

the 80 000 816

50376
2000
430

N° d'ordre : 2839

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART



**APPORT DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE A L'ETUDE DE
LA SIGNALISATION DU FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2
DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN**

Soutenue le 16 Novembre 2000 devant la commission d'examen :

Président : Pr Bénoni BOILLY
Rapporteurs : Dr Roland CHARLIONET
Dr David FERNIG
Examineurs : Dr Jean-Claude MICHALSKI
Dr Jean-Phillipe PEYRAT
Dr Françoise VIGNON
Directeur de thèse : Pr Hubert HONDERMARCK

A mes parents,

Pour leur soutien, leurs encouragements et leur confiance

A David,

Pour son amour

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie du Développement dirigé par Monsieur le Professeur Xavier Desbiens, que je remercie pour son accueil, dans le groupe “Facteurs de Croissance” sous la direction de Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck, et en collaboration avec le Laboratoire d’Oncologie Moléculaire Humaine dirigé par Monsieur le Docteur Jean-Philippe Peyrat.

Je remercie Monsieur le Professeur Bénoni Boilly de me faire l’honneur de présider cette thèse. Un grand merci également de m’avoir accueillie dans votre laboratoire lors de mon DEA, pour les discussions scientifiques enrichissantes et pour les conseils avisés en matière de pédagogie.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur le Docteur Roland Charlionet et Monsieur le Docteur David Fernig d’avoir accepté d’être les rapporteurs de mon travail de thèse malgré leurs nombreuses occupations et d’avoir trouver du temps pour l’analyse et la critique de ces travaux.

Je remercie également vivement Madame le Docteur Françoise Vignon et Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski d’avoir accepté d’être les examinateurs de ma thèse et pour l’intérêt qu’ils manifestent pour ce travail.

J’exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur Jean-Philippe Peyrat pour sa codirection de ma thèse et de mon DEA, et pour sa présence au sein de ce jury en tant qu’examineur. Je tiens à vous remercier pour votre précieuse collaboration tout au long de ces cinq années, pour le soutien matériel, la rigueur scientifique et le jugement critique que vous avez apportés à ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Professeur Hubert Hondermarck pour son encadrement scientifique de qualité. Merci de m’avoir guidée et encouragée tout au long de ces années, avec un optimisme et un humour à toute épreuve.

J’adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Jérôme Lemoine du Laboratoire de Chimie Biologique (UMR 8576 du CNRS) pour son étroite collaboration et son soutien scientifique en spectrométrie de masse. Un grand merci également à Xavier Czeszak, pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

Enfin, je remercie toutes les personnes du Laboratoire de Biologie du Développement et du bâtiment SN3 qui, de près ou de loin, m’ont aidée à réaliser cette thèse et m’ont apporté leurs connaissances scientifiques, leur aide, leur sympathie et leur amitié.

Et en particulier,

mes supers voisins de bureau, Simon Descamps et Laurent Dollé, pour leur gentillesse et leur amitié,

Sylviane Derache, pour son aide au quotidien et son énergie débordante,

Loïc Brunet pour son aide lors de la préparation des figures et des diapositives,

Séverine, Ikram, Isabelle, Valérie P, et mes voisins de table lors de nos sympathiques

“pique-niques” du midi,

et tous les autres,

Merci à tous.

Ce travail de thèse a donné lieu à la publication d'articles et à des communications scientifiques suivants :

PUBLICATIONS

- ◆ Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Smart CE, Nurcombe V, Boilly B, Peyrat JP et Hondermarck H (2000). The mitogenic signaling pathway for fibroblast growth factor-2 involves tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett.*, 478 : 209-215.
- ◆ Vercoutter-Edouart AS, Czeszak X, Crépin M, Lemoine J, Le Bourhis X, Peyrat JP et Hondermarck H. (2000) Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.*, sous presse.
- ◆ Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Le Bourhis X, Hornez L, Boilly B, Nurcombe V, Révillion F, Peyrat JP et Hondermarck H. Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. Soumis à publication.
- ◆ Hondermarck H, Peyrat JP, Scaps P, Jaruga E, Vercoutter AS, Boilly B (1996). Analyse par électrophorèse bidimensionnelle des protéines de cellules de cancer du sein MCF-7. Modifications de synthèse induites par le FGF-2. *Bull Cancer* , 83 : 837-841.
- ◆ Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, and Le Bourhis X. (2000) FGF signals for cell proliferation and migration through distinct pathway. *Cytokine Growth Factor Review*, 11: 295-302.

COMMUNICATIONS

- ◆ Vercoutter AS, Lemoine J, Peyrat JP, Verbert A, Boilly B et Hondermarck H (1997). Identification de protéines spécifiques des cellules épithéliales mammaires cancéreuses versus normales par électrophorèse 2D puis MALDI-MS. *14èmes journées françaises de Spectrométrie de Masse*, Septembre 1997 à Lille.

