité de PAI-1

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Costar) et traitées pendant 24 heures aux Carraghénanes ι (100µg/ml). Les protocoles pour la récolte des milieux de culture et des couches cellulaires ainsi que ceux utilisés pour les déterminations des activités uPA et des quantités de PAI-1 ont été rapportés précédemment dans la section matériels et méthodes du chapitre 2. Pour chacune des conditions de culture, les activités uPA et les niveaux de PAI-1 ont été estimés en double au cours de trois expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés pour l'activité uPA en D.O pour 1 000 cellules et pour la quantité de PAI-1 en ng pour 1 000 cellules.

E) Liaison du ^{125}I FGF-2 en présence de carraghénanes et d'héparine

1°) Marquage du FGF-2 par l'iode 125

Le FGF-2 est iodiné comme nous l'avons décrit précédemment (cf. chapitre 3).

2°) Liaison du ^{125}I FGF-2

Pour cette expérience, les cellules épithéliales mammaires sont ensemencées dans des plaques de culture de 24 puits (Costar) et sont cultivées dans leur milieu respectif (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1). Lorsque la densité celluaire atteint 60 à 70% de confluence, les cellules sont rincées 2 fois par un milieu dépourvu de SVF, puis lavées rapidement (15 s) par un tampon 2 M NaCl, 20 mM acétate de sodium (pH 4) afin d'enlever le FGF endogène. La couche cellulaire est ensuite rincée successivement par du PBS pH 8,5, pour neutraliser le pH acide, et par du milieu dépourvu de SVF. Les liaisons non spécifiques sont bloquées par une incubation des cellules en présence d'un milieu EMEM contenant 0,15% de gélatine (milieu de saturation) pendant 30 min. à 37°C, les boîtes de culture sont alors mises à refroidir 30 min. à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées, 2 heures à 4°C et sous agitation, en présence de milieu

de saturation contenant du ^{125}I FGF-2 à 10 ng/ml (550 pM) auquel sont ajoutés simultanément des carraghénanes ou de l'héparine aux concentrations variant de 0,01 à 100µg/ml. Les cellules sont alors lavées 3 fois au PBS pH 7 et lysées par 0,5 ml de NaOH 0,5 M. La radioactivité du lysat cellulaire est mesurée au compteur γ (compteur LKB Wallac). Les résultats rapportés sont exprimés en cpm/100 000 cellules, ils correspondent à la moyenne de 2 valeurs, l'expérience a été réalisée 3 fois.

III) Résultats

A) Effets des carraghénanes ι, κ et λ sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires

Nos résultats montrent (figure 35) que les trois carraghénanes utilisés inhibent plus ou moins fortement la prolifération des trois types cellulaires épithéliaux mammaires et ce, en l'absence de tout ajout de facteur de croissance dans le milieu de culture.

Les carraghénanes ι et λ apparaissent être les plus efficaces pour inhiber la prolifération des CEMN pour lesquelles on obtient une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée d'environ 50% pour une dose de 100 µg/ml. Les carraghénanes κ, à cette même concentration, n'inhibent l'incorporation de thymidine tritiée que de 25%.

Les cellules MDA-MB-231 sont plus sensibles à l'effet antiprolifératif des carraghénanes ι. En effet, pour ce type de carraghénanes, la réduction de l'incorporation de thymidine tritiée est de 50% dès la concentration de 10 µg/ml et elle atteint 70% pour la concentration de 100 µg/ml. Les deux autres carraghénanes utilisés à la dose de 100 µg/ml n'induisent qu'une diminution de 30% pour la forme κ et de 37% pour la forme λ.

En présence de carraghénanes ι, les cellules MCF-7 se comportent pratiquement de la même façon que les cellules MDA-MB-231. Il semble cependant qu'il faille une dose 10 fois supérieure (100 µg/ml) pour obtenir 50% d'inhibition de leur prolifération. Par ailleurs, une inhibition tout aussi importante est observée pour une dose identique de carraghénanes κ.

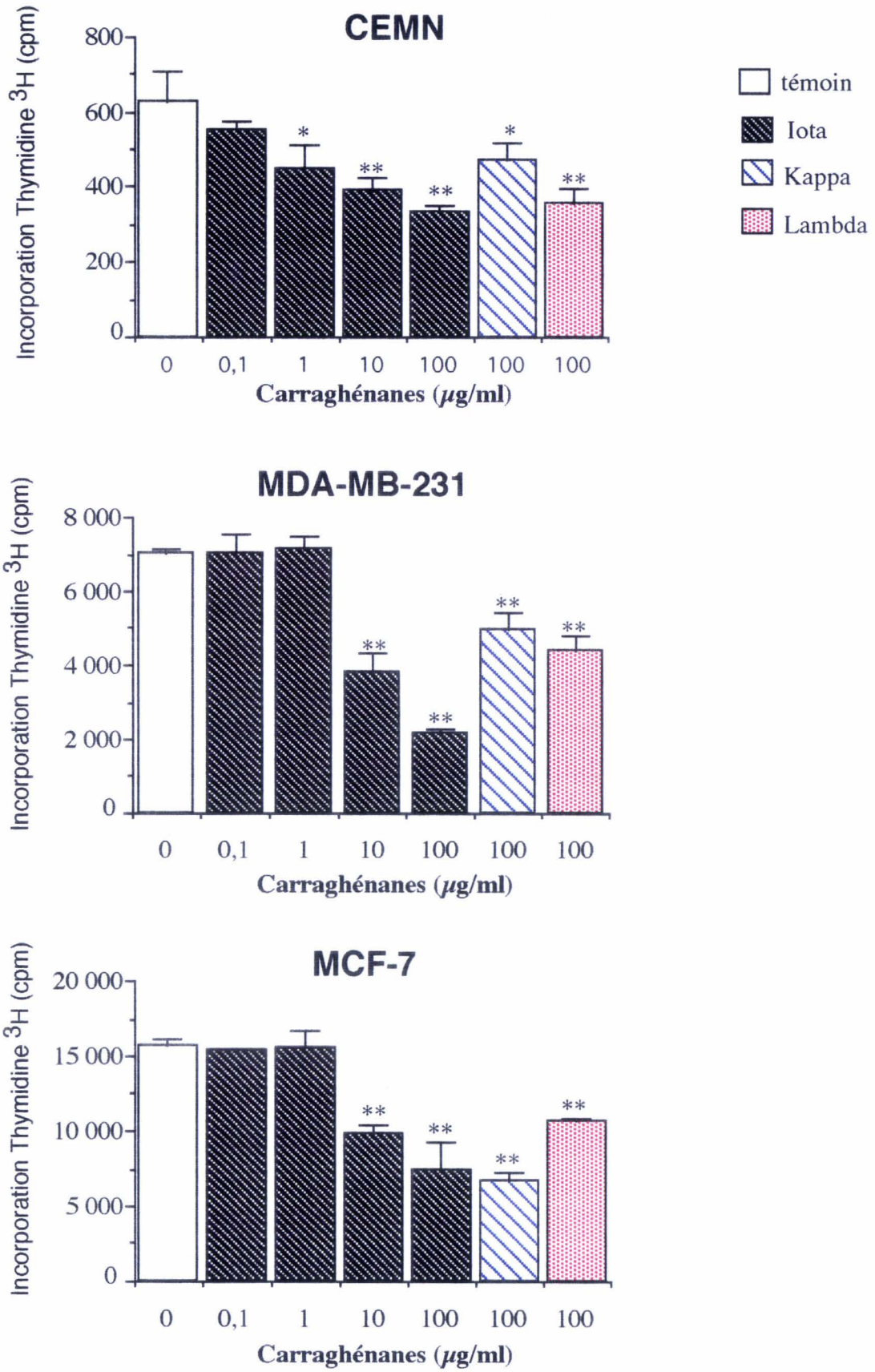


Figure 35 : Effet des carraghénanes sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Après culture en milieu B1 (cf. Matériels et Méthodes chapitre 1) pour les CEMN et en milieu EMEM 10% SVF pour les MDA-MB-231 et les MCF-7, les cellules sont rincées et traitées pendant 24 heures aux carraghénanes aux concentrations indiquées en milieu dépourvu de sérum. La prolifération cellulaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. Les valeurs résultent de la moyenne de trois mesures d'une expérience représentative de 3 expériences effectuées, leur signicativité est calculée par rapport aux cellules non traitées, elle est indiquée par * ($p<0,05$), ** ($p < 0,01$).

B) Effets des carraghénanes ι sur le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires

Les activités uPA des cellules MCF-7 sont trop faibles pour être détectées par notre méthode (cf. chapitre 2). Par conséquent, seules les régulations par les carraghénanes ι du système uPA/PAI-1 des CEMN et des cellules MDA-MB-231 ont pu être étudiées.

Sous l'influence des carraghénanes ι à la concentration de 100 µg/ml (figures 36 et 37), les CEMN ne présentent aucune modification de leur activité uPA et de leur quantité de PAI-1 quel que soit le compartiment cellulaire considéré. A l'inverse, après 24 heures de traitement au carraghénanes ι, les cellules MDA-MB-231 montrent une diminution de 40% de leur activité uPA et une augmentation de 30% de leur quantité de PAI-1 et ce, aussi bien au niveau du lysat cellulaire que dans le milieu de culture.

C) Liaison du ^{125}I FGF-2 aux cellules épithéliales mammaires en présence de carraghénanes ou d'héparine

En l'absence de carraghénanes et d'héparine, les CEMN et les cellules cancéreuses MDA-MB-231 fixent la même quantité de ^{125}I FGF-2 (40 000 cpm/100 000 cellules) alors que les cellules MCF-7 en fixent 5 fois moins (figure 38). Nos résultats montrent par ailleurs que les trois types de carraghénanes utilisés sont capables de réduire fortement la fixation de FGF-2 radiomarqué au niveau des cellules épithéliales mammaires. Toutefois, la diminution observée est dans tous les cas inférieure à celle obtenue après incubation en présence d'héparine. Cette dernière, à la concentration de 100 µg/ml entraîne une réduction de la liaison du ^{125}I FGF-2 de 90% quel que soit le type cellulaire.

Pour les CEMN, il apparaît que les carraghénanes ι, κ et λ présentent à la plus forte concentration utilisée (100 µg/ml) les mêmes capacités d'inhibition de la fixation du FGF-2 radiomarqué : l'inhibition observée varie entre 70 et 80%. Pour des concentrations plus faibles, la forme ι semble cependant plus efficace que les formes κ et λ.

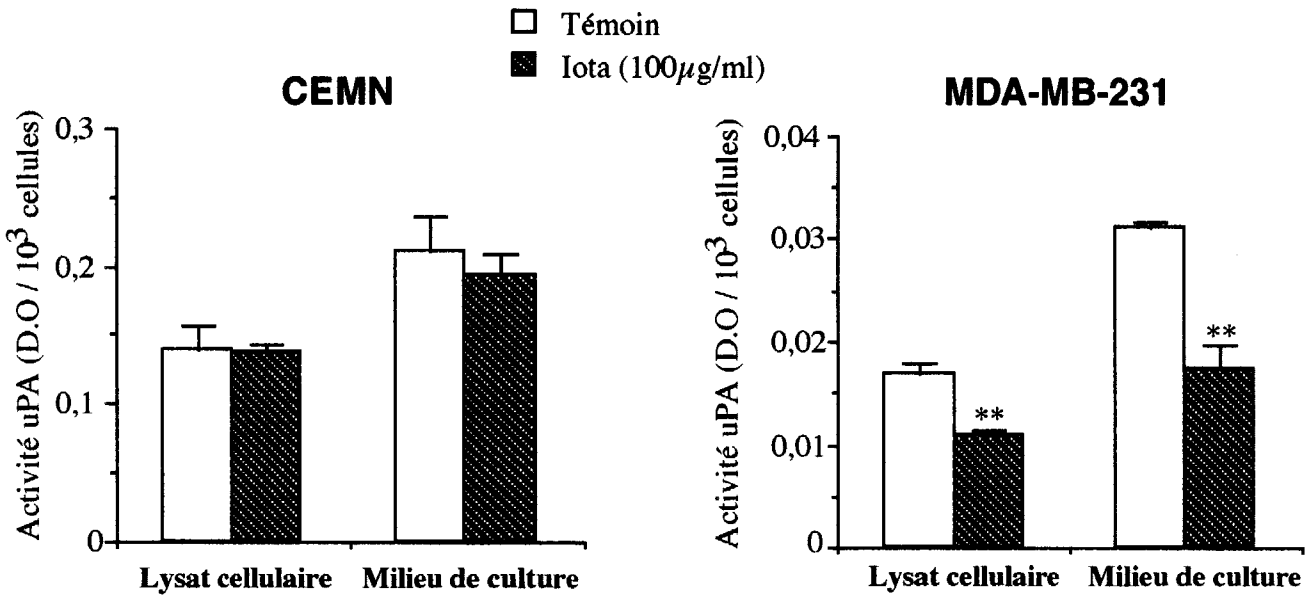


Figure 36 : Effets des carraghénanes Iota sur l'activité uPA des cellules épithéliales mammaires CEMN et MDA-MB-231. Les cellules sont seuvrées, puis traitées 24 heures aux carraghénanes Iota (100µg/ml) en milieu EMEM 0% SVF. Les activités uPA associées aux cellules et sécrétées dans le milieu de culture ont été déterminées par l'utilisation d'un substrat chromogène (cf. Matériels et Méthodes). Les résultas rapportés correspondent à la moyenne de 3 mesures d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes, ils sont exprimés en D.O/1 000 cellules, leur significativité est indiquée par ** ($p<0,01$).

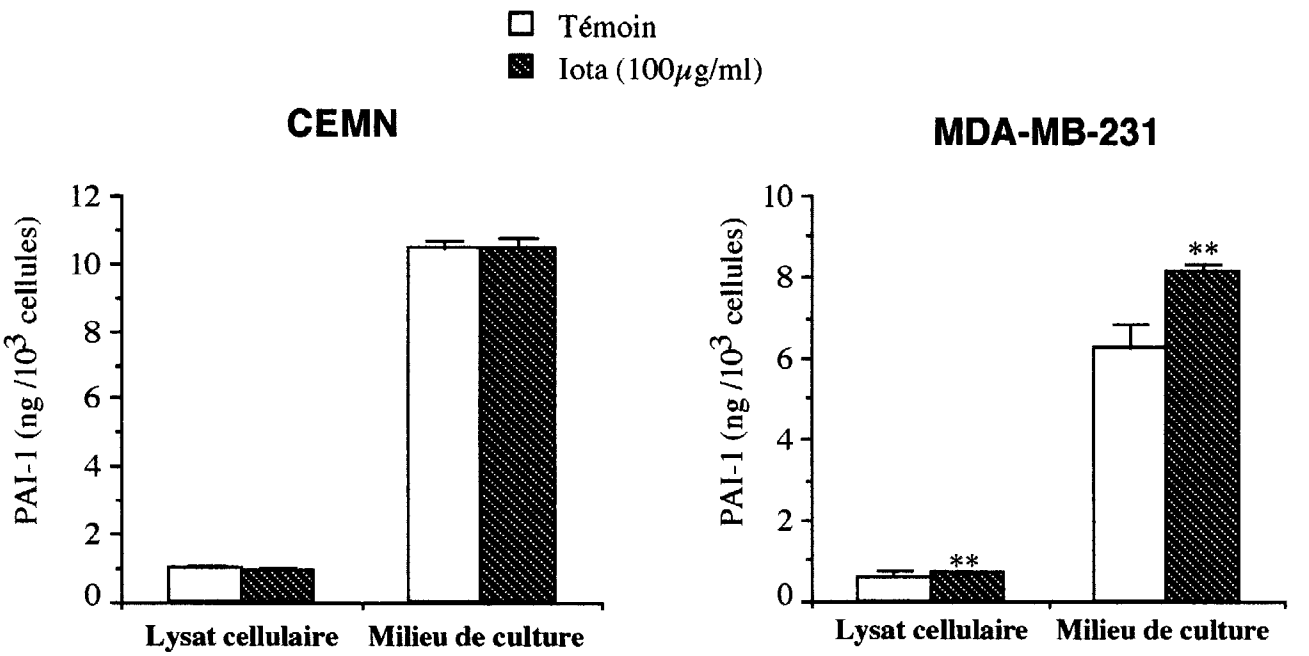


Figure 37: Effets des carraghénanes Iota sur le niveau de PAI-1 des cellules épithéliales mammaires CEMN et MDA-MB-231. Les cellules sont traitées aux carraghénanes Iota (100 µg/ml) pendant 24 heures en milieu EMEM 0% SVF. Les quantités de PAI-1 présentes dans les lysats cellulaires et sécrétées dans les milieux de culture ont été déterminées par test ELISA. Les valeurs rapportées correspondent à la moyenne de 2 expériences avec pour chacune d'elle 2 déterminations. Les résultats sont exprimés en ng/1 000 cellules, leur significativité est indiquée par ** ($p<0,01$).

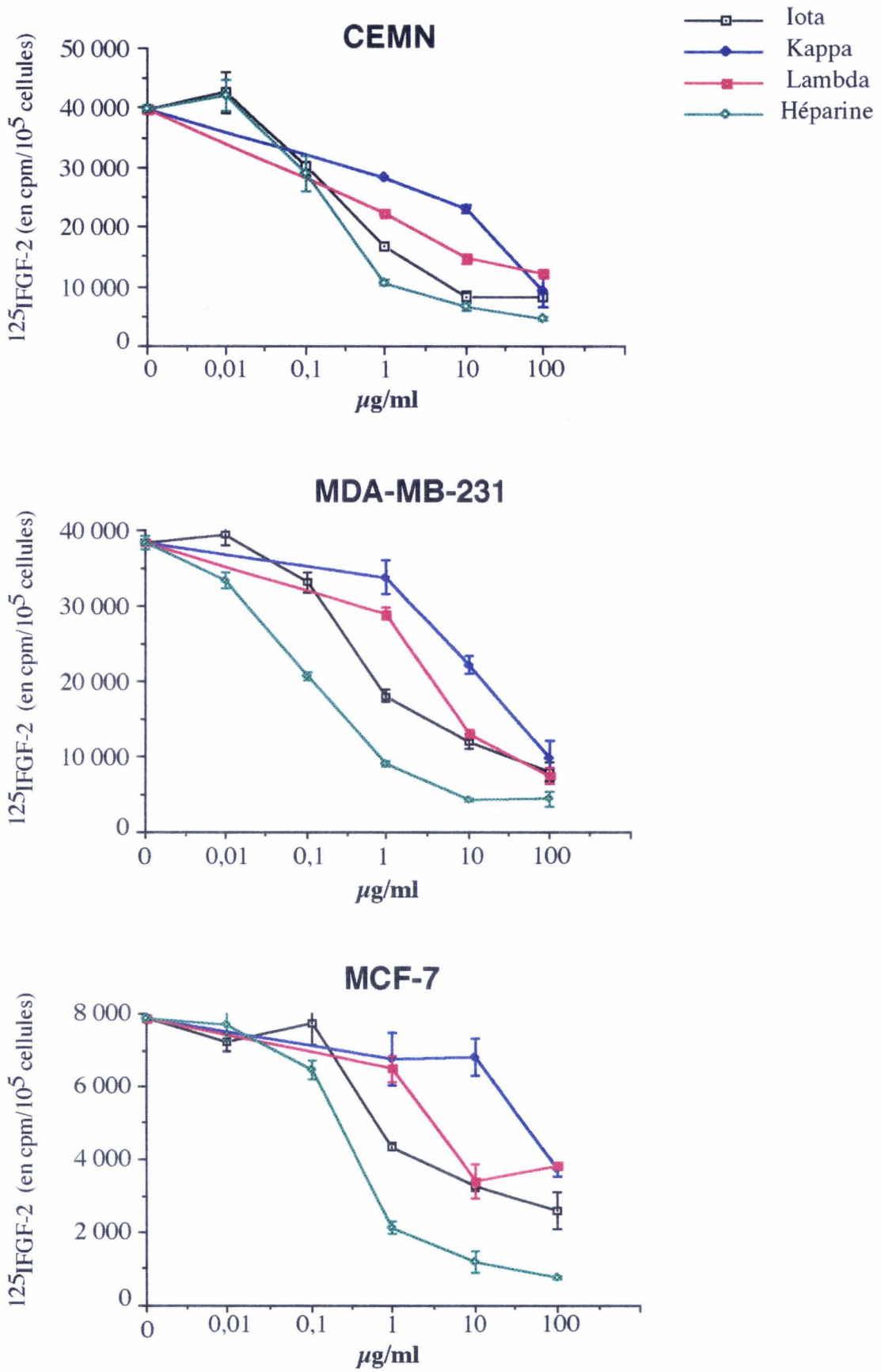


Figure 38 : Effets des carraghénanes et de l'héparine sur la liaison du ^{125}I FGF-2 au niveau des cellules épithéliales mammaires. Les cellules ont été traitées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les carraghénanes ou l'héparine, aux concentratons indiquées, ont été ajoutés simultanément au FGF-2 radiomarqué (550 pM) pendant 2 heures à 4°C. Les résultats rapportés correspondent à la moyenne des 2 valeurs d'une expérience représentative de 3 expériences effectuées, ils sont exprimés en cpm/100 000 cellules.

Des observations identiques peuvent être rapportées pour les cellules MDA-MB-231. En effet, pour cette lignée cellulaire nous avons observé, d'une part que les trois carraghénanes à la dose de 100 µg/ml réduisent d'une même amplitude (80%) la liaison du ^{125}I FGF-2 et d'autre part qu'à la concentration de 1 µg/ml, les carraghénanes ι entraînent une inhibition de la fixation du ^{125}I FGF-2 plus importante que les deux autres types de carraghénanes (50% d'inhibition pour la forme ι contre 12 et 24% pour les formes κ et λ respectivement).

La liaison du FGF-2 radiomarqué sur les cellules MCF-7 paraît moins sensible à l'action des carraghénanes, les réductions observées variant entre 50 et 65%. Comme pour les CEMN et les cellules MDA-MB-231, il semble que la forme ι soit également la plus puissante puisqu'à la concentration de 1 µg/ml, elle induit un effet largement supérieur à celui obtenu avec les deux autres formes de carraghénanes.