- ◆ Vercoutter AS, Lemoine J, Boilly B, Peyrat JP, et Hondermarck H (1998). Tyrosine-phosphorylation de la cycline D2 induite par le FGF-2 dans les cellules de cancer du sein MCF-7. *Club Facteurs de Croissance*, Février 1998 à Villejuif.

- ◆ Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Lebourhis X, Boilly B, Peyrat JP et Hondermarck H (1999). 2D electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analyses of cancer versus normal breast epithelial cells. *Congrès de l'« American Association for Cancer Research »*, Avril 1999 à Philadelphia, Etats-Unis.

- ◆ Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Lebourhis X, Boilly B, Peyrat JP et Hondermarck H (1999). Proteomic analysis of cancer and normal breast epithelial cells. *Congrès de « Biology of the mammary gland »*, Septembre 1999 à Tours.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : LES FGFs ET LEURS RECEPTEURS

I- LES FGFs.....	1
I.1/ Caractéristiques structurales des FGFs.....	3
I.2/ Effets biologiques des FGFs.....	6
II- LES RECEPTEURS DES FGFs.....	14
II.1/ Les récepteurs de haute affinité.....	14
II.2/ Les récepteurs de basse affinité.....	24
III- INTERACTION DU FGF AVEC SES RECEPTEURS.....	30
III.1/ Les récepteurs de haute affinité.....	30
III.2/ Les sites de basse affinité	33
IV- SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES FGFs.....	35
IV.1/ Les protéines adaptatrices.....	36
IV.2/ Les protéines à activité enzymatique.....	41
IV.3/ La voie Ras/Raf/MAPK.....	46

CHAPITRE 2 : IMPLICATION DES FGFs ET DE LEURS RECEPTEURS DANS LE CANCER DU SEIN

I- GENERALITES.....	53
I.1/ Structure et développement de la glande mammaire.....	53
I.2/ Le cancer du sein.....	54
I.3/ Rôles des facteurs de croissance dans la prolifération des cellules épithéliales mammaires.....	55
II- LES FGFs ET LEURS RECEPTEURS DANS LE SEIN.....	60
II.1/ Les FGFs.....	60
II.2/ Les récepteurs des FGFs.....	65

CHAPITRE 3 : L'ANALYSE PROTEOMIQUE

I- POURQUOI L'ANALYSE PROTEOMIQUE ?	69
II- PRINCIPE	71
II.1/ Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.....	71
II.2/ Analyse informatisée des gels 2D.....	74
II.3/ Identification des protéines présentes dans les gels 2D : Analyse par spectrométrie de masse.....	75
II.4/ Limites de l'analyse protéomique.....	78
III- APPLICATIONS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE	80
III.1/ En biologie.....	80
III.2/ En biomédecine.....	82
III.3/ En pharmacologie.....	86

MATERIELS ET METHODES

I-CULTURE CELLULAIRE	89
I.1/ Les lignées cellulaires.....	89
I.2/ Entretien des cultures de cellules épithéliales mammaires.....	89
I.3/ Etude de la prolifération par comptage cellulaire.....	90
I.4/ Incorporation de thymidine tritiée.....	90
II- ETUDE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU FGF2	91
II.1/ Préparation et extraction des protéines.....	91
II.2/ Immunoprécipitation.....	92
II.3/ Séparation des protéines par SDS-PAGE et transfert sur membrane.....	92
II.4/ Immunodétection des protéines.....	93
II.5/ Dosage de l'activité kinasique de Src.....	93
III-ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	94
III.1/ Préparation des échantillons	94
III.2/ Electrophorèse bidimensionnelle analytique.....	95
III.3/ Electrophorèse bidimensionnelle préparative.....	98
IV- CARACTERISATION DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	99
IV.1/ Réduction et alkylation.....	99

IV.2/ Digestion enzymatique.....	100
IV.3/ Micropurification des hydrolysats tryptiques.....	101
IV.4/ Spectrométrie de masse en mode MALDI.....	101
IV.5/ Spectrométrie de masse en tandem en mode nanospray (nanospray MS-MS).....	102
IV.6/ Recherche dans les banques de données.....	102

RESULTATS

I- ARTICLE 1 : “Proteome analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells.”	104
II- ARTICLE 2 : “The mitogenic signaling pathway for fibroblast growth factor-2 involves the tyrosine-phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells.”	129
III- ARTICLE 3 : “Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells.”....	138

DISCUSSION GENERALE 169

BIBLIOGRAPHIE 182

ANNEXES

I- FGF signals for cell proliferation and migration through different pathway.....	240
II- Tableau 11 : Caractéristiques des protéines de cellules épithéliales mammaires identifiées par spectrométrie de masse.....	249
III- Liste des acides aminés essentiels.....	252