IV) Discussion

Nous avons montré que les carraghénanes, polysaccharides sulfatés considérés comme antagonistes de certains facteurs de croissance et notamment du FGF-2, sont capables de réguler la prolifération et le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires. Au cours de cette discussion, nous analyserons les effets des carraghénanes sur les cellules épithéliales mammaires en relation avec la capacité qu'ont ces molécules d'interagir avec ce facteur de croissance.

A) Régulation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires par les carraghénanes

Les résultats obtenus montrent clairement que les carraghénanes utilisés inhibent la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales et tumorales et ce, en l'absence de tout ajout de facteur de croissance dans le milieu de culture. Des effets antiprolifératifs des carraghénanes ont déjà été rapportés pour des types cellulaires variés tels que des cellules

endothéliales, des cellules cancéreuses prostatiques et les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Hoffman et al., 1995). Les carraghénanes peuvent cependant n'exercer aucun effet sur la prolifération cellulaire, comme sur celle des fibroblastes murins L929 (Schmidt et al., 1993) ou avoir un effet stimulateur sur celle-ci (cas des cellules épithéliales de côlon de rat, Calvert et Satchithanandam, 1992 ; Wilcox et al., 1992). Nous avons observé que l'inhibition de la croissance des cellules épithéliales mammaires varie pour une même dose en fonction du type de carraghénanes utilisé, et pour un même type de carraghénanes en fonction du type cellulaire. Il apparaît cependant que la forme ι s'avère très efficace pour réduire la prolifération des 3 types cellulaires étudiés.

Les carraghénanes agissent en contrecarrant l'action de certains facteurs de croissance. Ils sont capables d'inhiber la fixation du FGF-2, du TGFß1 et du PDGF (Hoffman, 1993) mais le mécanisme précis par lequel ces polysaccharides s'opposent à l'interaction des facteurs de croissance et de leur récepteur n'est pas totalement élucidé. Le FGF-2, le TGFß1 et le PDGF possèdent tous les trois la caractéristique de pouvoir se lier à l'héparine (Burgess et Maciag, 1991 ; Vlodavsky et al., 1987 ; McCaffrey et al., 1992). Aussi, en raison des similarités structurales existant entre les carraghénanes et l'héparine, il a été suggéré que les polysaccharides sulfatés interagiraient avec les facteurs de croissance au niveau de leur domaine de fixation à l'héparine. D'ailleurs, Hoffman et Sykes (1993) ont montré que l'héparine et les carraghénanes ι présentaient les mêmes capacités à déplacer le FGF-2 des sites de fixation de basse et de haute affinité des cellules de rein BHK.

Les cellules épithéliales mammaires possèdent également des sites de fixation pour le FGF-2 (Peyrat et al., 1991 ; Briozzo, 1991) et nous venons de montrer que parmi les trois types de carraghénanes utilisés, c'est la forme ι qui se révèle la plus efficace pour réduire la fixation de ce facteur de croissance au niveau des cellules mammaires, résultat en accord d'ailleurs avec celui obtenu par Hoffman et Sykes (1993) sur les cellules BHK. Il a d'ailleurs été décrit que les carraghénanes ι réduisent la croissance de la lignée cancéreuse MCF-7 stimulée à proliférer sous l'action du FGF-2 (Hoffman et al., 1995). On sait également que les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses produisent du FGF-2 (Luqmani et al., 1992 ; Ke et al., 1993 ; Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Pennault-Llorca

et al., 1995 ; Renaud et al., 1996) et que ce facteur de croissance pourrait stimuler leur prolifération en agissant par une boucle autocrine externe (Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Renaud et al., 1996). Considérant d'une part que les carraghénanes ι diminuent fortement la croissance des cellules épithéliales mammaires et ce, en l'absence de tout ajout de facteur de croissance dans le milieu de culture, et que d'autre part ils s'opposent efficacement à la fixation du FGF-2, on peut supposer que l'inhibition de la prolifération observée résulterait d'une réduction de la biodisponibilité du FGF-2 d'origine endogène par séquestration par ces carraghénanes.

Par ailleurs, un autre mécanisme possible de contrôle de l'activité du FGF-2 par les carraghénanes peut être dû à la capacité de ces polysaccharides sulfatés à inhiber l'activité héparanase (Parish et al., 1987 ; Ishai-Michaeli et al., 1990 ; Katz et al., 1994) dont on sait qu'elle intervient dans la libération du FGF-2 séquestré dans la matrice extracellulaire (Vlodavsky et al., 1990-1991). Il convient cependant de préciser que dans ces travaux, ce sont les formes κ et λ qui ont été considérées et non la forme ι.

B) Régulation du système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires par les carraghénanes ι

Au cours de ce travail, nous avons examiné si les carraghénanes ι régulaient également le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires. Cependant, bien que ce type de carraghénanes soit capable de réduire de la même façon la prolifération des CEMN et des cellules MDA-MB-231, il n'entraîne pas les mêmes effets sur le système uPA/PAI-1 de ces deux types cellulaires. Ainsi, il ne produit aucun effet ni sur l'activité uPA, ni sur le niveau de PAI-1 des CEMN alors que pour les cellules MDA-MB-231, il diminue l'activité uPA et augmente d'une même amplitude le niveau de PAI-1, régulant ainsi la balance uPA/PAI-1 de façon à réduire l'activité de l'activateur du plasminogène. La capacité des carraghénanes à influencer l'invasion des cellules tumorales a certes déjà été évoquée : il a été décrit que les carraghénanes κ s'opposent à la métastase de cellules d'adénocarcinomes mammaires de rat en

inhibant les héparanases produites par les cellules tumorales (Parish et al., 1987). De même, les carraghénanes λ inhibent l'activité héparanase de cellules de lymphome (Ishai-Michaeli et al., 1990) et de cellules transformées BALB/c 3T3 fortement tumorigènes (Katz et al., 1994). L'invasion tumorale est toutefois un processus complexe impliquant une grande variété d'enzymes telles que la collagénase, la cathepsine B, les héparanases et l'activateur du plasminogène de type urokinase (Jones et De Clerck, 1982 ; Liotta et al., 1982 ; Nicolson, 1982 ; Nakajima et al., 1983 ; Pauli et al., 1983 ; Vlodavsky et al., 1983). Aussi, bien que le système uPA/PAI-1 joue un rôle important dans les phénomènes de migration cellulaire, sa régulation par les carraghénanes n'avait jamais été recherchée.

Nous savons par ailleurs que le FGF-2 est capable de moduler positivement l'uPA de certains types cellulaires telles que les cellules endothéliales (Moscatelli et al., 1986b ; Moscatelli, 1987 ; Saksela et al., 1987 ; Presta et al., 1989 ; Pepper et al., 1990), des fibroblastes NIH 3T3 (Besser et al., 1995), des myoblastes L6 (Quarto et Almaric, 1994) ou encore des cellules de carcinomes mammaires dont les cellules MDA-MB-231 (Mira-y-Lopez et al., 1986). Aussi, nous pourrions également envisager que l'action des carraghénanes ι sur l'activité uPA passerait par une régulation de la biodisponibilité du FGF-2 endogène. Cependant, si cette hypothèse parait plausible dans le cas des cellules MDA-MB-231 dont l'activité uPA est diminuée après traitement aux carraghénanes, elle n'est pas recevable pour les CEMN puisque les carraghénanes ι ne modifient pas leur activité uPA.

En conclusion, il apparaît que bien que les carraghénanes inhibent la prolifération à la fois des cellules normales et des cellules tumorales, ils réduisent l'activité uPA seulement de la lignée cancéreuse MDA-MB-231 suggérant ainsi que les carraghénanes ι régulent de façon indépendante la prolifération cellulaire et le système uPA/PAI-1 des cellules épithéliales mammaires. L'effet des carraghénanes sur la prolifération cellulaire pourrait passer par une séquestration du FGF-2 alors que l'activité uPA n'impliquerait pas ce facteur de croissance. Il convient toutefois de remarquer que pour un type cellulaire donné, le FGF-2 ne régule pas obligatoirement à la fois sa prolifération et son système uPA. En effet, il a été montré que le FGF-2 est capable *in vitro* de stimuler l'activité uPA de cellules de carcinomes mammaires sans

modifier leur prolifération (Mira-y-Lopez et al., 1986). Par conséquent il est possible que dans notre système, le FGF-2 contrôle de façon autocrine la prolifération des CEMN sans intervenir sur leur activité uPA. Par contre, pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231, le FGF-2 agirait sur ces deux types d'activité cellulaire. Par ailleurs, la physiologie cellulaire n'est pas uniquement sous la dépendance du FGF-2, elle nécessite l'intervention de nombreux facteurs et les besoins varient en fonction notamment du statut normal ou cancéreux des cellules. Les cellules cancéreuses étant capables d'une plus grande autonomie, il est possible que le FGF-2 a lui seul suffise à induire leur activité uPA alors que pour les cellules normales, d'autres facteurs seraient également nécessaires. En outre, sachant que les carraghénanes interagissent avec d'autres facteurs de croissance ayant une affinité pour l'héparine, il est bien évident que leurs effets sur la croissance cellulaire et le système uPA/PAI-1 ne peuvent pas être attribués uniquement à une inhibition de l'activité du FGF-2.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le FGF-2 produit *in vitro* par les cellules cancéreuses mammaires est capable de stimuler leur prolifération par une boucle autocrine externe (Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Renaud et al., 1996). Il a été montré par ailleurs que ce facteur de croissance et ses récepteurs sont présents dans les tumeurs mammaires (Gomm et al., 1991 ; Peyrat et al., 1992) et que la concentration sérique de FGF-2, élevée chez les femmes atteintes de cancer du sein, s'abaisse après ablation de la tumeur (Takei et al., 1994). L'ensemble de ces résultats suggère l'importance du FGF-2 dans le contrôle des cellules tumorales mammaires.

Dans ce travail, nous avons tenté de restituer aux cellules cancéreuses mammaires une physiologie normale en les soumettant à l'action d'inhibiteurs de prolifération et d'apprécier ainsi le rôle du FGF dans le contrôle de la cancérogenèse mammaire tant sur le plan de la prolifération que de la mobilité cellulaires. Notre étude est centrée sur deux lignées cancéreuses : une lignée hormono-indépendante, hautement invasive (cellules MDA-MB-231) et une lignée hormono-dépendante et non métastatique (cellules MCF-7). Des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) issues de mammoplasties réductionnelles et servant de témoin sont étudiées en parallèle. Les cellules sont soumises à l'action de trois agents connus pour inhiber la prolifération (le Transforming Growth Factor ß1, TGFß1) et/ou induire la différenciation (le butyrate de sodium, NaB et l'acide rétinoïque, RA).

Nous avons d'abord montré (chapitre 1) que chacun des trois inhibiteurs utilisés agit de façon propre suivant le type cellulaire considéré. En particulier, leur aptitude à réguler la croissance des cellules cancéreuses diffère en fonction du degré de différenciation et du pouvoir métastatique de ces dernières. Ainsi, les cellules MCF-7, cellules différenciées peu invasives, sont sensibles à deux agents inhibiteurs (le NaB et le RA) tandis que la croissance des cellules MDA-MB-231 n'est ralentie que par le NaB et ce, de façon moindre que les deux autres types cellulaires. Par contre, les trois agents utilisés inhibent de façon importante la prolifération des cellules mammaires normales.

L'inhibition de la prolifération des cellules traitées peut se traduire dans certains cas par une induction plus ou moins poussée de leur différenciation, appréciée en terme d'expression de l'épisialine et de l'α-lactalbumine. En fait, la capacité des cellules mammaires à se différencier dépend de leur état de différenciation initial. Les cellules normales, cellules déjà fortement différenciées ne sont pas induites à se différencier davantage alors que les cellules cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 peuvent exprimer, sous l'influence du NaB, les mêmes taux d'épisialine et d'α-lactalbumine que les cellules normales. Toutefois, lorsque les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques de cellules indifférenciées (cellules MDA-MB-231), il semble qu'elles soient plus difficilement contrôlables puisqu'aucun effet différenciateur n'est observé malgré une bonne inhibition de leur prolifération. Nous avons par ailleurs observé que sous l'influence du NaB et du RA, une induction de différenciation est toujours corrélée à un ralentissement de la prolifération. Cette corrélation n'est toutefois pas respectée après traitement au TGFß1, ce facteur de croissance ayant entraîné une différenciation des cellules MCF-7 sans aucune modification de leur croissance.

Outre leur prolifération anarchique et leur perte de différenciation, les cellules cancéreuses sont caractérisées par leur capacité à envahir le mésenchyme sous-jacent et à migrer. Par conséquent, maîtriser les mécanismes intervenant dans le déplacement des cellules apparaît être également un point important dans le contrôle des cellules cancéreuses. Dans ce travail nous avons recherché (chapitre 2) si le TGFß1, le NaB et le RA sont capables d'influencer le système uPA/PAI-1, un des nombreux éléments impliqués dans la destruction des membranes basales et des matrices extracellulaires, événement préalable à la migration cellulaire. Nous avons observé que des facteurs capables de réguler la prolifération et/ou la différenciation des cellules mammaires peuvent également influencer leur système uPA/PAI-1. Contrairement aux cellules normales dont le système uPA/PAI-1 est réduit sous l'influence du TGFß1 et du NaB, les cellules cancéreuses MDA-MB-231 montrent une diminution de leur système uPA/PAI-1 seulement après traitement au NaB. Sous l'action du TGFß1, ce type cellulaire présente en effet une augmentation conséquente de son activité uPA. Par ailleurs, ni les cellules normales, ni les cellules cancéreuses n'ont modifié l'activité de la protéase après traitement au RA.

L'ensemble des résultats obtenus montre que chacun des inhibiteurs utilisés exerce un effet particulier si on considère d'une part la prolifération/différenciation et d'autre part le système uPA/PAI-1. Le TGFß1 apparaît être un bon inhibiteur de la prolifération et du système uPA/PAI-1 des cellules normales. A l'inverse, il n'entraîne aucune réduction de la croissance des cellules tumorales, qu'elles soient hormono-dépendantes ou hormono-indépendantes mais peut stimuler leur activité uPA. Ce facteur de croissance semble donc n'exercer aucun effet favorable sur la régulation des cellules cancéreuses. Le RA est capable de réduire la prolifération et d'induire une faible différenciation des cellules cancéreuses mammaires dans la mesure où celles-ci n'ont pas totalement perdu leur différenciation initiale ; par contre il n'exerce aucun effet sur le système uPA/PAI-1 des cellules mammaires. Le NaB agit en réduisant à la fois la prolifération et le système uPA/PAI-1 des cellules mammaires normales et cancéreuses. En outre, l'inhibition de la prolifération obtenue après action de cet agent est associée dans certains cas à un bel effet différenciateur, le NaB pouvant réorienter les cellules cancéreuses hormono-dépendantes vers un phénotype de cellules mammaires normales. Le NaB s'avère donc être un bon agent anticancéreux.

Sachant que les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses produisent du FGF-2 stimulant leur prolifération (Souttou et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Renaud et al., 1996) et que ce facteur de croissance est capable d'augmenter l'activité uPA de types cellulaires variés dont les cellules cancéreuses mammaires (Mira-y-Lopez et al., 1986 ; Moscatelli et al., 1986b ; Pepper et al., 1990 ; Quarto et Almaric, 1994 ; Besser et al., 1995), nous nous sommes demandés si le TGFß1, le NaB ou le RA diminuait la prolifération cellulaire et/ou l'activité uPA via le FGF-2 en modulant sa production, l'expression des ses sites de fixation ou encore la cascade de transduction du signal. Dans ce travail, nous avons choisi d'analyser l'action du TGFß1, du NaB et du RA sur la régulation des sites de fixation du FGF-2. On sait effectivement que dans d'autres systèmes, une réduction de la prolifération ou une induction de la différenciation est concomitante d'une diminution des sites de fixation de haute affinité pour le FGF-2 (Olwin et Hauschka, 1988 ; Iwamoto et al., 1991 ; Templeton et Hauschka, 1992 ; Pertovaara et al., 1993b ; Olwin et al., 1994). En outre, il a également été

démontré que les sites de basse affinité, correspondant à des HSPG, jouent un rôle important dans le contrôle de l'activité mitogène du FGF-2 sur les cellules cancéreuses mammaires (Delehedde et al., 1996-1997) et peuvent d'autre part assurer la signalisation du FGF-2 dans l'induction de l'uPA (Quarto et Almaric, 1994). Nous avons montré (chapitre 3) que les trois inhibiteurs utilisés ne modifient pas de façon significative le nombre et l'affinité des sites de haute affinité. En revanche, ces agents modifient profondément la synthèse des HSPG (chapitre 4). En particulier pour le TGFß1 et le NaB, nous avons observé une corrélation entre l'augmentation de la synthèse des HSPG d'une part et les diminutions de prolifération et d'activité uPA d'autre part. Par contre, une telle corrélation n'a pas pu être mise en évidence pour le RA. Sur la base de ces résultats, il était donc possible de considérer que les diminutions de prolifération et d'activité uPA observées après traitement au TGFß1 et au NaB résultent d'une réduction de la biodisponibilité du FGF-2 d'origine endogène par séquestration dans les HSPG néosynthétisés, conduisant ainsi à une inhibition de l'activité de ce facteur de croissance sur les cellules productrices. Il existe d'ailleurs un certain nombre de cas où une augmentation de la quantité d'HSPG se traduit par une diminution de la prolifération cellulaire induite par le FGF-2. Cette observation a été rapportée pour le cerveau et le placenta au cours du développement (Hondermarck et al., 1990b-1992b), le blastème de régénération de membre après dénervation (Boilly et al., 1995), les cellules musculaires lisses (Schmidt et al., 1990-1992a, b ; Nugent et al., 1993), les fibroblastes de poumon (Aviezer et al., 1994) ainsi que dans les cellules mammaires prénéoplasiques de souris (Angello et al., 1982b). De plus, il a été démontré qu'une surexpression du syndecan-1 (prototype des HSPG) inhibe totalement la prolifération des cellules NIH-3T3 stimulées par le FGF-2 (Mali et al., 1993). D'ailleurs, cette propriété des HSPG de réduire la prolifération a été mise à profit pour restaurer une morphologie épithéliale et réduire la tumorogénécité de cellules mammaires murines injectées dans les souris nude en provoquant une surexpression du syndecan-1 (Leppa et al., 1992).

Afin de vérifier l'hypothèse de la séquestration du FGF-2 par les HSPG néosynthétisés, nous avons recréé sur les cellules épithéliales mammaires une situation proche de celle obtenue après action du TGFß1 et du NaB en remplaçant les HSPG par un apport exogène de molécules

apparentées à l'héparine. Dans cette hypothèse, le FGF-2 produit par les cellules mammaires serait capté par les molécules de type héparine et ne pourrait plus exercer ses effets sur les cellules. Notre choix s'est porté sur les carraghénanes, polysaccharides sulfatés connus comme antagonistes du FGF-2 puisqu'ils sont capables d'une part d'entrer en compétition avec les sites de fixation de ce facteur de croissance à la surface de la cellule (Hoffman et Sykes, 1993) et d'autre part de diminuer la libération du FGF-2 séquestré dans la matrice extracellulaire en inhibant les héparanases (Vlodavsky et al., 1990).

Nous avons montré (chapitre 5) que bien que les carraghénanes inhibent la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales et tumorales, ils ne réduisent l'activité uPA que des seules cellules cancéreuses MDA-MB-231. Ce résultat, associé au fait que les carraghénanes s'opposent à la liaison du FGF-2 au niveau des cellules mammaires, nous a conduit à deux hypothèses. La première implique que les carraghénanes régulent de façon indépendante la prolifération et l'activité uPA. Dans ces conditions, les carraghénanes ne contrôleraient que la prolifération par réduction de la biodisponibilité du FGF-2 endogène par séquestration par ces polysaccharides sulfatés. La seconde hypothèse considère que le FGF-2 agirait différemment selon le statut normal ou cancéreux des cellules, ce facteur de croissance n'agissant que sur la prolifération des cellules normales alors qu'il influencerait à la fois la prolifération et l'activité uPA des cellules cancéreuses. Toutefois, il convient de souligner que les effets des carraghénanes sur la croissance cellulaire et le système uPA/PAI-1 ne peuvent pas être attribués uniquement à une inhibition de l'activité du FGF-2 dans la mesure où ces polysaccharides sulfatés interagissent avec d'autres facteurs de croissance ayant une affinité pour l'héparine tel que notamment le TGFß1 (Hoffman, 1993), dont on sait qu'il est également sécrété par les cellules épithéliales mammaires (Zajchowski et al., 1988 ; Arrick et al., 1990).

Ainsi, il apparaît (tableau 5) que pour les cellules mammaires normales ou cancéreuses, seul le NaB inhibe à la fois la prolifération et l'activité uPA tout en augmentant la synthèse d'HSPG. Ce résultat pourrait rendre compte d'une diminution de la biodisponibilité du FGF endogène résultant d'une augmentation de la synthèse d'HSPG en présence de cet inhibiteur.

		CEMN	MDA-MB-231	MCF-7
TGFß1	Prolifération	↘ 75%	—	—
	uPA	↘ 79%	↗ 735%	N.D.
	HSPG – Couche cellulaire	↗ 120%	—	↗ 68%
	HSPG – Milieu de culture	—	↘ 30%	—
	HSPG – Totaux	—	—	↗ 50%
NaB	Prolifération	↘ 80%	↘ 58%	↘ 73%
	uPA	↘ 50%	↘ 50%	N.D.
	HSPG – Couche cellulaire	↗ 250%	↗ 80%	↗ 220%
	HSPG – Milieu de culture	↗ 125%	↗ 150%	↗ 132%
	HSPG – Totaux	↗ 160%	↗ 110%	↗ 165%
RA	Prolifération	↘ 50%	—	↘ 33%
	uPA	—	—	N.D.
	HSPG – Couche cellulaire	—	↘ 51%	↗ 44%
	HSPG – Milieu de culture	—	—	—
	HSPG – Totaux	—	—	—

Tableau 5 : Récapitulatif des effets du TGFß1, du NaB et du RA sur les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses.
N.D. : non détecté, —— : pas d'effet

Une telle interprétation paraît aussi rendre compte des résultats obtenus sur les cellules normales soumises à l'action du TGFß1 qui comme le NaB diminue la prolifération et l'activité uPA tout en augmentant la synthèse d'HSPG (couche cellulaire uniquement). Cette corrélation inverse n'est cependant observable pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231 traitées au TGFß1 que pour l'activité uPA (qui augmente en présence de TGFß1) et la synthèse d'HSPG (qui diminue en présence de TGFß1 pour les HSPG du milieu de culture uniquement). Par contre, aucune corrélation de ce type ne peut être proposée pour le RA. Il est donc possible qu'un mécanisme de régulation différent de celui proposé (modulation de la biodisponibilité du FGF-2 par les HSPG) puisse rendre compte de ce dernier résultat à moins que le caractère limité des effets produits par le RA ne masque les corrélations observées notamment pour le NaB. Néanmoins, il conviendra de vérifier que les HSPG néosynthétisés après action du TGFß1 et du NaB fixent effectivement le FGF-2 et régulent spécifiquement son activité, ce facteur de croissance n'étant pas le seul facteur à interagir avec les HSPG. L'HGF (Hepatocyte Growth Factor) est également capable de se fixer aux héparanes sulfates (Ashikara et al., 1995 ; Zioncheck et al., 1995), cette fixation pouvant moduler son activité mitogène (Zioncheck et al., 1995). Par ailleurs, l'HGF, tout comme le FGF, peut avoir un rôle mitogène et motogène au niveau de la glande mammaire (Niranjan et al., 1995). Un autre facteur de croissance capable de se lier aux protéoglycanes est le TGFß. Le récepteur de type III du TGFß est le betaglycan pouvant lier le TGFß par sa partie protéique et le FGF-2 par ses chaînes de GAG de type HSPG. En outre, sachant qu'une sous sulfatation des HSPG peut empêcher l'organisation de la matrice extracellulaire, le maintien du phénotype différencié ou encore l'adhésion des cellules (Robinson et al., 1984 ; Parry et al., 1985 ; Brauer et al., 1990), il serait intéressant d'analyser les modifications induites par le TGFß1 et le NaB sur la structure et/ou la sulfatation de ces macromolécules. Ainsi, en modifiant leurs chaînes d'HS sous l'influence du TGFß1 ou du NaB, les cellules pourraient réguler leur capacité de liaison avec les composants de la matrice extracellulaire ou les facteurs de croissance et contrôler ainsi leur prolifération, leur différenciation et leur migration.

Ces perspectives devraient permettre d'une part de mieux définir au niveau moléculaire les caractéristiques structurales des HS impliqués dans les mécanismes de contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaires et d'autre part d'éclaircir davantage le rôle des HSPG dans la régulation de l'activité biologique du FGF-2. Elles devraient par ailleurs ouvrir la voie à de possibles applications thérapeutiques telles que l'utilisation des HSPG comme facteur pronostique et/ou thérapeutique.

BU
LILLE I

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABE M., KUFE D.W., 1984 (a). Effect of sodium butyrate on human breast carcinoma (MCF-7) cellular proliferation, morphology, and CEA production. *Breast Cancer Research and Treatment*, **4**, 269-274.

ABE M., KUFE D.W., 1984 (b). Sodium butyrate induction of milk-related antigens in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, **44**, 4574-4577.

ABE M., KUFE D.W., 1986. Effects of maturational agents on expression and secretion of two partially characterized high molecular weight milk-related glycoproteins in MCF-7 breast carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.*, **126**, 126-132.

ABRAHAM J., MERGIA J.L., WHANG A., TUMOTO J., FRIEMAN K.A., HJERRILD D., GOSPODAROVITCZ D., FIDDES J.C., 1986. Nucleoside sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* , **233**, 545-548.

ACHBAROU A., KAISER S., TREMBLAY G., STE MARIE L.G., BRODT P., GOLTZMAN D., RABBANI S.A., 1994. Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells *in vivo*. *Cancer Res.*, **54**, 2372-2377.

ADAMO M.L., SHAO Z.M., LANAU F., CHEN J.C., CLEMMONS D.R., ROBERTS C.T., LEROITH Jr.D., FONTANA J.A., 1992. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and retinoic acid modulation of IGF-binding proteins (IGFBPs) : IGFBP-2, -3, -4 gene expression and protein secretion in a breast cancer cell line. *Endocrinology*, **131**, 1858-1866.

ADELAIDE J., MATTEI M.G., MARICS I., RAYBAUD F., PLANCKE J., DE LAPEYRIERE 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 cancers. *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. *J. Neurosci. Res.*, **23**, 282-289.

AKAVAAG A., UTAAKER E., THORSEN T., LEA O.A., LAHOOTI H., 1990. Growth control of human mammary cancer cells (MCF-7 cells) in culture : Effect of estradiol and growth factor in serum-containing medium. *Cancer Res.*, **50**, 7806-7810.

ALBO D., ARNOLETTI J.P., CASTIGLIONI A., GRANICK M.S., SOLOMON M.P., ROTHMAN L., TUSZYNSKI G.P., 1994. Thrombospondin (TSP) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta) promote human A549 lung carcinoma cell plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) production and stimulate tumor cell attachment *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **203**, 857-865.

ALI J., MANSUKHANI A., BASILICO C., 1995. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 are differentially regulated in murine embryonal carcinoma cells and in response to fibroblast growth factor-4. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 438-448.

ALINI M., LOSA G., 1991. Partial characterization of proteoglycans isolated from neoplastic and nonneoplastic human breast tissues. *Cancer Res.*, **51**, 1443-1447.

ALLENBY G., JANOCHA R., KAZNER S., SPECK J., GRIPPO J.F., LEVIN A.A., 1994. Binding of 9-cis-retinoic acid and all-trans-retinoic acid to retinoic acid receptor α, ß and γ. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16689-16695.

ALMARIC F., BOUCHE G., BONNET H., BRETHENOU P., ROMAN A.M., TRUCHET I., QUARTO N., 1994. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus : translocation process and targets. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 111-115.

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 begnin and malignant 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*, **332**, 360-361.

ANDREANSEN P.A., GEORG B., LUNG L.R., RICCIO A., STACEY S.N., 1990. Plasminogen activator inhibitors : hormonally regulated serpins. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **68**, 1-19.

ANDRES J., DEFALCIS D., NODA M., MASSAGUE J., 1992. Binding of two growth factor families to separate domains of the betaglycan. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5927-5930.

ANGELLO J.C., DANIELSON K.G., ANDERSON L.W., HOSIK H.L., 1982 (a). Glycosaminoglycans synthesis by subpopulations of epithelial cells from a mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.*,**42**, 2207-2210.

ANGELLO J.C., HOSICK H. L., ANDERSON L.W., 1982 (b). Glycosaminoglycans synthesis by a cell line (C1-S1) established from a preneoplastic mouse mammary outgrowth. *Cancer Res.*, **42**, 4975-4978.

ANTALIS T.M., REEDER J.A., 1995. Butyrate regulates gene expression of the plasminogen activating system in colon cancer cells. *Int. J. Cancer*, **62**, 619-626.

ANZANO M.A., BYERS S.W., SMITH J.M., PEER C.W., MULLEN L.T., BROWN C.C., ROBERTS A.B., SPORN M.B., 1994. Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res.*, **54**, 4614-4617.

ARAKAWA T., WEN J., PHILO J.S., 1994. Stoichiometry of heparin binding to basic fibroblast growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* , **308**, 267-273.

ARCHER S.J., BAX A., ROBERTS A.B., SPORN M.B., OGAWA Y., PIEZ K.A., WEATHERBEE J.A., TSANG M.L.S., LUCAS R., ZHENG B.L., WENKER J., TORCHIA D.A., 1993. Transforming growth factor ß1 : secondary structure as determined by heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **32**, 1164-1171.

ARKLIE J., TAYLOR-PAPADIMITROU J., BODMER W., EGAN M., MILLIS R., 1981. Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancer. *Int. J. Cancer*, **28**, 23-29.

ARNOLETTI J.P., ALBO D., GRANICK M.S., SOLOMON M.P., CASTIGLIONI A., ROTHMAN V.L., TUSZYNSKI G.P., 1995. Thrombospondin and transforming growth factor-beta 1 increase expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer*, **76**,998-1005.

ARRICK B.A., KORC M., DERYNCK R., 1990. Differential regulation of expression of three transforming growth factor ß species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res.*, **50**, 299-303.

ARTEAGA C.L., TANDON A.K., VON HOFF D.D., OSBORNE C.K., 1988. Transforming growth factor ß : Potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **48**, 3898-3904.

ARTEAGA C.L., COFFEY R.J.Jr., DUGGER T.C., McCUTCHEN C.M., MOSES H.L., LYONS R.M., 1990. Growth stimulaton of human breast cancer cells with anti-transforming growth factor ß antibodies : Evidence for negative autocrine regulation by transforming growth-ß. *Cell growth and differentiation*, **1**, 367-374.

ASHIKARI S., HABUCHI H., KIMATA K., 1995. Characterization of heparan sulfate oligosaccharides that bind to hepatocyte growth factor. J. Biol. Chem., **270**, 29586-29593.

ATENCIA R., GARCIA-SANZ M., UNDA F., ARECHAGA J., 1994. Apoptosis during retonoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, **214**, 663-667.

AUGERON C., LABOISSE C.L., 1984. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.*, **44**, 3961-3969.

AUVINEN P., LIPPONEN P., JOHANSSON R., SYRJANEN K., 1995. Prognostic significiance of TGF-ß1 and TGF-ß2 expressions in female breast cancer. *Anticancer Res.*, **15**, 2627-2632.

AVIEZER D., LEVY E., SAFRAN M., SVAHN C., BUDDEKE E., SCHMIDT E., DAVID G., VLODAVSKY I., YAYON A., 1994. Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of bFGF to its receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 114-121.

BAIRD A., ESCH F., MORMEDE P., UENO N., LING N., BOHLEN P., YING S.Y., WEHRENBERG W.B., GUILLEMIN R., 1986. Molecular characterization of fibroblast growth factor : Distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog. Horm. Res.* **42**, 143-205.

BAIRD A., SCHUBERT D., LING N., GUILLEMIN R., 1988. Receptor and heparin binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2324-2328.

BALDIN V., ROMAN A.M., BOSC-BIERNE I., AMALRIC F., BOUCHE G., 1990. Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J.*, **9**, 1511-1517.

BANG Y-J., KIM S-J., DANIELPOUR D., O'REILLY M.A., KIM K.Y., MYERS C.E., TREPEL J.B., 1992. Cyclic AMP induces transforming growth factor ß2 gene expression and growth arrest in the human androgen-independent prostate carcinoma cell line PC-3. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**, 3556-3560.

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.

BARNARD J.A., LYONS R.M. MOSES H.L., 1990. The cell biology of transforming growth factor. *Biochem. Biophys. Acta*, **1032**, 79-87.

BARNARD J.A., WARWICK G., 1993. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth and Differentiation*, **4**, 495-501.

BARRETT-LEE P., TRAVERS M., LUQMANI Y., COOMBES R.C., 1990. Transcripts for transforming growth factors in human breast cancer : clinical correlates. *Br. J. cancer*, **61**, 612-617.

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 heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry*, **28**, 1737-1743.

BASILICO C., MOSCATELLI D., 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.*, **59**, 115-165.

BASSOLS A., MASSAGUE J., 1988. Transforming growth factor ß regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3039-3045.

BATOVA A., DANIELPOUR D., PIRISI L., CREEK K.E., 1992. Retinoic acid induces secretion of latent transforming growth factor ß1 and ß2 in normal and human papillomavirus type 16-immortalized human keratinocytes. *Cell Growth and Differentiation*, **3**, 763-772.

BECK J.C., LEKUTIS C., COUCHMAN J., PARRY G., 1993. Stage-specific remodeling of the mammary gland basement membrane during lactogenic development. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **190**, 616-623.

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.L., RODECK U., HERLYN M., 1992. Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene*, **7**, 2303-2313.

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.

BENEZRA M., VLODAVSKY I., ISHAI-MICHAELI R., NEUFELD G., BAR-SHAVIT R., 1993. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* , **81**, 3324-3331.

BENNETT D.C., PEACHEY L.A., DURBIN H., RUDLAND P.S., 1978. A possible mammary stem cell line. *Cell*, **15**, 283-298.

BENSON J.R., WAKEFIELD L.M., BAUM M., COLLETTA A.A., 1996. Synthesis and secretion of transforming growth factor beta isoforms by primary cultures of human breast tumour fibroblasts *in vitro* and their modulation by tamoxifen. *Br. J. Cancer*, **74**, 352-358.

BERTHON P., PANCINO G., DE CREMOUX P., ROSETO A., GESPACH C., CALVO F., 1992. Characterization of normal breast epithelial cells in primary cultures : differentiation and growth factor receptor studies. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **28a**, 716-724.

BESSER D., PRESTA M., NAGAMINE Y., 1995. Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth and Differentiation*, **6**, 1009-1017.

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. **13b**) 152.

BLASI F., 1993. Urokinase and urokinase receptor : a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bio Essays*, **15**, 105-111.

BLENIS J., 1993. Signal transduction via MAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5889-5892.

BLOMHOFF R., GREEN M.H., BERG T., NORUM K.R., 1990. Transport and storage of vitamin A. *Science*, **250**, 399-404.

BLUMBERG B., MANGELSDORF D.J., DYCK J.A., BITTNER D.A., EVANS R.M., DE ROBERTIS E.M., 1992. Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell. Families of retinoid "X" receptors and retinoic acid receptors in the Xenopus egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2321-2325.

BOHMER 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. *Dev. Biol.*, **145**, 183-187.

BOILLY B., OUDGHIR M., DEUDON E., BOILLY-MARER Y., HONDERMARCK H., 1995. Nerve dependent sulphated glycosaminoglycan synthesis in limb regeneration of the newt Pleurodeles waltl. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **204**, 509-512.

BOISTEAU O., LIEUBEAU B., BARBIEUX I., CORDEL S., MEFLAH K., GREGOIRE M., 1996. Induction de l'apoptose, *in vitro* et *in vivo*, sur cellules tumorales coliques de rat après traitement par le butyrate de sodium. *Bull. Cancer*, **83**, 197-204.

BOMBARA C., IGNOTZ R.A., 1992. TGF-Beta inhibits proliferation of and promotes differentiation of human promonocytic leukemia cells. *J. Cell. Physiol.*, **153**, 30-37.

BONEWALD L.F., KESTER M.B., SCHARWTZ Z., SWAIN L.D., KHARE A., JOHNSON T.L., LEACH R.J., BOYAN B.D., 1992. Effects of combining transforming growth factor ß and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on differentiation of a human osteosarcoma (MG-63). *J. Biol. Chem.*, **267**, 8943-8949.

BOUCHE 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 Go→G1 transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6770-6774.

BOUCHE G., BALDIN V., BELENGER P., PRATS H., ALMARIC F., 1994. Activation of rDNA transcription by FGF-2 : key role of protein kinase CKII. *Cell. Mol. Biol. Res.*, **40**, 547-554.

BOULLE N., JONES E.M., AUGUSTE P., BAIRD A. , 1995. Adenosine diphosphate ribosylation of fibroblast growth factor-2. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 767-775.

BOYD J., KAUFMAN D., 1990. Expression of transforming growth factor ß1 by human endometrial carcinoma cells lines : inverse correlation with effects on growth rate and morphology. *Cancer Res.*, **50**, 3394-3399.

BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

BRAND N., PETKOVICH M., KRUST A., CHAMBON P., DE THE H., MARCHIO A., TIOLLAIS P., DEJEAN A., 1988. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, **332**, 850-853.

BRAUER P.R., KELLER K.M., KELLER J.M., 1990. Concurrent reduction in the sulfation of heparan sulfate and basement membrane assembly in a cell model system. *Development*, **110**, 805-813.

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.

BREITMAN T.R., KEENE B.R., HEMMI H., 1983. Retinoic acid-induced differentiation of fresh human leukemia cells and the human myelomonocytic leukemia cell lines HL 60, U 937 and THP-1. *Cancer Surveys*, **2**, 263-291.

BRIOZZO P., BADET J., CAPONY F., PIRI I., MONTCOURRIER P., BARRITAULT D., ROCHEFORT H., 1991. MCF-7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. *Exp. Cell Res.*, **194**, 252-259.

BROWN P.D., LEVY A.T., MARGULIES I.M.K., LIOTTA L.A., STETLER-STEVENSON W.G., 1990 (a). Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumoregenic cell lines. *Cancer Res.*, **50**, 6184-6191.

BROWN P.D., WAKEFIELD L.M., LEVINSON A.D., SPORN M.B., 1990 (b). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta 1, 2, and 3. *Growth factors*, **3**, 35-43.

BRUNNER G., GABRILOVE J., RIFKIN D.B., WILSON E.T., 1991. Phospholipase C release basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biogically active complex with a phosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell Biol.* , **114**, 1275-1283.

BRUNNER G., METZ C., NGUYEN H., GABRILOVE J., PATEL S., DAVITZ M.A., RIFKIN D.B., WILSON E.T., 1994. An endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D releases basic fibroblast growth factor-heparan sulfate proteoglycan complexes from human bone marrow cultures. *Blood*, **83**, 2115-2125.

BUCKLEY-STURROCK A., WOODWARD S.C., SENIOR R.M., GRIFFIN G.L., KLAGSBRUN M., DAVIDSON J.M., 1989. Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J. Cell. Physiol.*, **138**, 70-78.

BUNTROCK P., BUNTROCK M., MARX I., KRANZ D., JENTZSCH K.D., EDER G., 1984. Stimulation of wound healing using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. *Exp. Pathol.*, **26**, 247-254.

BURGER P.E., DOWDLE E.B., LUKEY P.T., WILSON E.L., 1994. Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor ß-mediated erythroid differentiation in K562 cells. *Blood*, **83**, 1808-1812.

BURGESS W.H., MACIAG T., 1989. The heparin-binding fibroblast growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 575-606.

BURGESS W.H., DIONNE C.A., KAPLOW J., 1990 (a). Characterization and cDNA cloning of phospholipase Cγ, a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4770-4777.

BURGESS W.H., SHAHEEN A.M., RAVERA M., JAYE M., DONOHUE P.J., WINKLES J.A., 1990 (b). Possible dissociation of the heparin binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic-fibroblast) growth factor-1 from its receptor binding activities by site directed mutagenesis of a single lysine residues. *J. Cell Biol.* , **111**, 2129-2138.

BURKITT H.G., YOUNG B., HEATH J.W., 1995. Histologie fonctionnelle Wheater. Eds Arnette Blackwell (3 ième édition).

BURRUS L.W., ZUBZER E., LUEDDECKE B.A., OLWIN B.B., 1992. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5600-5609.

BUTLER W.B., FONTANA J.A., 1992. Response to retinoic acid of tamoxifen sensitive and resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.*, **52**, 6164-6167.

BUTTA A., McLENNAN K., FLANDERS K.C., SACKS N.P.M., SMITH I., McKINNA A., DOWSETT M., WAKEFIELD L.M., SPORN M.B., BAUM M., COLLETTA A., 1992. Induction of transforming growth factor ß1 in human breast cancer *in vivo* following Tamoxifen treatment. *Cancer Res.*, **52**, 4261-4264.

CAILLEAU R., YOUNG R., OLIVE M., REEVES W.J., 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 661-674.

CALVERT R.J., SATCHITHANANDAM S., 1992. Effects of graded levels of high-molecular-weight carrageenan on colonic mucosal thymidine kinase activity. *Nutrition*, **8**, 252-257.

CAMPBELL I.K., WOJTA J., NOVAK U., HAMILTON J.A., 1994. Cytokine modulation of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes. Down-regulation by tumor necrosis factor alpha and up-regulation by transforming growth factor-ß and basic fibroblast growth factor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1226**, 277-285.

CAMPBELL J.S., WENDEROTH M.P., HAUSCHKA S.D., KREBS E.G., 1995. Differential activation of mitogen-activated protein kinase in reponse to basic fibroblast growth factor in skeketal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **92**, 870-874.

CAMPBELL M.A., HANDLEY C.J., 1987. The effects of retinoic acid on proteoglycan turn over in bovine articular cartilage cultures. *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**, 143-155.

CAO H.J., HOGG M.G., MARTINO L.J., SMITH T.J., 1995. Transforming growth factor-beta induces plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human orbital fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**, 1411-1419.

CARTER C.A., POGRIBNY M., DAVIDSON A., JACKSON C.D., McGARRITY L.J., MORRIS S.M., 1996. Effects of retinoic acid on cell differentiation and reversion toward normal in human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells. *Anticancer Research.*, **16**, 17-24.

CATTINI P.A., NICKEL B., BOCK M., KARDAMI E., 1991. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in growing and growth-inhibited placental cells. A possible role for bFGF in placental cell development. *Placenta,* **12**, 341-352.

CAUX F., TIMAR J., VIGNY M., MOCZAR M., 1992. Heparan sulfate synthetized by human melanoma cell variants. *Cancer J.*, **5**, 111-117.

CHAKRABARTY S., 1992. Regulation of human colon-carcinoma cell adhesion to extracellular matrix by transforming growth factor ß1. *Int. J. Cancer*, **50**, 968-973.

CHAKRABARTY S., HUANG S., 1995. Role of protein kinase Cα in the induction of carcinoembryonic antigen by transforming growth factor ß1. *J. Cell. Physiol.*, **164**, 148-153.

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.

CHANDRASEKARAN E.V., DAVIDSON E.A., 1979. Glycosaminoglycans of normal and malignant cultured human mammary cells. *Cancer Res.*, **39**, 870-880.

CHAROLLAIS R-H., BUQUET C., MESTER J., 1990. Butyrate blocks the accumulation of CDC2 mRNA in late G1 phase but inhibits both the early and late G1 progression in chemically transformed mouse fibroblasts BP-A31. *J. Cell. Physiol.*, **145**, 46-52.

CHEIFETZ S., ANDRES J.L., MASSAGUE J., 1988. The transforming growth factor-ß receptor III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16984-16991.

CHEIFETZ S., BELLON T., CALES C., VERA S., BERNABEU C., MASSAGUE J., LETARTE M., 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-ß receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19027-19030.

CHEN Z.X., XUE Y.Q., ZHANG R., TAO R.F., XIA X.M., LI C., WANG W., ZU W.Y., YAO X.Z., LING B.J., 1991. A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, **78**, 1413-1419.

CHODAK G.W., SHING Y., BORGE M., JUDGE S.M., KLAGSBRUN M., 1986. Presence of heparin binding growth factor in mouse bladder tumors and in urine from mice with bladder cancer. *Cancer Res.*, **46**, 5507-5510.

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.

CLEGG C.H., LINKHLART 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.

COLEMAN S., SILBERSTEIN G.B., DANIEL C.W., 1988. Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland : evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev. Biol.*, **127**, 304-315.

COLLETTA A.A., WAKEFIELD L.M., HOWELL F.V., VAN ROOZENDAAL K.E.P., DANIELPOUR D., EBBS S.R., SPORN M.B, BAUM M., 1990. Anti-oestrogens induce the secretion of active transforming growth factor-ß from human fetal fibroblasts. *Br. J. Cancer*, **62**, 405-409.

COLLETTA A.A., WAKEFIELD L.M., HOWELL F.V., DANIELPOUR D., BAUM M., SPORN M.B., 1991. The growth inhibition of human breast cancer cells by a novel synthetic progestin involves the induction of transforming growth factor beta. *J. Clin. Invest.*, **87**, 277-283.

COSGROVE D.E., COX G.S., 1990. Effects of sodium butyrate and 5-Azacytidine on DNA methylation in human tumor cell lines : variable response to drug treatment and withdrawal. *Biochem. Biophys. Acta*, **1087**, 80-86.

COULIER F., PIZETTE S., BATOZ M., BIRNBAUM D., 1992. Les récepteurs de facteurs de croissance des fibroblastes : une famille qui s'agrandit. *Medecine/Sciences*, **8**, 811-888.

COULIER F., BIRNBAUM D., GOlDFARB M., LOPEZ-FERBER M., LOVEC H., 1997. Les FGF : une famille en croissance. *Médecine Science*, **3**, 392-396.

CUI W., FOWLIS D.J., BRYSON S., DUFFIE E., IRELAND H., BALMAIN A., AKHURST R.J., 1996. TGFß1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*, **86**, 531-542.

CZUBAYKO F., SMITH R.V., CHUNG H.C., WELLSTEIN A., 1994. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J. Biol. Chem.*, **269**, 28243-28248.

DALY R.J., KING R.J.B., DARBRE P.D., 1988. Interaction of growth factors during progression toward steroid independance in T47D human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.*, **43**, 199-211.

DAMSTRUP L., RYGAARD K., SPANG-THOMSEN M., POULSON H.S., 1993. Expression of transforming growth factor beta (TGF beta) receptors and expression of TGF beta 1, TGF beta 2, TGF beta 3 in human small cell lung cancer cell lines. *Brit. J. Cancer*, **67**, 1015-1021.

DANIEL C.W., SILBERSTEIN G.B., VAN HORN K., STRICKLAND P., ROBINSON S., 1989. TGFß1-induced inhibition of mouse ductal growth : developmental specificity and characterization. *Dev. Biol.*, **135**, 20-30.

DANIEL C.W., ROBINSON S.D., 1992. Regulation of mammary growth and function by TGF-β. *Molec. Reprod. Dev.*, **32**, 145-151.

DANIELPOUR D., 1996. Induction of transforming growth factor-ß autocrine activity by all-trans-retinoic acid and 1α, 25- dihydroxyvitamin D_3 in NRP-152 rat prostatic epithelial cells. *J. cell. Physiol.*, **166**, 231-239.

DANIELSEN N., PETTMANN 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.

DANO K., ANDREASEN P.A., GRONDHAL-HANSEN J., KRISTENSEN P., NIELSEN L.S., SKRIVER L., 1985. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.*, **44**, 139-266.

DARMON M., 1990. The nuclear receptors of retinoic acid. *J. Lipid Mediators*, **2**, 247-256.

DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., XUE S.B., MELAMED M.R., 1981. Effect of n-butyrate on cell cycle progression and *in situ* chromatin structure of L120 cells. *Exp. Cell Res.*, **136**, 279-293.

DAVID G., BERNFIELD M., 1982. Defective basal lamina formation by transformed mammary epithelial cells : a reduced effect of collagen on basal lamina (heparan sulfate rich) proteoglycan degradation. *J. Cell. Physiol.*, **110**, 56-62.

DAVID G., 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.

DE FAZIO A., CHIEW Y.E., DONOGHUE C., LEE C.S., SUTHERLAND R.L., 1992. Effect of sodium butyrate on estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in human breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18008-18012.

DE LUCA L.M., 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.*, **5**, 2924-2933.

DE THE H., MARCHIO A., TIOLLAIS P., DEJEAN A., 1987. A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature*, **330**, 667-670.

DELEHEDDE M., BOILLY B., HONDERMARCK H., 1995 (a). Differential responsiveness of human breast cancer cells to basic fibroblast growth factor . A cell kinetics study. *Oncology Res.*, **7**, 399-405.

DELEHEDDE M., DEUDON E., BOILLY B., HONDERMARCK H., 1995 (b). Evidence of basic fibroblast growth factor (bFGF) binding-proteoglycans in bFGF responsive and unresponsive breast cancer cells. *Anticancer Research*, **15**, 1636.(Résumé)

DELEHEDDE M., DEUDON E., BOILLY B., HONDERMARCK H., 1996. Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity. *Exp. Cell Res.*, **229**, 398-406.

DELEHEDDE M., DEUDON E., BOILLY B., HONDERMARCK H., 1997. Production of sulfated proteoglycans by human breast cancer cell lines. Binding to Fibroblast Growth Factor-2. *J. Cell Biochem.*, **64**, 605-617.

DELL K.R., WILLIAMS L.T., 1992. A novel form of fibroblast growth factor receptor-2. Alternative splicing of the 3rd immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21225-21229.

DELLI BOVI P., CURATOLA A.M., KERN F.G., GRECO A., ITTMAN M., BASILICO C., 1987. An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family. *Cell.*, **50**, 729-737.

DEMIRPENCE E., PONS M., BALAGUER P., GAGNE D., 1992. Study of an antiestrogenic effect of retinoic acid in MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **183**, 100-106.

DEMIRPENCE E., BALAGUER P., TROUSSE F., NICOLAS J.C., PONS M., GAGNE D., 1994. Antiestrogenic effects of all-trans-retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in breast cancer cells occur at the estrogen response element level but through different molecular mechanisms. *Cancer Res.*, **54**, 1458-1464.

DENG G., CURRIDEN S.A., WANG S., ROSENBERG S., LOSKUTOFF D., 1996. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J. Cell Biol.*, **134**, 1563-1571.

DESRUISSEAU S., GHAZAROSSIAN-RAGNI E., CHINOT O., MARTIN P.M., 1996. Divergent effect of TGFß1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, **66**, 796-801.

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. *Int. J. Oncol.*, **5**, 1375-1378.

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.

DOCTROW S.R., FOLKMAN J., 1987. Proteine kinase C activators suppress stimulation of capillary endothelial cell growth by angiogenic endothelial mitogens. *J. Cell Biol*, **104**, 679-687.

DODGE G.R., KOVALSKY I., HASSELL J.R., IOZZO R.V., 1990. Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18023-18029.

DONG-LE BOURHIS X., BERTHOIS Y., MILLOT G., DEGEORGES A., SYLVI M., MARTIN P.M., CALVO F., 1997. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast-cancer cell lines in co-culture. *Int. J. Cancer*, **71**, 42-48.

DONO R., ZELLER R., 1994. Cell-type specific nuclear translocation of fibroblast growth-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. *Dev. Biol.*, **163**, 316-330.

DOW K.E., RIOPELLE R.J., 1994. Modulation of neurite promoting proteoglycans by neuronal differentiation. *Dev. Brain Res.*, **80**, 175-182.

DUAN D.S.R., WERNER S. WILLIAMS L.T., 1992. A naturally occuring secreted form of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 binds basic FGF in preference over acidic FGF. *J. Biol. Chem.* , **267**, 16076-16080.

DUCLOS M., HOUDEBINE L.M., DJIANE J., 1989. Comparison of insulin-like growth factor I and insulin effects on prolactin-induced lactogenesis in the rabbit mammary gland *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **65**, 129-134.

DUFFY M.J., REILLEY D., O'SULLIVAN C., O'HIGGINS N., FENNELLY J.J., ANDREASEN P., 1990. Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.*, **50**, 6827-6829.

DUFFY M.J., 1992. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin. exp. Metastasis.*, **10**, 145-155.

EDERY 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.

EGLETIS M.R., SHERMAN M.I., 1983. Murine embryonal carcinoma cells differentiate *in vitro* in response to retinol. *Exp. Cell Res.*, **146**, 289-296.

EISENMAN 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 Research*, **15**, 1-8.

ELENIUS K., JALKANEN M., 1994. Functions of the syndecans. A family of cell surface proteoglycans. *J. Cell. Science,* **107**, 2975-2982.

EMERMAN J.T., JONES N., FIELDER E.E., 1988. Glycosaminoglycan accumulation by normal and malignant human mammary epithelial cells in primary culture. *Biochem. Cell. Biol.*, **66**, 309-318.

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.

ERVIN P.R.J., KAMINSKI M.S., CODY R.L., WICHA M.S., 1989. Production of mammastatin, a tissue-specific growth inhibitor, by normal human mammary cells. *Science*, **244**, 1585-1587.

ESCH F., BAIRD A., LING N., UENO N., HILL F., DENOROY R., KLEPPER R., GOSPODAROWICZ D., BOHLEN P., GUILLEMIN R., 1985. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6507-6411.

ESPIE M., GORINS A., 1995. Le sein. Paris: Eska

ETHEIR S. P., VAN DE VELDE R.M., 1990. Secretion of a TGFß-like growth inhibitor by normal rat mammary epithelial cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, **142**, 15-20.

EVERS J.L., PATEL J., MADEJA J.M., SCHNEIDER S.L., HOBIKA G.H., CAMIOLO S.M., MARKUS G., 1982. Plasminogen activator activity and composition in human breast cancer. *Cancer Res.*, **42**, 219-226.

EWEN M.E., SLUSS H.K., WHITEHOUSE L.L., LIVINGSTON D.M., 1993. TGFß inhibition of cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*, **74**, 1009-1020.

FAASSEN A.E., SCHRAGER J.A., KLEIN D.J., OEGEMA T.R., COUCHMAN J.R., 1992. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J. Cell Biol.*, **116**, 521-531.

FALCONE D.J., McCAFFREY T.A., HAIMOVITZ-FRIEDMAN A., GARCIA M., 1993. Transforming growth factor-ß1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.*, **155**, 595-605.

FANTL W.J., JOHNSON D.E., WILLIAMS L.T., 1993. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 453-481.

FEIGE J.J., BAIRD A., 1989. Basic fibroblast growth factor is a substrat for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3174-3178.

FEIGE J.J., QUIRIN N., SOUCHELNITSKIY S., 1996. TGFß, un peptide biologique sous contrôle : formes latentes et mécanismes d'activation . *Médecine Science*, **12**, 929-936.

FERNANDEZ-POL J.A., KLOS D.J., GRANT G.A., 1986. Purification and biological properties of type ß transforming growth factor from mouse transformed cells. *Cancer Res.*, **46**, 5153-5161.

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., RUDLAND P.S., SMITH J. A., 1992. Rat mammary myoepithelial-like cells in culture possess kineticatlly distinct low-affinity receptors for fibroblast growth factor that modulate growth stimulatory responses. *Growth factors*, **7**, 27-39.

FERNIG D. G., BARRACLOUGH R., KE Y., WILKINSON M. C., RUDLAND P.S., 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.

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.

FILMUS J., KERBEL R., 1993. Development of resistance mechanisms to the growth-inhibitory effects of transforming growth factor-ß during tumor progression. *Curr. Opin. Oncol.*, **5**, 123-129.

FINCH P.W., RUBIN J.S., MIKI T., AARONSON S.A., 1989. Human KGF is FGF related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, **241**, 752-755.

FINE A., GOLDSTEIN R.H., 1987. The effect of transforming growth factor-ß on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **262**, 3897-3902.

FIORELLI G., BALLOCK R.T., WAKEFIELD L.M., SPORN M.B., GORI F., MASI L., FREDIANI U., TANINI A., BERNABEL P.A., BRANDI M.L., 1994. Role for autocrine TGF-ß1 in regulating differentiation of a human leukemic cell line toward osteoclast-like cells. *J. Cell. Physiol.*, **160**, 482-490.

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.

FLAUMENHAFT R., MOSCATELLI D., RIFKIN D.B., 1990. Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.*, **111**, 1651-1659.

FLAUMENHAFT R., ABE M., MIGNATTI P., RIFKIN D.B., 1992. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells : regulation of plasminogen activator activity. *J. Cell Biol.*, **118**, 901-909.

FLAUMENHAFT R., ABE M., SATO Y., MIYAZONO K., HARPEL G.J., HELDIN C.H., RIFKIN D.B., 1993. Role of latent TGF-ß binding protein in the activation of latent TGF-ß by co cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **120**, 995-1002.

FLORKIEWICZ R.Z., SOMMER A., 1989. The human bFGF gene encodes four polypeptides : three initiate translation from non ATG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3978-3981.

FOLKMAN J., KLAGSBRUN M., 1987. Angiogenic factors. *Science*, **235**, 442-447.

FONTANA J.A., MIRANDA D., BURROWS-MEZU A., 1987. Retinoic acid inhibition of human breast carcinoma proliferation is accompanied by inhibition of the synthesis of a Mr 39, 000 protein. *Cancer Res.*, **50**, 1977-1982.

FONTANA J.A., BURROWS-MEZU A., COOPER B.N., MIRANDA D., 1990. Retinoid modulation of estradiol-stimulated growth and of protein synthesis and secretion in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, **50**, 1997-2002.

FONTANA J.A., BURROWS-MEZU A., CLEMMONS D.R., LEROITH D., 1991. Retinoid modulation of insulin-like growth factor-binding proteins and inhibition of breast carcinoma proliferation. *Endocrinology*, **128**, 1115-1122.

FORSYTH I.A., 1989. Growth factors in mammary gland function. *J. Reprod. Fert.*, **85**, 759-770.

FOURTANIER A.Y., COURTY J., MULLER E., COURTOIS Y., PRUNIERAS M., BARRITAULT D., 1986. Eye-derived growth factor isolated from bovine retina and used for epidermal woung healing *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 76-80.

FOX G.M., SCHIFFER S.G., ROHDE M.F., TSAI L.B., BANKS A.R., ARAKAWA T., 1988. Production, biological activity and structure of recombinant basic fibroblast growth factor and an analog with cysteine replaced by serine. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18452-18458.

FRAKER L.D., HALTER S.A., FORBES J.T., 1984. Growth inhibition by retinol of a human breast carcinoma cell line *in vitro* and in athymic mice. *Cancer Res.*, **44**, 5757-5763.

FREEMAN J.W., MATTINGLY C.A., STRODEL W.E., 1995. Increased tumorigenicity in the human pancreatic cell line MIA PaCa-2 is associated with an aberrant regulation of an IGF-1 autocrine loop and lack of expression of the TGFß type RII receptor. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 155-163.

FUJITA H., OHTA M., KAWASAKI T., ITOH N., 1991. The expression of two isoforms of the human fibroblast growth factor receptor (flg) is directed by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 946-951.

FUNDERBURG F.M., MARKWALD R.R., 1986. Conditioning of native substrates by chondroitin sulfate proteoglycans during cardiac mesenchymal cell migration. *J. Cell Biol.*, **103**, 2475-2487.

FYNAN T.M., REISS M., 1993. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-ß and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncogenesis*, **4**, 493-540.

GABELMAN B.M., EMERMAN J.T., 1992. Effets 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., LYON M., STEWARD W.P., 1986. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.*, **236**, 313-325.

GALLAGHER J.T., TURNBULL J.E., LYON M. 1992. Patterns of sulphation in heparan sulphate : polymorphism base on a common stuctural theme. *Int. J. Biochem.*, **24**, 553-560.

GALLAGHER J.T., 1994. Heparan sulfate as membrane receptor for fibroblast growth factors. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **32**, 239-247

GALZIE Z., FERNIG D.G., SMITH J.A., POSTON G.J., KINSELLA A.R., 1997. Invasion of human colorectal carcinoma cells is promoted by endogenous basic fibroblast growth factor. *Int. J. Cancer*, **71**, 390-395.

GANNOUN-ZAKI L., PIERI I., BADET J., MOENNER M., BARRITAULT D., 1991. Internalisation of basic fibroblast growth factors by chinese hamster lung fibroblast cells : involvement of several pathways. *Exp. Cell Res.*, **197**, 272-279.

GAYLIS F.D., KEER H.N., WILSON M.J., KWAAN H.C., SINHA A.A., KOZLOWSKI J.M., 1989. Plasminogen activators in human prostate cancer cell lines and tumors. Correlation with aggressive phenotype. *J. Urol.*, **142**, 193-198.

GEISER A.G., BURMESTER J.A., WEBBINK R., ROBERTS A.B., SPORN M.B., 1992. Inhibition of growth by transforming growth factor-ß following fusion of two nonresponsive human carcinoma cell lines. *J. Biol.Chem.*, **267**, 2588-2593.

GENG Y., WEINBERG R.A., 1993. Transforming growth factor ß effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **90**, 10315-10319.

GENTRY L.E., WEBB N.R., LIM G.J., BRUNNER A.M., RANCHALIS J.E., TWARDZIK D.R., LIOUBIN M.N., MARQUARDT H., PURCHIO A.F., 1987. Type I transforming growth factor beta : amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3418-3427.

GERWIN B.I., KESKI-OJA J., SEDDON M., LECHNER J.F., HARRIS C.C., 1990. TGF-beta 1 modulation of urokinase and PAI-1 expression in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **259**, L262-269.

GIGUERE VS., ONG E.S., SEGUI P., EVANS R.M., 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, **330**, 624-629.

GIGUERE V., LYN S., YIP P., SIU C.H., AMIN S., 1990 (a). Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6233-6237.

GIGUERE V., SHAGO M., ZIRNGIBL R., TATE P., ROSSANT J., VARMUZA S., 1990 (b). Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2335-2340.

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.

GLICK A.B., FLANDERS K.C., DANIELPOUR D., YUSPA S.H., SPORN M.B., 1989. Retinoic acid induces transforming growth factor-ß2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regul.*, **1**, 87-97.

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 β1, in the human mammary gland. *Cancer Res.*, **51**, 4685-4692.

GONATAS J.O., MOURELATOS Z., STIEBER A., LANE W.S., BROSIOS J., GONATAS N.K., 1995. MG-160, a membrane sialoglycoprotein of the medial cisternae of the rat golgi apparatus, binds basic fibroblast growth factor and exhibits a high level of sequence identity to a chicken fibroblast growth factor receptor. *J. Cell Sci.*, **108**, 457-467.

GORSCH S.M., MEMOLI V.A., STUKEL T.A., GOLD L.I., ARRICK B.A., 1992. Imminohistochemical staining for transforming growth factor ß1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.*, **52**, 6949-6952.

GOSPODAROWICZ D., 1975. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2515-2520.

GOSPODAROWICZ D., GREENBURG G., 1979. The effects of epidermal and fibroblast growth factors on the repair of corneal endothelial wounds in bovine corneas maintained in organ culture. *Exp. Eye Res.*, **28**, 147-157.

GOSPODAROWICZ D., BAIRD A., CHENG J., LUI G.M., ESCH F., BOHLEN P., 1986. Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland : physiochemical and biological characterization. *Endocrinology*, **118**, 82-90.

GOSPODAROWICZ D., CHENG J., 1986. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell. Physiol.*, **128**, 475-484.

GOSPODAROWICZ D., FERRARA N., SCHWEIGERER L., NEUFELD G., 1987. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Rev.*, **8**, 95-114.

GOTTARDIS M.M., LAMPH W.W., SHALINSKY D.R., WELLSTEIN A., HEYMAN R.A., 1996. The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **38**, 85-96.

GRAHAM K.A., BUICK R.N., 1988. Sodium butyrate induces differentiation in breast cancer cell lines expressing the estrogen receptor. *J. Cell. Physiol.*, **136**, 63-71.

GRANDE J., MELDER D., ZINSMEISTER A., KILLEN P., 1993. Transforming growth factor-ß1 induces collagen IV gene expression in NIH-3T3 cells. *Lab. Invest.*, **69**, 387-395.

GRASSEL S., COHEN I.R., MURDOCH A.D., EICHSTETTER I., IOZZO R.V., 1995. The proteoglycan perlecan is expressed in the erythroleukemia cell line K562 and is upregulated by sodium butyrate and phorbol ester. *Mol. Cell. Biochem.*, **145**, 61-68.

GREEN S., CHAMBON P., 1988. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, **4**, 309-314.

GRILLIER I., 1994. Pharmacologie moléculaire des rétinoïdes : Etudes des relations structure-activité de nouveaux rétinoïdes de synthèse. Thèse LILLE.

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.

GROVER A., EDWARDS S.A., BOURDON M., ADAMSON E.D., 1987. Proteoglycan-19, laminin and collagen type IV production is correlated with the levels of mRNA in F9 cell aggregates differentiating in the presence or absence of cyclic AMP. *Differentiation*, **36**, 138-144.

GUALANDRIS A., URBINATI C., RUSNATI M., ZICHE M., PRESTA M., 1994. Interaction of high molecular-weight basic fibroblast growth factor with endothelium : biological activity and intercellular fate of human recombinant Mr 24.000 bFGF. *J. Cell. Physiol.*, **161**, 149-159.

GUDAS L.J., 1992. Retinoids, retinoid-response genes, cell differentiation and cancer. *Cell growth and differentiation*, **3**, 655-662.

GUERRIN M., PRATS H., MAZARS P., VALETTE A., 1992. Antiproliferative effect of phorbol esters on MCF-7 human breast adenocarcinoma cells : relationship with enhanced expression of transforming growth-factor-ß1. *Biochem. Biophys. Acta*, **1137**, 116-120.

GUILBAULD N.F., GAS N., DUPONT M.A., VALETTE A., 1990. Effects of differentiation-inducing agents on maturation of human MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.*, **145**, 162-172.

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.

HAFEZ M.M., HSU S., YAN Z., WINAWER S., FRIEDMAN E., 1992. Two roles for transforming growth factor ß1 in colon enterocytic cell differentiation. *Cell Growth and Differentiation*, **3**, 753-762.

HAGUE A., MANNING A.M., VAN DER STAPPEN J.W.J., PARASKEVA C., 1993 (a). Escape from negative regulation of growth by transforming growth factor ß and from the induction of apoptosis by the dietary agent sodium butyrate may be important in colorectal carcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **12**, 227-237.

HAGUE A., MANNING A.M., HANLON K.A., HUSCHTSCHA L.I., HART D., PARASKEVA C., 1993 (b). Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway : implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int. J. Cancer*, **55**, 498-505.

HALABAN R., KWON B.S., GHOSH S., DELLI BOVI P., BAIRD A., 1988. bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.*, **3**, 177-186.

HALTER S.A., WINNIER A.R., ARTEAGA C.L., 1993. Pretreatment with vitamin A inhibits transforming growth factor alpha stimulation of human mammary carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.*, **156**, 80-87.

HAMILTON J.A., PICCOLI D.S., LEIZER T., BUTLER D.M., CROATTO M., ROYSTON K.M., 1991. Transforming growth factor ß stimulates urokinase-type plasminogen activator and DNA synthesis, but not prostaglandin E2 production, in human synovial fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7180-7184.

HAMILTON J.A., WOJTA J., GALLICHIO M., McGRATH K., FILONZI E.L., 1993 (a). Contrasting effects of transforming growth factor-beta and IL-1 on the regulation of plasminogen activator inhibitors in human synovial fibroblasts. *J. Immunol.*, **151**, 5154-5161.

HAMILTON J.A., WHITTY G.A., WOJTA J., GALLICHIO M., MC GRATH K., IANCHES G., 1993 (b). Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 levels in human monocytes. *Cell Immunol.*, **152**, 7-17.

HANNON K., KUDLA A.J., McAVOY M.J., CLASE K.L., OLWIN B.B., 1996. Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development trrough autocrine and paracrine mechanisms. *J. Cell Biol.*, **132**, 1151-1159.

HARPEL J.G., METZ C.N., KOJIMA S., RIFKIN D.B., 1992. Control of transforming growth factor-ß activity : latency vs. activation. *Prog. Growth Factor Res.*, **4**, 321-335.

HARPER J.W., ADAMI G.R., WEI N., KEYOMARSI K., ELLEDGE S.J., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.

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.

HASEGAWA K., WANG Z., INAGAKI M., CARR B.I., 1995. Characterization of a human hepatoma cell line with acquired resistance to growth inhibition by transforming growth factor beta 1 (TGF-ß1). *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **31**, 55-61.

HASLAM S.Z., 1987. Role of sex steroid hormones in normal mammary gland function. In: Neville M.C., Daniel C.W. (eds). *The mammay gland : development, regulation, and function. Plenum Press, New York*, pages 499-533.

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.

HAYMAN E.G., OLDBERG A., MARTIN G.R., RUOSLAHTI E., 1982. Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. *J. Cell Biol.*, **94**, 28-35.

HEATH W.F., CANTRELL A.S., MAYNE N.G., JASKUNAS S.R., 1991. Mutations in the heparin binding domains of human basic fibroblast growth factor alter its biological activity. *Biochemistry*, **30**, 5608-5615.

HENKE C.A., ROONGTA U., MICKELSON D.J., KNUTSON J.R., McCARTHY J.B., 1996. CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2541-2552.

HEREDIA A., VILLENA J., ROMARIS M., MOLIST A., BASSOLS A., 1996. Transforming growth factor ß1 increases the synthesis and shedding of the melanoma-specific proteoglycan in human melanoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 198-206.

HEYMAN R.A., MANGELSDORF D.J., DYCK J.A., STEIN R.B., EICHELE G., EVANS R.M., THALLER C., 1992. 9-cis-retinoic acid is a high-affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, **68**, 397-406.

HICKS K., FRIEDMAN B.A., RICH ROSNER M., 1989. Basic and acid fibroblast growth factors modulate the epidermal growth factor receptor by a protein kinase C-independant pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 796-803.

HICKS D., COURTOIS Y., 1992. Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. *J. Neurosci.*, **12**, 2022-2033.

HILL D.L., 1992. Retinoids and cancer prevention. *Annu. Rev. Nutr.*, **12**, 161-181.

HO S.B., YAN P., DAHIYA R., NEUSCHWANDER-TETRI B.A., BASBAUM C., KIM Y.S., 1994. Stable differentiation of a human colon adenocarcinoma cell line by sodium butyrate is associated with multidrug resistance. *J. Cell. Physiol.*, **160**, 213-226.

HOFFMAN R., 1993. Carrageenans inhibit growth-factor binding. *Biochem. J.*, **289**, 331-334.

HOFFMAN R., SYKES D., 1993. Inhibition of binding of basic fibroblast growth factor to low and high affinity receptors by carrageenans. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 2348-2351.

HOFFMAN R., BURNS W.W., PAPER D.H., 1995. Selective inhibition of cell proliferation and DNA synthesis by the polysulphated carbohydrate ι-carrageenan. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **36**, 325-334.

HONDERMARCK H., COURTY J., BOILLY B., THOMAS D., 1990 (a). Distribution of intravenously administred acidic and basic fibroblast growth factors in the mouse. *Experientia*, **46**, 973-974.

HONDERMARCK H., COURTY J., LEDOUX D., BLANCKEART V., BARRITAULT D., BOILLY B., 1990 (b). 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., BARRITAULT D., BOILLY B., 1992 (a). High and low affinity membrane binding sites for fibroblast growth factors in the developing chick brain. *Neuroscience Letters*, **134**, 247-248.

HONDERMARCK H., DEUDON E., BOILLY B., 1992 (b). Embryonic brain-derived heparan sulfate inhibits cellular membrane binding and biological activity of basic fibroblast growth factor. *Dev. Brain Res.*, **68**, 247-253.

HONDERMARCK H., McLAUGHLIN C.S., PATTERSON S.D., BRADSHAW R.A., 1994. Early changes in protein synthesis induced by basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, and epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9377-9381.

HOPKINS W.E., FUJII S., SOBEL B.E., 1992. Synergistic induction of plasminogen activator inhibitor type-1 in HEP G2 cells by thrombin and transforming growth factor-beta. *Blood*, **79**, 75-81.

HORWITZ K.B., ZAVA D.T., THILAGAR A.K., JENSEN E.M., Mc GUIRE W.L., 1978. Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, **38**, 2434-2437.

HOSOBUCHI M., STAMPFER M.R., 1989. Effects of transforming growth factor-ß on the growth of human mammary epithelial cells in culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 705-713.

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.

HOUDEBINE L.M., 1993. Action des hormones dans le développement de la glande mammaire. *Reproduction humaine et hormones, volume VI-*n°**9**, pages 483 à 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.

HOWE P.H., BASCOM C.C., CUNNINGHAM M.R., LEOF E.B., 1989. Regulation of transforming growth factor ß1 action by multiple transducing pathways : evidence for both G-protein-dependent and -independent signaling. *Cancer Res.*, **49**, 6024-6031.

HUMES H.D., NAKAMURA T., CIESLINSKI D.A., MILLER D., EMMONS R.E., BORDER W.A., 1993. Role of proteoglycans in the effects of TGF-ß1 on renal proximal tubule cells. *Kidney international*, **43**, 575-584.

ICHIJO H., MOMOSE F., MIYAZONO K., 1990. Biological effects and binding properties of transforming growth factor ß on human oral squamous carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, **187**, 263-269.

IGNOTZ R.A., MASSAGUE J., 1986. Transforming growth factor-ß stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4337-4345.

IGNOTZ R.A., ENDO T., MASSAGUE J., 1987. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-ß. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6443-6446.

IMAGAWA W., SPENCER E.M., LARSON L., NANDI S., 1986. Somatomedin-C substitutes for insulin for the growth of mammary epithelial cells from normal virgin mice in serum-free collagen gel cells culture. *Endocrinology*, **119**, 2695-2699.

IMAGAWA W., YANG J., GUZMAN R., NANDI S., 1994 (a). Control of mammary gland development. In : Knobil E and Neill J D, (eds). *The Physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York*, pages 1033 à 1063.

IMAGAWA W., CUNHA G.R., YOUNG P., NANDI S., 1994 (b). Keratinocyte growth factor and acidic fibroblast growth factor are mitogens for primary cultures of mammary epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 1165-1169.

INAGAKI M., MOUSTAKAS A., LIN H.Y., LODISH H.F., CARR B.I., 1993. Growth inhibition by transforming growth factor ß (TGF-ß) type I is restored in TGF-ß-resistant hepatoma cells after expression of TGF-ß receptor type II cDNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**, 5359-5363.

IOZZO R.V., 1988. Proteoglycans and neoplasia. *Cancer Metastasis Rev.*, **7**, 39-50.

IP M.M., SHOEMAKER S.F., DARCY K.M., 1992. Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-α. *Endocrinology*, **130**, 2833-2843.

ISHAI-MICHAELI R., ELDOR A., VLODAVSKY I., 1990. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell Regul.*, **1**, 833-842.

ISHIKAWA O., LE ROY E.C., TROJANOWSKA M., 1990. Mitogenic effect of transforming growth factor-ß1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor α receptors. *J. Cell. Physiol.*, **145**, 181-186.

IWAMOTO M., SHIMAZU A., NAKASHIMA K., SUZUKI F., KATO Y., 1991. Reduction of basic fibroblast growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 461-467.

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., DELAPEYRIERE O., BIRBAUM D., 1994. Expression of the *FGFR1* gene in human breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, **59**, 373-378.

JANICKE F., SCHMITT M., HAFTER R., HOLLRIEDER A., BABIC R., ULM K., GOSSNER K., GRAEFF H., 1990. The urokinase plasminogen activator (uPA) is a potent predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis*, **4**, 69-98.

JANKUN J., MAHER V.M., McCORMICK J.J., 1991. Malignant transformation of human fibroblasts correlates with increased activity of receptor-bound plasminogen activator. *Cancer Res.*, **51**, 1221-1226.

JANKUN J., MERRICK H.W., GOLDBLATT P.J., 1993. Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers. *J. Cell. Biochem.*, **53**, 135-144.

JAYE M., HOWK R., BURGESS W., RICCA G.A., CHIU I.M., RAVERA M., O'BRIEN S.J., MODI W.S., MACIAG T., DROHAN W.N., 1986. Human endothelial cell growth factor : cloning nucleotide sequence and chromosome localization. *Science*, **233**, 541-545.

JAYE M., LYALL R.M., MUDD R., SCHLESSINGER J., SARVER N., 1988. Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J.*, **7**, 963-969.

JAYE M., SCHLESSINGER J., DIONNE C.A., 1992. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase : Molecular analysis and signal transduction. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1135**, 185-199.

JENTZSCH K.D., WELLMITZ G., HEDER G., PETZOLD E., BUNTROCK P., OEHME P., 1980. A bovine brain fraction with fibroblast growth factor activity inducing articular cartilage regeneration in vivo. *Acta Biol. Med. Ger.*, **39**, 967-971.

JETTEN A.M., JETTEN M.E.R., SHAPIRO S.S., POON J.P., 1979. Characterization of the action of retinoids on mouse fibroblast cell lines. *Exp. Cell Res.*, **119**, 289-299.

JETTEN A.M., ANDERSON K., DEAS M.A., KAGECHIKA H., LOTAN R., REARICK J.I., SHUDO K., 1987. New benzoic acid derivatives with retinoid activity : lack of direct correlation between biological activity and binding to cellular retinoic acid binding protein. *Cancer Res.*, **47**, 3523-3527.

JHAPPAN C., GEISER A.G., KORDON E.C., BAGHERI D., HENNIGHAUSEN L., ROBERTS A.B., SMITH G.H., MERLINO G., 1993. Targeting expression of a transforming growth factor ß1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J.*, **12**, 1835-1845.

JIANG Z., SAVONA C., CHAMBAZ E. M., FEIGE JJ., 1992. Transforming growth factor ß1 and adrenocorticotropin differentially regulate the synthesis of adrenocortical cell heparan sulfate proteoglycans and their binding of basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.*, **153**, 266-276.

JING Y., ZHANG J., WAXMAN S., MIRA-Y-LOPEZ R., 1996. Upregulation of cytokeratins 8 and 18 in human breast cancer T47D cells is retinoid-specific and retinoic receptor-dependent. *Differentiation*, **60**, 109-117.

JOHNSON D.E., LEE P.L., LU J., WILLIAMS L.T., 1990. Diverse forms of receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4728-4736.

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.

JOHNSON D.E., WILLIAMS L.T., 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.*, **60**, 1-41.

JOHNSTON C. L., COX H.C., GOMM J.J., COOMBES R.C., 1995 (a). Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30643-30650.

JOHNSTON C.L., COX H.C., GOMM J.J., COOMBES R.C., 1995 (b). 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.

JONES P.A., DE CLERCK Y., 1982. Extracellular destruction by invasive tumor cells. *Cancer Metast. Rev.*, **1**, 289-317.

KADIN M.E., CAVAILLE-COLL M.W., GERTZ R., MASSAGUE J., CHEIFETZ S., GEORGE D., 1994. Loss of receptors for transforming growth factor ß in human T-cell malignancies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**, 6002-6006.

KAHARI V.M., HAKKINEN L., WESTERMARCK J., LARJAVA H., 1995. Differential regulation of decorine and biglycan gene expression by dexamethasone and retinoic acid in cultured human skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 503-508.

KALKHOVEN E., KWAKKENBOS-ISBRUCKER L., MUMMERY C.L., DE LAAT S.W., VAN DEN EIJNDEN-VAN RAAIJ A.J.M., VAN DER SAAG P.T., VAN DER BURG B., 1995 (a). The role of TGF-ß production in growth inhibition of breast-tumor cells by progestins. *Int. J. Cancer*, **61**, 80-86.

KALKHOVEN E., ROELEN B.A.J., DE WINTER J.P., MUMMERY C.L., VAN DEN EIJNDEN-VAN RAAIJ A.J.M., VAN DER SAAG P.T., VAN DER BURG B. 1995 (b). Resistance to transforming growth factor ß and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. *Cell Growth and Differentiation*, **6**, 1151-1161.

KALKHOVEN E., BERALDI E., PANNO M.L., DE WINTER J.P., THIJSSEN J.H.H., VAN DER BURG B., 1996. Growth inhibition by anti-estrogens and progestins in TGF-ß-resistant and -sensitive breast-tumor cells. *Int. J. Cancer*, **65**, 682-687.

KAN M., HUANG J., MANSON P.E., YASIMITSU H., CARR B., McKEEHAN 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**, 7342-7346.

KAN M., WANG F., CRABB J.W., HOU J., McKEEHAN W.L., 1993. An essential heparin binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* , **259**, 1918-1921.

KAPOOR R., PREHM P., 1983. Changes in proteoglycan composition of F9 teratocarcinoma cells upon differentiation. *Eur. J. Biochem.*, **137**, 589-595.

KAREY K.P., SIRBASKU D.A., 1988. Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17ß-estradiol. *Cancer Res.*, **48**, 4083-4092.

KASINATH B.S., 1993. Glomerular endothelial cell proteoglycans-regulation by TGF-ß1. *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 370-377.

KASTNER P., KRUST A., MENDELSOHN C., GARNIER J.M., ZELENT A., LEROY P., STAUB A., CHAMBON P., 1990. Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2700-2704.

KATZ B.Z., ISHAI-MICHAELI R., ZUSMAN T., VLODAVSKY I., WITZ I.P., 1994. Lung colonization by and heparanase activity in *in vitro* transformed 3T3 cells rendered highly tumorigenic by an *in vivo* passage. *Invasion Metastasis*, **14**, 276-289.

KE Y.Q., FERNIG D.J., 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.

KEER H.N., GAYLIS F.D., KOZLOWSKI J.M., KWAAN H.C., BAUER K.D., SHINA A.A., WILSON M.J., 1991. Heterogeneity in plasminogen-activator (PA) levels in human prostate-cancer cell lines : increased PA activity correlates with biologically aggressive behavior. *The Prostate*, **18**, 201-214.

KERN F.G., McLESKEY S.W., ZHANG L., KUREBAYASHI J., LIU Y., DING L.Y.F., KHARBANDA S., CHEN D., MILLER D., CULLEN K., PAIK S., DICKSON R.B., 1994. Transfected MCF-7 cells as a model for breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.*, **31**, 153-165.

KESKI-OJA J., BLASI F., LEOF E.B., MOSES H.L., 1988 (a). Regulation of synthesis and activity of urokinase plasminogen activator in A 549 human lung carcinoma cells by transforming growth factor-ß. *J. Cell Biol.*, **106**, 451-459.

KESKI-OJA J., RAGHOW R., SAWDEY M., LOSKUTOFF D.J., POSTLETHWAITE A.E., KANG A. H., MOSES H L., 1988 (b). Regulation of mRNAs for type-1 plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type-I procollagen by transforming growth factor ß. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3111-3115.

KIEFER M.C., STEPHANS J.C., CRAWFORD K., OKINO K., BARR P.J., 1990. Ligand affinity cloning structure of a cell surface heparan sulfate proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6985-6989.

KIKUCHI K., YAMAKAGE A., SMITH E.A., LEROY E.C., TROJANOWSKA M., 1992. Differential modulation of bFGF receptors by TGF-ß in adult skin, scleroderma skin, and newborn foreskin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, **99**, 201-205.

KIM C.W., GOLDBERGER O.A., GALLO R.L., BERNFIELD M., 1994. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell, tissue, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 797-805.

KIMCHI A., WANG X-F., WEINBERG R.A., CHEIFETZ S., MASSAGUE J., 1988. Absence of TGF-ß receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science*, **240**, 196-199.

KIMELMAN D., ABRAHAM J.A., HAAPARANTA T., PALISI T.M., KIRSCHNER M.W., 1988. The presence of fibroblast growth factor in the frogg egg : its role as a natural mesoderm inducer. *Science*, **242**, 1053-1056.

KING I.A., TABIOWO A., 1981. The effect of all-trans retinoic acid on the synthesis of epidermal cell-surface associated cabohydrates. *Biochem. J.*, **194**, 341-350.

KINGSLEY D.M., 1994. The TGFß superfamily : new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.*, **8**, 133-146.

KINSELLA M.G., WIGHT T.N., 1986. Modulation of sulfate proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration. *J. Cell Biol..*, **102**, 679-687.

KJELLEN L., LINDAHL U., 1991. Proteoglycans : Structure and interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**, 443-475.

KLAGSBRUN M., 1989. The fibroblast growth factor family : structural and biological properties. *Prog. Growth Factor. Res.*, **1**, 207-235.

KLETSAS D., STATHAKOS D., SORRENTINO V., PHILIPSON L., 1995. The growth-inhibitory block of TGF-ß is located close to the G1/S border in the cell cycle. *Exp. Cell Res.*, **217**, 477-483.

KNABBE C., LIPPMAN M.E., WAKEFIELD L.M., FLANDERS K.C., KASID A., DERYNCK R., DICKSON R.B., 1987. Evidence that transforming growth factor-ß is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, **48**, 417-428.

KOBAYASHI H., GOTOH J., SHINOHARA H., MONIWA N., TERAO T., 1994. Inhibition of the metastasis of Lewis lung carcinoma by antibody against urokinase-type plasminogen activator in the experimental and spontaneous metastasis model. *Thromb. Haemostasis*, **71**,474-480.

KOBRIN M.S., YAMANAHA Y., FRIESS H., LOPEZ M., KORC M., 1993. Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res.* , **53**, 4741-4744.

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.

KOFF A., OHTSUKI M., POLYAK K., ROBERTS J.M., MASSAGUE J., 1993. Negative regulation of G1 in mammalian cells : Inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-ß. *Science*, **260**, 536-539.

KOJIMA S., RIFKIN D.B., 1993. Mechanism of retinoid-induced activation of latent transforming growth factor-ß in bovine endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **155**, 323-332.

KOLI K., 1995. Growth inhibitory effects of transforming growth factor ß1 and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on cultured epithelial cells. Relationships to plasminogen activation. Thèse HELSINKI.

KOLSET S.O., IVHED I., OVERVATN A., NILSSON K., 1988. Differentiation-associated changes in the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in induced U-937 cells. *Cancer Res.*, **48**, 6103-6108.

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.

KOPPER L., LADANYI A., MIHALIK R., NAGY P., 1994. Loss of transforming growth factor beta 1 regulatory activity in human non Hodgkin lymphomas. *Anticancer Research*, **14**, 119-122.

KOSAKA M., NISHINA Y., TAKEDA M., MATSUMOTO K., NISHIMUNE Y., 1991. Reversible effects of sodium butyrate on the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, **192**, 46-51.

KRASAGAKIS K., GARBE C., SCHRIER P.I., ORFANOS C.E., 1994. Paracrine and autocrine regulation of human melanocyte and melanoma cell growth by transforming growth factor beta *in vitro*. *Anticancer Research*, **14**, 2565-2572.

KRUST A., KASTNER P., PETKOVICH P.M., ZELENT A., CHAMBON P., 1989. A third human retinoic acid receptor hRARgamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5310-5314.

KUROKOWA M., LYNCH K., PODOLSKY D.K., 1987. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line : Transforming growth ß inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **142**, 775-782.

KURTZ A., VOGEL F., FUNA K., HELDIN C.H., GROSSE R., 1990. Developmental regulation of mammary-derived growth inhibitor expression in bovine mammary tissue. *J. Cell Biol.*, **110**, 1779-1789.

LABOURDETTE G., JANET T., LAENG P., PERRAUD F., LAWRENCE D., PETTMANN B., 1990. Transforming growth factor type ß1 modulates the effects of basic fibroblast growth factor on growth and phenotypic expression of rat astroblast *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, **144**, 473-484.

LACROIX A., LIPPMAN M.E., 1980. Binding of retinoids to human breast cancer cells and their effect on cell growth. *J. Clin. Invest.*, **65**, 586-591.

LAIHO M., SAKSELA O., KESKI-OJA J., 1986. Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **164**, 399-407.

LAIHO M., SAKSELA O., KESKI-OJA J., 1987. Transforming growth factor-ß induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17467-17474.

LAIHO M., DECAPRIO J.A., LUDLOW J.W., LIVINGSTON D.M., MASSAGUE J., 1990 (a). Growth inhibition by TGF-ß1 linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell*, **62**, 175-185.

LAIHO M., WEIS F.M.B., MASSAGUE J., 1990 (b). Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)-ß receptor type I and II in TGFß resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18518-18524.

LALLEMAIN G., 1994. Deciphering the MAP kinase pathways. *Prog. Growth Factor Res.*, **5**, 291-334.

LAWRENCE R., HARTMANN D.J., SONENSHEIN G.E., 1994. Transforming growth factor ß1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9603-9609.

LAWRENCE D.A., 1996. Transforming growth factor-ß : a general review. *Eur. Cytokine Netw.*, **7**, 363-374.

LEDER A., LEDER D., 1975. Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. *Cell*, **5**, 319-322.

LELONGT B., VANDEWALLE A., BRENCHLEY P.E.C., BAUDOUIN B., GENITEAU-LEGENDRE M., VERROUST P.J., RONCO P.M., 1993. Major influence of cell differentiation status on characteristics of proteoglycans synthesized by cultured rabbit renal proximal tubule cells: role of insulin and dexamethasone. *J. Cell. Physiol.*, **154**, 175-191.

LEOF E.B., PROPER J.A., GOUSTIN A.S., SHIPLEY G.D., DICORLETO P.E., MOSES H.L., 1986. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor-ß : a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2456-2457.

LEPPA S., MALI M., MIETTINEN H.M., JALKANEN M., 1992. Syndecan expression regulates cell morphology and growth of mouse mammary epithelial tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 932-936.

LEROY P., KRUST A., ZELENT A., MENDELSHON C., GARNIER J.M., KASTNER P., DIERICH A., CHAMBON P., 1991. Multipe isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.*, **10**, 59-69.

LEUNG H.Y., HUGHES C.M., KLOPPEL G., WILLIAMSON R.C.N., LEMOINE N.R., 1994. 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 D.R., 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 L.Y., SAFRAN M., AVIEZER D., BOHLEN P., SEDDON A.P., YAYON A. , 1994. Diminished heparin binding of a basic fibroblast growth factor mutant is associated with reduced receptor binding, mitogenesis, plasminogen activator induction and *in vitro* angiogenesis. *Biochemistry*, **33**, 10999-11007.

LI X., CHEN J.C., SHEIKH M.S., SHAO Z.M., FONTANA J.A., 1994. Retinoic acid inhibition of insulin-like growth factor I stimulation of c-*fos* mRNA levels in a breast carcinoma cell line. *Exp. Cell. Res.*, **211**, 68-73.

LI X., SHAO Z., SHEIKH M.S., EISEMAN J.L., SENTZ D., JETTEN A.M., CHEN J., DAWSON M.I., AISNER S., RISHI A.K., GUTIERREZ P., SCHNAPPER L., FONTANA J.A., 1995. Retinoic acid nuclear receptor ß inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 449-458.

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.

LIN C., BISSELL M., 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.*, **7**, 737-743.

LIOTTA L.A., WICHA M.S., RENNAUD S.I., GARBROSA S., KIDWELL W.R., 1980. Hormonal requirements for basement membrane collagen deposition by cultures rat mammary epithelium. *Lab. Invest.*, **41**, 511-518.

LIOTTA L.A., THORGEIRSSON U.P., GARBISA S., 1982. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metast. Rev.*, **1**, 277-288.

LIU D.F., RABBANI S.A., 1995. Induction of urinary plasminogen activator by retinoic acid results in increased invasiveness of human prostate cancer cells PC-3. *Prostate*, **27**, 269-276.

LIU L., NICOLL C.S., 1988. Evidence for a role of basic fibroblast growth factor in rat embryonic growth and differentiation. *Endocrinology*, **123**, 2027-2031.

LIUZZO J.P., MOSCATELLI D., 1996. Human leukemia cell lines bind basic fibroblast growth factor (FGF) on FGF receptors and heparan sulfates : Downmodulation of FGF receptors by phorbol ester. *Blood*, **87**, 245-255.

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., 1988. Clinical applications of heparin binding growth factors. *Eur. J. Clin. Invest.*, **18**, 321-336.

LOCCI P., LILLI C., MARINUCCI L., BARONI T., PEZZETTI F., BECCHETTI E., 1993. Embryonic skin fibroblasts release TGFα and TGFß able to influence synthesis and secretion of GAG. *Cell. Mol. Biol.*, **39**, 415-426.

LOPEZ-BOADO Y.S., TOLIVIA J., LOPEZ-OTIN C., 1994. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26871-26878.

LOPEZ-CASILLAS F., CHEIFETZ S., DOODY J., ANDRES J.L., LANE W.S., MASSAGUE J., 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan a componant of the TGFß receptor system. *Cell*, **67**, 785-795.

LOSA G.A., ALINI M., 1993. Sulphated proteoglycans in the extracellular matrix of human breast tissues with infiltrating carcinoma. *Int. J. Cancer*, **54**, 552-557.

LOSKUTOFF D.J., SAWDEY M., KEETON M., SCHNEIDERMAN J., 1993. Regulation of PAI-1 gene expression *in vivo*. *Thromb. Haemostasis*, **70**, 135-137.

LOTAN R., 1980. Effects of vitamin A and its analogs (retinoid) on normal and neoplastic cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **605**, 33-91.

LOTAN R., LOTAN D., DEUTSCH V., 1987. Growth inhibition of murine melanoma cells by antibodies to a cell surface glycoprotein implicated in retinoic action. *Cancer Res.*, **47**, 3152-3158.

LUND L.R., ROMER J., RONNE E., ELLIS V., BLASI F., DANO K., 1991. Urokinase-receptor biosynthesis, mRNA level and gene transcription are increased by transforming growth factor beta 1 in human A549 lung carcinoma cells. *EMBO J.*, **10**, 3399-3407.

LUQMANI Y.A., GRAHAM M., COOMBES R.C., 1992. Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR-1 and FGFR-2 in normal and malignant human breast and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer*, **66**, 273-280.

MACAULEY V.L., 1992. Insulin-like growth factors and cancer. *Br. J. Cancer*, **65**, 311-320.

MACCARANA M., CASU B., LINDAHL U., 1993. Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of bFGF. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23898-23905.

MAHER P.A., 1996. Nuclear translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2. *J. Cell Biol.*, **134**, 529-536.

MALI M., ELENIUS K., MIETTINEN H.M., JALKANEN M., 1993. Inhibition of basic FGF-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24215-24222.

MANGAKIS N., SERHT B., MANGAKIS P., BOWE E., KLEEMAN I., 1990. Determining the degree of malignancy of individual cases of mammary carcinoma on the basis of clinical, morphological and biochemical parameters. *Bull. Cancer*, **77**, 235-242.

MANGELSDORF D.J., ONG E.S., DYCK J.A., EVANS R.M., 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, **345**, 224-229.

MANSUKHANI A., MOSCATELLI D., TALARICO D., LEVYTSKA V., BASILICO C., 1990. A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and kaposi FGF. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **87**,4378-4382.

MARGOLIS R.K., SALTON S.R.J., MARGOLIS R.U., 1987. Effects of nerve growth factor-induced differentiation on the heparan sulfate of PC12 pheochromocytoma cells and comparison with developing brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, **257**, 107-114.

MARICS I., ADELAIDE J., RAYBAUD F., MATTEI M.G., COULIER F., PLANCHE J., DE LAPEYRIERE O., BIRNBAUM D., 1989. Characterization of the HST-related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene* , **4**, 335-340.

MARKOWITZ S.D., ROBERTS A.B., 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-ß pathway in human cancers. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **7**, 93-102.

MARSHALL C.J., 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion Genetics Development*, **4**, 82-89.

MARTEL P., HOUDEBINE L.M., 1982. Effects of various drugs affecting cytoskeleton and plasma membrane on the induction of DNA synthesis by insulin, epidermal growth factor and prolactin in mammary explants. *Biol. Cell*, **44**, 111-116.

MARTH C., BOCK G., DAXENBICHLER G., 1984. Effect of retinoic acid and 4-hydroxytamoxifen on human breast cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2217-2221.

MARTH C., BOCK G., DAXENBICHLER G., 1985. Effects of 4-hydroxylphenylretinamide and retinoic acid on proliferation and cell cycle of cultured human breast cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 871-875.

MARTIKAINEN P., KYPRIANOU N., ISAACS J.T., 1990. Effects of transforming growth factor-ß1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology*, **127**, 2963-2968.

MARTIN J.L., BALLESTEROS M., BAXTER R.C., 1992. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and transforming growth factor ß1 release IFG-binding protein-3 from human fibroblasts by differing mechanisms. *Endocrinology*, **131**, 1703-1710.

MARTINET J., HOUDEBINE L.M., 1993. Biologie de la lactation. INSERM/INRA Editors.

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. Comm.*, **146**, 478-486.

MASSAGUE J., CHEIFETZ S., ENDO T., NADAL-GINARD B., 1986. Type ß transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 8206-8210.

MASSAGUE J., 1990. The transforming growth factor-ß family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**,597-641.

MASUI T., WAKEFIELD L.L., LECHNER J.F., LAVECK M.A., SPORN M.B., HARRIS C.C., 1986. Type beta transforming growth factor is the primary differentiation inducing serum factor for normal bronchial epithelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 2438-2442.

MATSUMOTO K., HASHIMOTO K., HASHIRO M., YOSHIMASA H., YOSHIKAWA K., 1990. Modulation of growth and differentiation in normal human kerationcytes by TGFß. *J. Cell. Physiol.*, **145**, 95-101.

MATSUO Y., NISHI N., MATSUI S., SANSBERG A., ISAACS J.T., WADA F., 1987. Heparin binding affinity of rat prostatic growth factor in normal and cancerous protates : partial purification and characterization of rat prostatic growth factor in Dunning tumor. *Cancer Res.*, **47**, 188-192.

MATUOKA K., MITSUI Y., MUROTA S., 1985. Growth-coupled changes in glucosaminoglycans (heparan sulfate and hyaluronic acid) in normal and transformed human fibroblasts. *Cell. Biol. Int. Rep.*, **9**, 577-586.

MATUOKA K., HASEGAWA N., NAMBA M., SMITH G.J., MITSUI Y., 1989. A decrease in hyaluronic acid synthesis by aging fibroblasts leading to heparan sulfate enrichment and growth reduction. *Aging*, **1**, 47-54.

MAUVIEL A., SANTRA M., CHEN Y.Q., UITTP J., IOZZO R.V., 1995. Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11692-11700.

MAZARS P., BARBOULE N., BALDIN V., VIDAL S., DUCOMMUN B., VALETTE A., 1995. Effects of TGF-ß1 on the cell cycle regulation of human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *FEBS Letters*, **362**, 295-300.

McBAIN J.A., PETTIT G.R., MUELLER G.C., 1990. Phorbol esters activate proteoglycan metabolism in human colon cancer cells en route to terminal differentiation. *Cell Growth and Differentiation*, **1**, 281-291.

McCAFFRAY T.A., FALCONE D.J., DU B., 1992. Transforming growth factor-ß1 is a heparin-binding protein : Identification of putative heparin-binding regions and isolation of heparins with varying affinity for TGFß1. *J. Cell. Physiol.*, **152**, 430-440.

McCAFFEY T.A., FALCONE D.J., VICENTE D., DU B., CONSIGLI S., BORTH W., 1994. Protection of transforming growth factor-ß1 activity by heparin and fucoidan. *J. Cell. Physiol.*, **159**, 51-59.

McGRATH C.M., SOULE H.D., 1983. Renewal inhibition of human mammary cell growth *in vitro* : Cortisol and recruitment of cells to terminal differentiation. *J. Cell. Physiol.*, **116**, 385-396.

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 cell 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.

McNICOL A.M., MUSLIN A.J., WILLIAMS L.T., 1993. Raf-1 kinase is essential for early *Xenopus* development and mediates the induction of mesoderm by FGF. *Cell* , **73**, 571-583.

MEATS J.E., ELFORD P.R., BUNNING R.A.D., RUSSELL R.G.G., 1985. Retinoids and synovial factor(s) stimulate the production of plasminogen activator by cultured human chondrocytes : A possible role for plasminogen activator in the resorption of cartilage *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **838**, 161-169.

MERGIA A., EDDY R., ABRAHAM J.A., FIDDES J.C., SHOWS T.B., 1986. The genes for basic and acidic fibroblast growth factor are on different human chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 644-651.

MEYERS S.L., DUDLEY J.P., 1992. Sequence analysis of the int-2/fgf-3 gene in agressive human breast carcinomas. *Mol. Carcinog.*, **6**, 243-251.

MICK C.C.W., NICOLL C.S., 1985. Prolactin directly stimulates the liver *in vivo* to secrete factor (synlactin) which acts synergically with the hormone. *Endocrinology*, **116**, 2049-2353.

MIETH M., BOEHMER F. D., BALL R., GRONER B., GROSSE R., 1990. Transforming growth-ß inhibits lactogenic hormone induction of ß-casein expression in HC11 mouse mammary epithelial cells. *Growth Factors*, **4**, 9-15.

MIETTINEN P.J., EBNER R., LOPEZ A.R., DERYNCK R., 1994. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells : involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.*, **127**, 2021-2036.

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 pathways independent of the 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., 1991. Expresion cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *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. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**, 246-250.

MIRA-Y-LOPEZ R., JOSEPH-SILVERSTEIN R., RIFKIN D.B., OSSOWSKI L., 1986. Identification of a pituitary factor responsible for enhancement of plasminogen activator activity in human breast tumors cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 7780-7784.

MIRA-Y-LOPEZ R., 1991. Retinoic acid priming potentiates the induction of urokinase-type plasminogen activator by cyclic adenosine monophosphate in mouse mammary carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.*, **147**, 46-54.

MITRANI E., GRUENBAUM Y., SHOHAT H., ZIV T., 1990. Fibroblast growth factor during mesoderm induction in the early chick embryo. *Development*, **109**, 387-393.

MIYAMOTO M., NARUO K., SEKO C., MATSUMOTO S., KONDO T., KURAKAWA 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.

MIYAZONO K., HELLMAN U., WERNSTEDT C., HELDIN C.H., 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6407-6415.

MIYAZONO K., HELDIN C.H., 1989. Role for carbohydrate structures in TGF-beta latency. *Nature*, **338**, 158-160.

MIYAZONO K., ICHIJO H., HELDIN C.H., 1993. Transforming growth factor-ß : latent forms, binding proteins and receptors. *Growth factors*, **8**, 11-22.

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-ß, IGF-1 and neu oncogene product in bening and malignant human breast tissues. *Anticancer Res.*, **10**, 1115-1126.

MOCZAR M., CAUX F., BAILLY M., BERTHIER O., DORE J.F., 1993. Accumulation of heparan sulfate in the culture of human melanoma cells with different metastatic ability. *Clin. Exp. Metastasis*, **11**, 462-471.

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.

MONAHAM 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.

MONTESANO R., VASALLI J.D., BAIRD A., GUILLEMIN R., ORCI L., 1986. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7297-7301.

MOON R.C., MEHTA R.G., 1990. Chemoprevention of mammary cancer by retinoids. *Basic Life Sci.*, **52**, 213-224.

MOORE R., CASEY G., BROOKES S., DIXON M., PETERS G., DICKSON C. 1986. Sequence, topography and protein coding potential of mouse int-2 : a putative oncogene activated by mouse mammary tumor virus. *EMBO J.*, **5**, 919-924.

MORALES T.I., ROBERTS A.B., 1992. The interaction between retinoic acid and the transforming growth factors-beta in calf articular cartilage organ culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, **293**, 79-84.

MORALES T.I., 1994. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-1 restore proteoglycan metabolism of bovine articular cartilage after depletion by retinoic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 190-198.

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. Neurosci. Res.*, **34**, 502-509.

MOSCATELLI D., PRESTA M., JOSEPH-SILVERSTEIN J., RIFKIN D.B., 1986 (a). Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.*, **129**, 273-276.

MOSCATELLI D., PRESTA M., RIFKIN D.B., 1986 (b). Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell proteases production, DNA synthesis and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2091-2095.

MOSCATELLI D., 1987. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells : Absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **131**, 123-130.

MOSCATELLI D., 1988. Metabolism of receptor bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **107**, 753-759.

MOSCATELLI D., 1992. Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25803-25809.

MOSCATELLI D., 1994. Autocrine downregulation of fibroblast growth factor receptors in F9 teratocarcinoma cells. *J. Cell. Physiol.*, **160**, 555-562.

MULLER 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.

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. Comm.*, **191**, 188-195.

MUNSON P.J., RODBARD D., 1980. Ligand a versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Anal. Biochem.*, **107**, 220-239.

MURAKAMI A., TANAKA H., MATSSUZAWA A., 1990. Association of hst gene expression with metastatic phenotype in mouse mammary yumours. *Cell Growth and Differentiation*, **1**, 1-5.

MURDOCH A.D., DODGE G.R., COHEN I., TUAN R.S., IOZZO R.V., 1992. Primary structure of the 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.

MURGUE B., TSUNEKAWA S., ROSENBERG I., DE BEAUMONT M., PODOLSKY D.K., 1994. Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res.*, **54**, 5206-5211.

MURONO E.P., WASHBURN A.L., GOFORTH D.P., WU N., 1992. Evidence for basic fibroblast growth factor receptors in cultured immature Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **88**, 39-45.

MURRAY P.A., BARRETT-LEE P., TRAVERS M., LUQMANI Y., POWLES T., COOMBES R.C., 1993. The prognostic significiance of transforming growth factors in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, **67**, 1408-1412.

MUSGROVE E.A., SUTHERLAND R.L., 1993. Acute effects on growth factors on T-47D breast cancer cell cycle progression. *Eur. J. Cancer*, **29**, 2273-2279.

NAGPAL S., ZELENT A., CHAMBON P., 1992. RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2718-2722.

NAGY L., THOMAZY V.A., SHIPLEY G.L., FESUS L., LAMPH W., HEYMAN R.A., CHANDRARATNA R.A., DAVIES P.J., 1995. Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell line. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3540-3551.

NAKAJIMA M., IRIMURA T., DI FERRANTE D., DI FERRANTE N., NICOLSON G.L., 1983. Heparan sulfate degradation : relation to tumor invasion and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines. *Science*, **220**, 611-613.

NAKANISHI Y., KIHARA K., MIZUNO K., MASMUME Y., YOSHITAKE Y., NISHIKAWA K., 1992. Direct effet of basic fibroblast growth factor on gene transcription in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5216-5220.

NENCI I., MACHETTI E., QUERZOLI P., 1988. Comentary on human preneoplasia. The estrogen promotion hypothesis. *J. Steroid. Biochem.*, **30**, 105-106.

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.

NEW B.A., YEOMAN L.C., 1992. Identification of basic fibroblast growth factor sensitivity and receptor and ligand expression in human colon tumor cell lines. *J. Cell. Physiol.*, **150**, 320-326.

NEWMAN M.J., 1990. Inhibition of carcinoma and melanoma cell growth by type I transforming growth factor ß is dependent on the presence of polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5543-5547.

NEWMAN M.J., LANC E.A., IANNOTTI A.M., NUGENT M.A., PEPINSKY R.B., KESKI-OJA J., 1990. Characterization and purification of a secreted plasminogen activator inhibitor (PAI-1) induced by transforming growth factor-beta 1 in normal rat kidney (NRK) cells : decreased PAI-1 expression in transformed NRK cells. *Endocrinology*, **126**, 2936-46.

NEWMARK H.L., LUPTON J.R., YOUNG C.W., 1994. Butyrate as a differentiating agent : pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Letters*, **78**, 1-5.

NICOLSON G.L., 1982. Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **695**, 113-176.

NIRANJAN B., BULUWELA L., YANT J., PERUSINGHE N., ATHERTON A., PHIPPARD D., DALE T., GUSTERSON B., KAMALATI T., 1995. HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development*, **121**, 2897-2908.

NISHINA Y., SUMI T., IWAI S.A., KOSAKA M., NISHIMUNE Y., 1993. The induction of jun genes during the reversible changes induced with sodium butyrate on the differentiation of F9 cells. *Exp. Cell Res.*, **208**, 492-497.

NISHINO N., AOKI K., TOKURA Y., SAKAGUCHI S., TAKADA Y., TAKADA A., 1988. The urokinase type of plasminogen activator in cancer of digestive tracts. *Thromb. Res.*, **50**, 527-535.

NORGAARD P., DAMSTRUP L., RYGAARD K., SPANG-THOMSEN M., SKOVGAARD H.P., 1994. Growth suppression by transforming growth factor beta 1 of human small-cell lung cancer cell lines is associated with expression of type II receptor. *Br. J. Cancer*, **69**, 802-808.

NOVOGRODSKY A., DVIR A., RAVID A., SHKOLNIK T., STENZEL K.L., RUBIN A.L., ZAIKOV R., 1983. Effect of polar organic compounds on leukemic cells. *Cancer Soc.*, **51**, 9-14.

NUGENT M.A., EDELMAN E.R., 1992 (a). Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan : a mechanism for cooperativy. *Biochemistry*, **31**, 88976-8883.

NUGENT M.A., EDELMAN E.R., 1992 (b). TGFß1 stimulates the production of basic fibroblast growth factor proteoglycans in Balb/c3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21256-21264.

NUGENT M.A., KARNOVSKY M.J., EDELMAN E.R., 1993. Vascular cell-derived heparan sulfate shows coupled inhibition of basic fibroblast growth factor binding and mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation Res.*, **73**, 1051-1060.

O'CONNOR-McCOURT M., WAKEFIELD L.M., 1987. Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.*, **262**, 14090-14099.

OBERHAMMER F., PAVELKA M., SHARMA S., TIEFENBACHER R., PURCHIO A.F., BURSH W., SCHULTE-HERMANN R., 1992. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor ß1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5408-5412.

OH Y., MULLER H.L., NG L., ROSENFELD R., 1995. Transforming growth factor-ß-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13589-13592.

OKAMOTO S., OKA T., 1984. Evidence for physiological function of epidermal growth factor : pregestational sialoadenectomy decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6059-6063.

OLSSON I.L., BREITMAN R., GALLO R.C., 1982. Priming of human myeloid leakemyc cell lines HL-60 and U-937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte differentiation factor. *Cancer Res.*, **42**, 3928-3933.

OLWIN B.B., HAUSCHKA S.D., 1988. Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture. *J. Cell Biol.*, **107**, 761-769.

OLWIN B.B., BURRUS L.W., ZUBER M., LUEDDECKE B., 1991. Characterization of a non tyrosine kinase FGF-binding protein. *Ann. NY Acad. Sci.*, **638**, 195-203.

OLWIN B.B., ARTHUR K., HANNON K., HEIN P., McFALL A., RILEY B., SZEBENYL G., ZHOU Z., ZUBER M.E., RAPRAEGER A.C., FALLON J.F., KUDLA A.J., 1994. Role of FGFs in skeletal muscle and limb development. *Mol. Rep. Dev.*, **39**, 90-101.

ORNITZ D., YAYON A., FLANAGAN J., SCAHN C., LEVI E., LEDER P., 1992. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 240-247.

ORR-URTREGER A., BEDFORD 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 (FGFR-2). *Dev. Biol.*, **158**, 475-486.

OSSOWSKI L., REICH E., 1983. Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell*, **35**, 611-619.

OSSOWSKI L., RUSSO-PAYNE H., WILSON E.L., 1991. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies : the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res.*, **51**, 274-281.

OVERALL C.M., WRANA J.L., SODEK J., 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-Kda gelatinase, type IV collagenase by transforming growth factor ß1 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **266**, 14064-14071.

PACE D.N., AFTONOMOS B.T., ELLIOT A., SOMMERS S., 1967. Observations on some effects of the sodium salts of certain monocarboxylic acids on established cell lines. *Canad. J. Biochem.*, **45**, 81-88.

PAGES G., LENORMAND P., LALLEMAIN G., CHAMBARD J.C., MELOCHE S., POUYSSEGUR J., 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8319-8322.

PANTALIANO M.W., HORLICK R.A., SPRINGER B.A., VAN DICK D.E., TOBERY T., WETMORE D.R., LEAR J.D., NAHAPETIAN A.T., BRADLEY J.D., SISK W.P., 1994. Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry*, **33**, 10229-10248.

PARISH C.R., COOMBE D.R., JAKOBSEN K.B., BENNETT F.A., UNDERWOOD P.A., 1987. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases. *Int. J. Cancer*, **40**, 511-518.

PARK K., KIM S-J., BANG Y-J, PARK J-G, KIM N.K., ROBERTS A.B., SPORN M.B., 1994. Genetic changes in the transforming growth factor ß (TGF-ß) type II receptor gene in human gastric cancer cells : Correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-ß. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8772-8776.

PARRY G., LEE E.Y.H., FARSON D., KOVAL M., BISSEL M.J., 1985. Collagenous substrata regulate the nature and distribution of glycosaminoglycans produced by differentiated cultures of mouse mammary epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, **156**, 487-499.

PARTANEN J., MAKELA T.P., EEROLA E., KORHONEN J., HIRVONEN H., CLAESSON-WELSH L., ALITALO K., 1991. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.*, **10**, 1347-1354.

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.

PAULI B.U., SCHWARTZ D.E., THONAR E.J.M., KUETTNER K.E., 1983. Tumor invasion and host extracellular matrix. *Cancer Metast. Rev.*, **2**, 129-152.

PEARSON D., SASSE J., 1992. Differential regulation of biglycan and decorin by retinoic acid in bovine chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25364-25370.

PEJLER G., DAVID G., 1987. Basement membrane heparan sulphate with high affinity for antithrombin synthetized by normal and transformed mouse mammary epithelial cells. *Biochem. J.*, **248**, 69-77.

PENAULT-LLORCA F., BERTUCCI F., ADELAIDE J., PARC P., COULIER F., JACQUEMIER J., BIRNBAUM D., DELAPEYRIERE O., 1995. Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, **61**, 170-176.

PEPPER M.S., BELIN D., MONTESANO R., ORCI L., VASSALLI J.D., 1990. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.*, **111**, 743-755.

PEPPER M.S., MONTESANO R., ORCI L., VASSALI J.D., 1991. Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells by a chondrocyte-derived transforming growth factor-beta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **176**, 633-638.

PEROTTI D., CIMINO L., FERRARI S., SACCHI A., 1991. Differential expression of transforming growth factor-ß1 gene in 3LL metastatic variants. *Cancer Res.*, **51**, 5491-5496.

PERTERSON O.W., RONNOV-JESSEN L., HOWLETT A., BISSEL M.J., 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9064-9068.

PERTOVAARA L., SAKSELA O., ALITALO K., 1993 (a). Enhanced bFGF gene expression in response to transforming growth factor-ß stimulates of AKR-2B cells. *Growth Factors*, **9**, 81-86.

PERTOVAARA L., TIENARI J., VAINIKKA S., PARTANEN J., SAKSELA O., LEHTONEN E., ALITALO K., 1993 (b). Modulation of fibroblast growth factor receptor expression and signalling during retinoic acid-induced differentiation of Tera-2 teratocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **191**, 149-156.

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.

PETKOVITCH M., BRAND N.J., KRUST A., CHAMBON P., 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, **330**, 444-450.

PETROUTOS G., COURTY J., GUIMARAES R., POULIQUEN Y., BARRITAULT D., PLOUET J., COURTOIS Y., 1984. Comparison of the effects of EGF, bFGF and EDGF on corneal epithelium wound healing. *Curr. Eye Res.*, **3**, 593-598.

PEYRAT J.P., HONDERMARCK H., LOUCHEZ M.M., BOILLY B., 1991. Demonstration of basic fibroblast growth factor binding sites in human breast cancer cells lines. *Cancer Commun.*, **3**, 323-329.

PEYRAT J.P., BONNETERRE J., HONDERMARCK H., HECQUET B., ADENIS A., LOUCHEZ M.M., LEFEBVRE J., BOILLY B., DEMAILLE A., 1992. Basic fibroblast growth factor : mitogenic activity and binding sites in human breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Biol.*, **43**, 87-94.

PICH A., BUSSOLATI G., CARBANARA A., 1976. Immunocytochemical detection of casein and casein-like proteins in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 940-947.

PIERCE D.F., GORSKA A.E., CHYTIL A., MEISE K.S., PAGE D.L., COFFEY Jr R.J., MOSES H.L., 1995. Mammary tumor suppression by transforming growth factor ß transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **92**, 4254-4258.

PLANCHON P., 1992. L'acide n-butyrique en tant qu'agent antitumoral. *Cahiers d'Oncologie*, **1**, 79-83.

POLLAK M.N., POLYCHRONAKOS C., YOUSEFI S., RICHARD M., 1988. Characterization of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors of human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **154**, 326-331.

POLYAK K., KATO J., SOLOMON M.J., SHERR C.J., MASSAGUE J., ROBERTS J.M., KOFF A., 1994. $p27^{kip1}$, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-ß and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*, **8**, 9-22.

PRASAD K. N., 1980. Butyric acid : a small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sciences*, **27**, 1351-1358.

PRATS H., KAGHAD M., PRATS A.C., KLAGSBRUN M., LELIAS J.M., LIAUZUN P., CHALON P., TAUBER J.P., ALMARIC F., SMITH J.A., CAPUT D., 1989. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1836-1840.

PRESTA M., MOSCATELLI D., JOSEPH-SILVERSTEIN J., RIFKIN D.B., 1986. Purification from 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*, **6**, 4060-4066.

PRESTA M., MAIER J.M., RAGNOTTI G.M., 1989. The mitogenic signalling pathways but not the plasminogen activator inducing pathways of basic fibroblast growth factor is mediated through protein kinase C in fetal bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **109**, 1877-1884.

QUARTO N., BOUCHE G., BUGLER B., CHAILLEUX C., PRATS H., PRATS A.C., ROMAN A.M., TRUCHET I., ALMARIC F., 1993. The basic fibroblast growth factor isoforms : endogenous and exogenous behavior. *In : growth factors, peptide and receptors. Moody TW. (eds). New-York,* pages 147 à 158.

QUARTO N., ALMARIC F., 1994. Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signalling. *J. Cell Sci.*, **107**, 3201-3212.

RAPRAEGER A., YEAMAN C., 1989. A quantitative solid-phase essay for identifying radiolabeled glycosaminoglycans in crude cell extracts. *Anal. Biochem.*, **179**, 361-365.

RAPRAEGER A.C., KRUFKA A., OLWIN B., 1991. Requierement of heparan sulfate for bFGF mediated fibroblast growth factor and myogenic differentiation. *Science*, **252**, 1705-1708.

RASTL E., SWELTY P., 1978. Expression of poly-adenosine diphosphate-ribose polymerase activity in erythroleukemic mouse cells during cell cycle and erythropoïetic differentiation. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4333-4340.

RAYNAL S., LAWRENCE D.A., 1995. Differential effects of transforming growth factor-ß1 on protein levels of p21 WAF and cdk-2 and on cdk-2 kinase activity in human RD and CCL64 mink lung cells. *Int. J. Oncol.*, **7**, 337-341.

REEDER J.A., DICKINSON J.L., CHENEVIX-TRENCH G., ANTALIS T.M., 1993. Sodium butyrate differentially modulates plasminogen activator inhibitor type-1, urokinase plasminogen activator, and its receptor in a human colon carcinoma cell. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, **13**, 75-88.

REILAND J., RAPRAEGER A.C., 1993. Heparan sulfate proteoglycan and FGF receptor target basic FGF to different intracellular destinations. *J. Cell Sci.*, **105**, 1085-1093.

REINARTZ J., BATRLA R., BOUKAMP P., FUSENIG N., KRAMER M.D., 1993. Binding and activation of plasminogen at the surface of human keratinocytes. *Exp. Cell Res.*, **208**, 197-208.

REISS M., MANIGLIA C.A., SARTORELLI A.C., 1985. Reversible effects of retinoic acid on glycosaminoglycan synthesis during differentiation of HL-60 Leukemia cells. *Cancer Res.*, **45**, 2092-2097.

REISS M., SARTORELLI A.C., 1987. Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by type ß transforming growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res.*, **47**, 6705-6709.

REISS M., STASH E.B., 1990. High frequency of resistance of human squamous carcinoma cells to the anti-proliferative action of transforming growth factor-ß. *Cancer Commun.*, **2**, 363-369.

RENAUD F., EL YAZIDI I., BOILLY-MARER Y., COURTOIS Y., LAURENT M., 1996. Expression and regulation by serum of multiple FGF1 mRNA in normal, transformed and malignant human mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **219**, 679-685.

REVILLION F., VANDEWALLE B., HORNEZ L., LEFEBVRE J., 1993. Influence of cAMP on E-cadherin expression and cell surface heparan sulfate proteoglycan synthesis in human breast cancer cells. *Anticancer Research*, **13**, 1625-1630.

RISAU W., 1986. Developping brain produces an angiogenesis factor. *Proc. Natl. Acad. USA*, **83**, 3855-3859.

RISEAU W., EKBLOM P., 1986. Production of a heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. *J. Cell Biol.*, **103**, 1101-1107.

RIZZINO A., 1988. Transforming growth factor-ß : Multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev. Biol.*, **130**, 411-422.

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.

ROBERTS A.B., SPORN M.B., ASSOIAN R.K., SMITH J.M., ROCHE N.S., WAKEFIELD L.M., HEINE U.I., LIOTTA L.A., FALANGA V., KEHRL J. H., FAUCI A.S., 1986. Transforming growth factor type-beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc. Natl. Sci. USA*, **83**, 4167-4171.

ROBINSON J., VITI M., HOOK M., 1984. Structure and properties of an undersulfated heparan sulfate proteoglycan synthesised by rat hepatoma cell line. *J. Cell Biol.*, **98**, 946-953.

ROBINSON S.D., ROBERTS A.B., DANIEL C.W., 1993. TGFβ suppresses casein synthesis in mouse mammary explants and may play a role in controlling milk levels during pregnancy. *J. Cell Biol.*, **120**, 245-251.

RODRIGUEZ J.P., CONGET P., MINGUELL J.J., 1995. The sulfatation degree of membrane-associated proteoglycan from a hematopoietic cell line is determined by changes in the growth state of the cell. *Eur. J. Cell Biol.*, **67**, 261-266.

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.

ROGEL J S., KLAGSBRUN M., ATZMON R., KUROKAWA M., HAIMOVIZ A., FUKS Z., VLODAVSKY I., 1989. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *J. Cell Biol.*, **109**, 823-831.

ROGHANI M., MOSCATELLI D., 1992. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22156-22162.

ROGHANI M., MANSUKHANI A., DELLERA P., BELLOSTA P., BASILICO C., MOSCATELLI D., 1994. Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3976-3984.

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-1β, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.*, **9**, 1503-1510.

RUDLAND P.S., PLATT-HIGGINS A.M., WILKINSON M.C., FERNIG D.G. 1993. Immunocytochemical identification of basic fibroblast growth factor in the developing rat mammary gland : variations in location are dependent on glandular structure and differentiation. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**, 887-898.

RUNDHAUG J.E., GRAY T., STEIGERWALT R.W., NETTESHEIM P., 1992. Changes in responsiveness of rat tracheal epithelial cells to transforming growth factor-ß1 with time in culture. *J. Cell. Physiol.*, **152**, 281-291.

RUOSLAHTI E., YAMAGUCHI Y., 1991. Proteoglycans as modulators of growth activities. *Cell*, **64**, 867-869.

RUSNATI M., URBINATI C., PRESTA M., 1993. Internalization of basic fibroblast growth factor in cultured endothelial cells : role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J. Cell. Physiol.*, **154**, 152-161.

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 encoced 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 differentation in cultures of PC12 cells. *J. Neurosci.*, **7**, 3639-3653.

SAKSELA O., MOSCATELLI D., RIFKIN D.B., 1987. The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β on the regulation of plasminogen activator activity in capillarity endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **105**, 957-963.

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.

SAKSELA O., RIFKIN D.B., 1990. Release of basic fibroblast growth factor-heparan complexes from endothelial cells by plasminogen activator mediated proteolytic activity. *J. Cell Biol.*, **110**, 767-775.

SALMIVIRTA M., JALKANEN M., 1995. Syndecan family of cell surface proteoglycans : developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experentia* , **51**, 863-871.

SANCHEZ A., ALVAREZ A.M., BENITO M., FABREGAT I., 1995. Transforming growth factor ß modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 393-405.

SANDERSON R.D., TURNBULL J.E., GALLAGHER J.T., LANDER A.D., 1994. Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behaviour. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13100-13106.

SCHMIDT A., BUDDECKE E., 1990. Changes in heparan sulfate structure during transition from the proliferating to the non-dividing state of cultured arterial smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **52**, 229-235.

SCHMIDT A., YOSHIDA K., BUDDECKE E., 1992 (a). The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O-sulfated uronic acid residues. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19242-19247.

SCHMIDT A., LEMMING G., YOSHIDA K., BUDDECKE E., 1992 (b). Molecular organisation and proliferative domains of arterial tissue heparan sulfate. *Eur. J. Cell Biol.*, **59**, 322-328.

SCHIMDT A., SKALETZ-ROROWSKI A., BREITHARDT G., BUDDECKE E., 1995. Growth status-dependent changes of bFGF compartimentalization and heparan sulfate structure in arterial smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **67**, 130-134.

SCHMIDT R.J., CHUNG L.Y., ANDREWS A.M., SPYRATOU O., TURNER T.D., 1993. Biocompatibility of wound management products : a study macrophage respiratory burst. *Pharm. Pharmacol.*, **45**, 508-513.

SCHUBERT D., LING N., BAIRD A., 1987. Multiple influences of a heparin growth factor on neuronal development. *J. Cell Biol.*, **104**, 635-643.

SCHULE R., RANGOROJAN P., YANG N., KLIEWER S., RANSONE L.J., BOLADO J., VERDA I.M., EVANS R.M., 1991. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6092-6096.

SCHULTZ-CHERRY S., MURPHY-ULLRICH J.E., 1993. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-ß secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J. Cell Biol.*, **122**, 923-932.

SCHULTZ-CHERRY S., RIBEIRO S., GENTRY L., MURPHY-ULLRICH J.E., 1994. Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-ß in a chemically defined system. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26775-26782.

SCHWARZ L.C., WRIGHT J.A., GINGRAS M.C., KONDAIAH P., DANIELPOUR D., PIMENTEL M., SPORN M.B., GREENBERG A.H., 1990. Aberrant TGF-ß production and regulation in metastatic malignancy. *Growth factors*, **3**, 115-127.

SEDDON A.P., AVIEZER D., LI L.Y., BOHLEN P., YAYON A., 1995. Engineering of fibroblast growth factor : alteration of receptor binding specificity. *Biochemistry*, **34**, 731-736.

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.

SEGARINI P.R., ZIMAN J.M., KANE J.M., DASCH J.R., 1992. Two novel patterns of transforming growth factor-ß (TGFß) binding to cell surface proteins are dependent upon the binding of TGFß1 and indicate a mechanism of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1048-1053.

SEO M., NOGUCHI K., 1995. Retinoic acid induces gene expression of fibroblast growth factor-9 during induction of neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Letters*, **370**, 231-235.

SEYEDIN S.M., THOMAS T.C., THOMPSON A.Y., ROSEN D.M., PIEZ K.A., 1985. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2267-2271.

SHAPIRO S.S., POON J.P., 1976. Effect of retinoic acid on chondrocyte glycosaminoglycan biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 74-81.

SILBERSTEIN G.B., DANIEL C.W., 1982. Glycosaminocans in the basal lamina and extracellular matrix synthesis of the developing mouse mammary duct. *Dev. Biol.*, **90**, 215-222.

SILBERSTEIN G.B., DANIEL C.W., 1987. Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-ß. *Science*, **237**, 291-293.

SILBERSTEIN G.B., STRICKLAND P., COLEMAN S., DANIEL C.W., 1990. Epithelium-dependent extracellular matrix synthesis in transforming factor-ß1-growth-inhibited mouse mammary gland. *J. Cell Biol.*, **110**, 2209-2219.

SKIVER L., LARSSON J.I., KIELBERG V., NIELSEN L.S., ANDREANSEN P.A., KRISTENSEN P., DANO K., 1984. Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. *J. Cell Biol.*, **99**, 753-758.

SLACK J.M.W., ISAACS H.V., 1989. Presence of basic fibroblast growth factor in the early *Xenopus* embryo. *Development*, **105**, 147-153.

SLINGERLAND J.M., HENGST L., PAN C.H., ALEXANDER D., STAMPFER M.R., REED S.I., 1994. A novel inhibitor of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor ß-arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3683-3694.

SLOANE J.P, ORMEROD M.G., 1981. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplasic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer*, **47**, 1786-1795.

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 J.A., BARRACLOUGH B.R., FERNIG D.G., RUDLAND P.S., 1989. Identification of alpha transforming growth factor (αTGF) as a possible local trophic agent for the mammary gland. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 362-370.

SMITH R.D., 1994. The anti-proliferative action of transforming growth factor-ß1 on a rat intestinal epithelial cell line (RIE-1) is dependent on cell population density and culture passage number. *Int. J. Biochem.*, **26**, 899-903.

SOMMER A., RIFKIN B., 1989. Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor : protection of the angoigenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J. Cell. Physiol.*, **138**, 215-220.

SOMMERS C.L., BYERS S.W., THOMPSON E.W., TORRI J.A., GELMANN E.P., 1994. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast cancer Res. Treat.*, **31**, 325-335.

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. FGF-2 as an autocrine growth for immortal human breast epithelial cells. *Cell Growth and Differentiation*, **5**, 615-623.

SPIVAK-KROIZMAN T., MOHAMMADI M., HU P., JAYE M., SCHLESSINGER J., LAX I., 1994 (a). Point mutation in the fibroblast growth factor receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14419-14423.

SPIVAK-KROIZMAN T., LEMMON M.A., DIKIC I., LADBURY J.E., PINCHASI D., HUANG J., JAYE M., CRUMLEY G., SCHLESSINGER J., LAX I., 1994 (b). Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation and cell proliferation. *Cell*, **79**, 1015-1024.

SPORN M.B., ROBERTS A.B., ROCHE N.S., AGECHINA H., SHUDO K., 1986. Mechanism of action of retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **15**, 756-764.

SPRINGER B.A., PANTOLIANO M.W., BARBERA F.A., GUNYUZLU P.L., THOMPSON L.D., HERBLIN W.F., ROSEFELD S.A., BOOK G.W., 1994. Identification and concerted function of two receptor binding surfaces on basic fibroblast growth factor required for mitogenesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26879-26884.

STAMPFER M.R., YASWEN P., ALHADEFF M., HOSODA J., 1993. TGFß induction of extracellular matrix associated proteins in normal and transformed human mammary epithelial cells in culture is independent of growth effects. *J. Cell. Physiol.*, **155**, 210-221.

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.

STETLER-STEVENSON W.G., BROWN P.D., ONISTO M., LEVY A.T., LIOTTA L.A., 1990. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and in human tumor tissue. *J. Biol. Chem.*, **265**, 13933-13938.

STEVENS S., ALIABADI Z., MOORE M.R., 1984. Associated effects of sodium butyrate on histone acetylation and estrogen receptor in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **119**, 132-138.

STEWART A.J., WESTLEY B.R., MAY F., 1992. Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br. J. Cancer*, **66**, 640-648.

STREULI C.H., SCHMIDHAUSER C., KOBRIN M., BISSEL M.J., DERYNCK R., 1993. Extracellular matrix regulates expression of the TGF-ß1 gene. *J. Cell Biol.*, **120**, 253-260.

STRICKLAND S., MADHAVI V., 1978. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*, **15**, 393-403.

STRICKLAND S., SMITH K.K., MAROTTI K.R., 1980. Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells : Generation of parietal endoderm by retinoic acid an dibutyryl cAMP. *Cell*, **21**, 347-355.

SUDLOW A.W., WILDE C.J., BURGOYNE R.D., 1994. Transforming growth factor-ß1 inhibits casein secretion from differentiating mammary-gland explants but not from lactating mammary cells. *Biochem. J.*, **304**, 333-336.

SUN L., WU G., WILLSON J.K.V., ZBOROWSKA E., YANG J., RAJKARUNANAYAKE I., WANG J., GENTRY L.E., WANG X., BRATTAIN M.G., 1994. Expression of transforming growth factor ß type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26449-26455.

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.

TAIPALE J., MATIKAINEN S., HURME M., KESKI-OJA J., 1994 (a). Induction of transforming growth factor ß1 and its receptor expression during myeloid leukemia cell differentiation. *Cell Growth and Differentiation*, **5**, 1309-1319.

TAIPALE J., MIYAZONO K., HELDIN C.H., 1994 (b). Latent transforming growth factor-ß1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGFß binding protein. *J. Cell Biol.*, **124**, 171-181.

TAKAHASHI J.A., MORI H., FUKUMOTO M., IGARASHI K., JAYE M., ODA Y., KIKUCHI H., HATANAKA M., 1990. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas : demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5710-5714.

TAKAHASHI K., SUZUKI K., KAWAHARA S., ONO T., 1989. Growth stimulation of human breast epithelial cells by basic fibroblast growth factor in serum-free medium. *Int. J. Cancer*, **43**, 870-874.

TAKAHASHI K., SUZUKI K., ONO T., 1990. Loss of growth inhibitory activity of TGFß toward normal human mammary epithelial cells grown within a collagen gel matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1239-1247

TAKANAMI I., TANAKA F., HASHIZUME T., KIKUCHI K., YAMAMOTO Y., YAMAMOTO T., KODAIRA S., 1996. The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas : an investigation of their expression as a prognostic markers. *Eur. J. Cancer*, **32**, 1504-1509.

TAKEI Y., KUROBE M., UCHIDA A., HAYASHI K., 1994. Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in breast cancer. *Clinical Chem.*, **40**, 1980-1981.

TAKETANI Y., OKA T., 1983. Epidermal growth factor stimulates cell proliferation and inhibits functional differentiation of mouse mammary epithelial cells in culture. *Endocrinology*, **113**, 871-877.

TAKEUCHI J., SOBUE M., SATO E., SHAMOTO M., MIURA K., NAKAGAKI S., 1976. Variation in glycosaminoglycan components of breast tumors. *Cancer Res.*, **36**, 2133-2139.

TANAKA A., MIYAMOTA K., MINAMINO N., TAKEDA M., SATO B., MATSUO H., MATSUMOTO K., 1992. Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependant growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 8928-8932.

TAPIOVAARA H., MATIKAINEN S., HURME M., VAHERI A., 1994. Induction of differentiation of promyelocytic NB4 cells by retinoic acid is associated vith rapid increase in urokinase activity subsequently downregulated by production of inhibitors. *Blood*, **83**, 1883-1891.

TARDIEU M., GAMBY C., AVRAMOGLOU T., JOZEFONVICZ J., BARRITAULT D., 1992. Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators and protectors of acidic or basic FGF. *J. Cell Physiol.*, **150**, 194-203.

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.

TEMPLETON T.J., HAUSCHKA S.D., 1992. FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high affinity receptor, FGF-R1. *Dev. Biol.*, **154**, 169-181.

TESTA U., MASCIULLI R., TRITARELLI E., PUSTORINO R., MARIANI G., MARTUCCI R., BARBERI T., CAMAGNA A., VALTIERI M., PESCHLE C., 1993.Transforming growth factor-ß potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *J. Immunol.*, **150**, 2418-2430.

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. *Oncogenes*, **4**, 915-922.

THEILLET C., ADELAIDE J., LOUASON G., BONNET-DORION F., JACQUEMIER J., ADNANE J., LONGY M., KATSAROS D., SISMONDI P., GAUDRAY P., BIRNBAUM D., 1993. FGFR-1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chrom. Cancer*, **7**, 219-226.

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.

THOMPSON L.D., PANTOLIANO M.W., SPRINGER B.A., 1994. Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction : identification of the heparin binding domain. *Biochemistry*, **33**, 3831-3840.

TIMAR J., MOCZAR E., TIMAR F., PAL K., KOPPER L., LAPIS K., JENEY A., 1987. Comparative study on Lewis lung tumor cell lines with low and high metastatic capacity. II : cytochemical and biochemical evidence for differences in glycosaminoglycans. *Clin. Exp. Metastasis*, **5**, 79-87.

TIMAR J., DICZHAZI C., BARTHA I., POGANY G., PAKU S., RASO E., TOVARI J., LADANYI A., LAPIS K., KOPPER L., JENEY A., 1995. Modulation of heparan sulfate/chondroitin sulfate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic tumor cells. *Int. J. Cancer*, **62**, 755-761.

TO A., COLEMAN D.V., DEARNALY J.P., ORMEROD M.G., STEELE K., NEVILLE A.M., 1981. Use of antisera to epithelial membrane antigen for the cytodiagnosis of malignancy in serous effusions. *J. Clin. Pathol.*, **34**, 1326-1332.

TOGARI A., BAKER D., DICKENS G., GUROFF G., 1983. The neurite promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **114**, 1189-1193.

TOGARI A., DICKENS G., KUZUYA H., GUROFF G., 1985. The effect of fibroblast growth factor on PC 12 cells. *J. Neurosci.*, **5**, 307-316.

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.

TONELLI Q.J., SOROF S., 1980. Epidermal growth factor requirement for development of cultured mammary gland. *Nature*, **285**, 250-252.

TORRISI R., PENSA F., ORENGO M.A., CATSAFADOS E., PONZANI P., BOCCARDO F., COSTA A., DECENSI A., 1993. The synthetic retinoid Fenretinide lowers plasma insulin-like growth factor I levels in breast cancer patients. *Cancer Res.*, **53**, 4769-4771.

TRAVERS M.T., BARRETT-LEE P.J., BERGER U., LUQMANI Y.A., GAZET J.C., POWLES T.J., COOMBES R.C., 1988. Growth factor expression in normal, benign, and malignant breast tissue. *Br. Med. J.*, **296**, 1621-1624.

TSAO D., MORITA A., BELLA A.Jr., LUU P., KIM Y.S., 1982. Differential effects of sodium butyrate, dimethyl sulfoxyde, and retinoïc acid on membrane-associated antigen, enzymes, and glycoproteins of human rectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, **42**, 1052-1058.

TSUBOI R., SATO C., KURITA Y., RON D., RUBIN J.S., OGAWA H., 1993. Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of human normal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 49-53.

TURLEY J.M., FUNAKOSHI S., RUSCETTI F.W., KASPER J., MURPHY W.J., LONGO D.L., BIRCHENALL-ROBERTS M.C., 1995. Growth inhibition and apoptosis of RL human B lymphoma cells by vitamin E succinate and retinoic acid : role for transforming growth factor ß. *Cell Growth and Differentiation*, **6**, 655-663.

TURNBULL J.E., FERNIG D.G., KE Y., WILKINSON M.C., GALLAGHER J.T., 1992. Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10337-10341.

UEDA H., TAKENAWA T., MILLAN J.C., GESELL M.S., BRANDES D., 1980. The effects of retinoids on proliferative capacities and macromolecular synthesis in human breast cancer MCF-7 cells. *Cancer*, **46**, 2203-2209.

ULRICH 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. Astrogial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5459-5463.

VALVERIUS E.M., WALKER-JONES D., BATES S.E., STAMPFER M.R., CLARK R., McCORMICK F., DICKSON R.B., LIPPMAN M.E., 1989. Production and responsiveness to transforming growth factor-ß in normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, **49**, 6269-6274.

VAN DER BURG B., VAN DER LEEDE B.M., KWAKKENBOX-ISBRUCKER L., SALVERDA S., DE LAAT S.W., VAN DER SAAG P.T., 1993. Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **91**, 149-157.

VANDEWALLE B., HORNEZ H., REVILLION F., LEFEBVRE J., 1991. Cyclic AMP stimulation of transferrin secretion by breast cancer cell grown on extracellular matrix or in two-compartment culture chambers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **177**, 1041-1048.

VARANI J., BURMEISTER B., SITRIN R.G., SHOLLENBERGER S.B., INMAN D.R., FLIGIEL S.E.G., GIBBS D.F., JOHNSON K., 1994. Expression of serine proteinases and metalloproteinases in organ-cultured human skin. Altered levels in the presence of retinoic acid and possible relationship to retinoid-induced loss of epidermal cohesion. *Am. J. Pathol.*, **145**, 561-573.

VEOMETT G., KUSZYNSKI C., KAZAKOFF P., RIZZINO A., 1989. Cell density regulate the number of cell surface receptors for fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **159**, 694-700.

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.

VIVIEN D., REDINI F., GALERA P., LEBRUN E., LOYAU G., PUJOL J.P., 1993. Rabbit articular chondrocytes (RAC) express distinct transforming growth factor-ß receptor phenotypes as a function of cell cycle phases. *Exp. Cell Res.*, **205**, 165-170.

VLODAVSKY I., FUKS Z., BAR-NER M., ARIAV Y., SCHIRRMACHER V., 1983. Lymphoma cell mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix : relationship to tumour cell metastasis. *Cancer Res.*, **43**, 2704-2711.

VLODAVSKY I., FRIDMAN R., SULLIVAN R., SASSE J., KLAGSBRUN M., 1987. Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J.Cell. Physiol.*, **131**, 402-408.

VLODAVSKY I., BAR-SHAVIT R., ISHAI-MICHAELI R., BASHKIN P., FUKS Z., 1990. Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor : a regulatory mechanism ? *Cancer and metastasis Reviews*, **9**, 203-226.

VLODAVSKY I., FUKS Z., ISHAI-MICHAELI R., BASHKIN P., LEVI A., KORNER G., BAR-SHAVIT R., KLAGSBRUN M., 1991. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor : implication for the control of angiogenesis. *J. Cell. Biochem.*, **45**, 167-176.

VLODAVSKY I., KORNER G., ISHAI-MICHAELI R., BASHKIN P., BAR-SHAVIT R., FUKS Z., 1991. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes : possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *TIBS*, **16**, 268-271.

VOGEL C., ABEL J., 1995. Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on growth factor expression in the human breast cancer cell line MCF-7. *Arch. Toxicol.*, **69**, 259-265.

VON DEN HOFF H.W., DE KONING M.H., VAN KAMPEN G.P., VAN DER KORST J.K., 1994. Transforming growth factor-beta stimulates retinoic acid-induced proteoglycan depletion in intact articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **313**, 241-247.

VONDERHAAR B.K., 1984. Hormone and growth factors in mammary gland development. *In : Veneziale CM, ed. Control of cell growth and proliferation. Princeton, NJ : Van Nostrand-Reinhold*, pages 11 à 33.

VONDERHAAR B.K., 1987. Local effects of EGF, α-TGF and EGF-like growth factors on lobulo-alveolar development in the mouse mammary gland *in vivo. J. Cell. Physiol.*, **132**, 581-584.

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 C., VIEDT C., BURGER A., FILSINGER S., KRAMER M., HANSCH G.M., 1996. Interaction of transforming growth factor ß1 with human glomerular epithelial cells in culture : opposite effects on synthesis of matrix proteins and on urokinase plasminogen activator. *J. Mol. Med.*, **74**, 149-154.

WAKEFIELD L.M., COLLETTA A.A., McCUNE B.K., SPORN M.B., 1991. Roles for transforming growth factors-ß in the genesis, prevention, and treatment of breast cancer. *In Genes, Oncogenes, and Hormones : Advances in cellular and molecular biology of breast cancer. Dickson and Lippman (eds)*, pages 96 à 136.

WALICKE P.A., 1988. Interactions between basic fibroblast growth factor (FGF) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Developmental Neurobiology*, **102**, 144-148.

WALICKE P.A., FEIGE J.J., BAIRD A., 1989. Characterization of the neuronal receptor for basic fibroblast growth factor and comparison to receptor on mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4120-4126.

WALICKE P.A., BAIRD A., 1991. Internalization and processing of basic fibroblast growth factor by neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, **11**, 2249-2258.

WALKER R.A., DEARING S.J., 1992. Transforming growth factor ß1 in ductal carcinoma *in situ* and invasive carcinoma in the breast. *Eur. J. cancer*, **28**, 641-644.

WALKER-JONES D., VALVERIUS E.M., STAMPFER M.R., LIPPMAN M.E., DICKSON R.B., 1989. Stimulation of epithelial membrane antigen expression by transforming growth factor-ß in normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, **49**, 6407-6411.

WANG J., HAN W., ZBOROWSKA E., LIANG J., WANG X.,WILLSON J.K.V., SUN L., BRATTAIN M.G., 1996. Reduced expression of transforming growth factor ß type I receptor contributes to the malignancy of human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 17366-17371.

WANG J.K., GAO G., GOLDFARB M., 1994. Fibroblast growth factor receptors have different signalling and mitogenic potentials. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 181-188.

WANG Y., SELDEN A.C., MORGAN N., STAMP G., HODGSON H.J.F., 1994. Hepatocyte growth factor expression in human mammary epithelium. *Am. J. Pathol.*, **144**, 675-682.

WARREL R.P.Jr., FRANKET S.R., MILLER W.H.Jr., SCHEINBERG D.A., ITRI L.M., HITTELMEN W.N., VYAS R., ANDREREFF M., TAFURI A., JAKUBOWSKI A., GALIBROVE J., GORDON M., DMITROVSKY E., 1991. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (*all-trans* retinoic acid). *N. engl. J. Med.*, **324**, 1385-1393.

WEBB M., GRAHAM C., WALSH F., 1986. Neuronal differentiation of cloned human teratoma cells in response to retinoic acid *in vitro*. *J. Neuroimmunol.*, **11**, 67-86.

WELCH D.R., FABRA A., NAKAJIMA M., 1990. Transforming growth factor ß stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7678-7682.

WELLSTEIN A., ZUGMAIER J.A., CALIFANO III J.A., KERN F., PAIK S., LIPPMAN M.E., 1991. Tumor growth dependent on Kaposi's sarcoma-derived fibroblast growth factor inhibited by pentosan polysulfate. *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 716-720.

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.

WHAL S.M., HUNT D.A., WAKEFIELD L.M., McCARTNEY-FRANCIS N., WAHL L.M., ROBERTS A.B., SPORN M.B., 1987. Transforming growth factor type ß induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5788-5792.

WHITSETT J.A., WEAVER T.E., LIEBERMAN M.A., CLARK J.C., DAUGHERTY C., 1987. Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-ß on synthesis of Mr = 35,000 surfactant associated protein in fetal lung. *J. Biol. Chem.*, **262**, 7908-7913.

WIKNER N.E., ELDER J.T., PERSICHITTE K.A., MINK P., CLARK R.A., 1990. Transforming growth factor-beta modulates plasminogen activator activity and plasminogen activator inhibitor type-1 expression in human keratinocytes *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 607-613.

WILCOX K., HIGGINS J., BERTRAM T.A., 1992. Colonic epithelial cell proliferation in a rat model of nongenotoxin-induced colonic neoplasia. *Lab. Invest.*, **67**, 405-411.

WILKINSON M.C., GARDNER M.J., GOULD P.W., TAYLOR B.A., FERNIG D.G., 1993. Normal and malignant human colonic mucosa contain acidic and basic fibroblast growth factors. *Int. J. Oncol.*, **3**, 933-936.

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.

WOODWARD T. L., DUMONT N., O'CONNOR-McCOURT M., TURNER J.D., PHILIP A., 1995. Characterization of transforming growth factor-ß growth regulatory effects and receptors on bovine mammary cells. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 339-348.

WRANA J.L., ATTISANO L., WIESER R., VENTURA F., MASSAGUE J., 1994. Mechanism of activation of the TGFß receptor. *Nature*, **370**, 341-347.

XIN X., JOHNSON A.D., SCOTT-BURDEN T., ENGLER D., CASSCELLS W., 1994. The predominant form of fibroblast growth factor receptor expressed by proliferating human arterial smooth muscle cells in culture is type I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 557-564.

XUE S., RAO P.N., 1981. Sodium butyrate blocks Hela cells preferentially in early G1 phase of the cell cycle. *J. Cell. Sci.*, **51**, 163-171.

YAMAGUCHI F., SAYA H., BRUNER J.M., MORISSON 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.

YAMAMOTO T., KOMURA H., MORISHIGE K., TADOKORO C., SAKATA M., KURACHI H., MIYAKE A., 1994. Involvement of autocrine mechanism of transforming growth factor-ß in the functional differentiation of pregnant mouse mammary gland. *Eur. J. Endocrinol.*, **130**, 302-307.

YAMASHITA H., ICHIJO H., GUMSBRY S., MOREN A., TENDIJKE P., MIYAZONO K., 1994. Endoglin forms a heterodimeric complex with the signalling receptors for transforming growth factor-ß. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1995-2001.

YAMASHITA J.I., INADA K., OGAWA M., 1992. Plasminogen activators in breast cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **1**, 683-686.

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., NIKOLAROPOLOUS S., McKEEHAN W., 1993. Exon switching and activation of stromal and embryonic FGF-FGFR receptor genes in prostate epithelial cells accompagny stromal independence and malignancy. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4513-4522.

YANAGISHITA M., MIDURA R.J., HASCALL V.C., 1987. proteoglycans : isolation and purification from tissue cultures. *Meth. Enzymol.*, **138**, 279-287.

YANAGISHITA M., HASCALL V.C., 1992. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9451-9454.

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 gowth factor to its high affinity receptor. *Cell*, **64**, 841-848.

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.

YEOMAN L.C., 1993. An autocrine model for cell and matrix associated fibroblast growth factor. *Oncology Res.*, **5**, 489-499.

YU H., SCHULTZ R., 1991. Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B 16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. *Cancer Res.*, **50**, 7623-7633.

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.

ZELENT A., KRUST A., PETKOVICH M., KASTNER P., CHAMBON P., 1989. Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature*, **339**, 714-717.

ZELENT A., MENDELSHON C., KASTNER P., KRUST A., GARNIER J.M., RUFFENACH F., LEROY P., CHAMBON P., 1991. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.*, **10**, 71-81.

ZHAN X., BATES B., HU X., GOLDFARB M., 1988. The human FGF-5 gene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3487-3495.

ZHANG J., COUSENS L.S., BARR P.J., SPRANG S.R., 1991. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1β. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3446-3450.

ZHANG X., LIU Y., LEE M., 1996. Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. *Mutation Res.*, **350**, 267-277.

ZIONCHECK T.F., RICHARDSON L., LIU J., CHANG L., KING K.L., BENNETT G.L., FUGEDI P., CHAMOV S.M., SCHWALL R.H., STACK R.J., 1995. Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16871-16878.

ZUGMAIER G., ENNIS B.W., DESCHAUER B., KATZ D., KNABBE C., WILDING G., DALY P., LIPPMAN M.E., DICKSON R.B., 1989. Transforming growth factor type ß1 and ß2 are equipotent inhibitors of human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 353-361.

ZUGMAIER G., PAIK S., WILDING G., KNABBE C., BANO M., LUPU R., DESCHAUER B., SIMPSON S., DICKSON R., LIPPMAN M., 1991. Transforming growth factor-ß1 induces cachexia and systemic fibrosis without an antitumor effect in nude mice. *Cancer Res.*, **51**, 3590-3594.

ABREVIATIONS

aa : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : adénosine-monophosphate-cyclique
ARN : acide ribonucléique
cpm : coups par minute
CS : chondroitine sulfate
CSPG : protéoglycane de type chondroitine sulfate
D.O : densité optique
EDTA : éthylènediamine tétra-acétate
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : récepteur de l'EGF
ELISA : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
EMA : Epithelial Membrane Antigen ou épisialine
EMEM : Eagle Minimum Essential Medium
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : récepteur des FGF
GAG : glycosaminoglycane
GlcA : acide glucuronique
GlcNAc : N-acétyl glucosamine
GlcNSO3 : glucosamine N-sulfatée
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HS : héparane sulfate
HSPG : protéoglycane de type héparane sulfate
ICC : Immunocytochimie
IdoA : acide iduronique
IGF : Insulin-like Growth Factor
IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein
Kd : constante de dissociation
kDa : kiloDalton
KGF : Keratinocyte Growth Factor
LAP : Latency-Associated Peptide
LTBP : Latent TGFß Binding Protein
MDGF1 : Mammary Derived Growth Factor 1
MDGI : Mammary Derived Growth Inhibitor

NaB : butyrate de sodium
NGF : Nerve Growth Factor
PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS : Phosphate Buffer saline
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PG : protéoglycane
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PMSF : ParaMethylSulfonyl Fluoride
RA : acide rétinoïque *tout trans*
RAR : récepteur de l'acide rétinoïque
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
RXR : récepteur X des rétinoïdes
SAB : sérum-albumine bovine
SVF : sérum de veau foetal
TBS : Tampon Tris/HCl
TGFα : Transforming Growth Factor α
TGFß : Transforming Growth Factor ß
TGFßR : Récepteur du TGFß
TNFα : Tumor Necrosis Factor α
TUT : Tampon Urée Triton
uPA : activateur du plasminogène de type urokinase
uPA-R : récepteur de l'uPA

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN.
BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
LILLE