INDEX DES FIGURES et TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1 :	Caractéristiques générales des FGFs.....	2
Figure 1 :	FGF-2 humain, de l'ARNm à la protéine.....	3
Figure 2 :	Structure en feuillets beta du FGF-2.	5
Tableau 2 :	Activité transformante in vitro et in vivo de différents FGFs.....	10
Figure 3 :	Structure générale du FGFR.....	13
Figure 4 :	Diversité des isoformes des FGFRs.....	14
Tableau 3 :	Activités mitogènes relatives des FGF-1 à FGF-9.....	22
Figure 5 :	Représentation tridimensionnelle des sites primaires et secondaires d'interaction du FGF-2 avec le FGFR.....	30
Figure 6 :	Modèle moléculaire du complexe du FGF-2 avec ses récepteurs.....	31
Figure 7 :	Localisation des différents sites d'interaction à la surface des molécules de FGF-2 et du FGFR1.....	32
Figure 8 :	Organisation structurale des protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation du FGF.....	36
Figure 9 :	Cycle d'activation de la protéine Ras.....	46
Figure 10 :	Activation de la protéine kinase Raf.....	47
Figure 11 :	Signalisation intracellulaire du FGF.....	48
Figure 12 :	Activation des facteurs de transcription après translocation nucléaire des MAPK.....	49
Figure 13 :	Régulation de la croissance des cellules épithéliales mammaires cancéreuses.....	59
Tableau 4 :	Expression des FGF-1 à FGF-9 dans les cellules épithéliales mammaires normales, cancéreuses ou immortalisées.....	62
Tableau 5 :	Expression des FGFR1, R2, R3 et R4 dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses ou immortalisées.....	68
Figure 14 :	Positionnement de l'analyse protéomique dans le contexte de la génomique et de la transcriptomique.....	70
Figure 15 :	Principe de l'analyse protéomique.....	71
Figure 16 :	Principe de l'ionisation en mode MALDI.....	76
Figure 17 :	Principe de l'ionisation en mode électrospray.....	76
Figure 18 :	Schéma d'un spectromètre de masse en tandem.....	77
Tableau 6 :	Caractérisation de nouveaux marqueurs potentiels dans diverses pathologies par analyse protéomique.....	83

MATERIELS & METHODES

Tableau 7 :	Liste des inhibiteurs utilisés.....	90
Tableau 8 :	Résumé des anticorps primaires utilisés.....	92
Tableau 9 :	Volumes des solutions pour les gels SDS-PAGE de différentes réticulations.....	92
Tableau 10 :	Résumé des anticorps secondaires utilisés.....	93

DISCUSSION GENERALE

Figure 19 :	Apport de l'analyse protéomique à l'étude de la signalisation intracellulaire du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein.....	178
--------------------	---	-----

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1

LES FGFS ET LEURS RECEPTEURS

I/ LES FGFS

La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) comprend aujourd'hui 21 membres structurellement apparentés et possédant une masse moléculaire comprise entre 17 et 34 kDa. Le tableau 1 résume les caractéristiques générales des FGFs. Les FGF-11 à -14 sont également connus sous le nom de FGF homologous factors (FHF) -1 à -4, respectivement. Ces FGFs sont exprimés préférentiellement dans le système nerveux chez la souris et le poulet (Smallwood et al, 1996; Munoz-Sanjuan et al, 1999), et possèdent entre eux une homologie de séquence de 60 à 70 %, contre 30 à 50% avec les autres FGFs. Les deux membres les plus étudiés restent le FGF-1 ou FGF acide et le FGF-2 ou FGF basique, dont le taux d'homologie de la séquence protéique est de l'ordre de 55%. *In vivo*, ces molécules sont impliquées dans des processus physiologiques primordiaux, tels que le développement embryonnaire et foetal, l'angiogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaires, ou encore la réparation des tissus. Des études *in vitro* ont montré que ces facteurs de croissance sont mitogènes pour des cellules d'origine mésodermique et neurodermique, mais également pour des cellules ectodermiques et endodermiques. Ils ont aussi un rôle modulateur dans la différenciation, la migration et la survie cellulaires. Dans cette partie, nous présenterons les caractéristiques structurales du gène et de la protéine FGF-2 avant de décrire les effets biologiques de cette famille de facteurs de croissance.

Tableau 1 : Caractéristiques générales des FGFs (FGF-1 à FGF-21). Sont indiqués le nombre d'acides aminés pour chaque FGF (colonne 1*) et leur localisation chromosomique chez l'homme lorsque celle-ci a été déterminée. Les principales caractéristiques des FGFs sont reportées, sachant que pour le FGF-1 et le FGF-2, les nombreuses données disponibles seront décrites ultérieurement. (2) Le FGF-15 qui est trouvé chez la souris correspond au FGF-19 chez l'homme. KGF, Keratinocyte Growth Factor; AIGF, Androgen-Induced Growth Factor; GAF, Glial-associated Factor; FHF, FGF Homologous Factor.

FGF	(1)*	Localisation chromosomique	CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES FGFs
FGF-1 (aFGF)	155	5q31-33 Mergia et al, 1986	• pas de signal de sécrétion.
FGF-2 (bFGF)	155, 196, 210	4q25 Mergia et al, 1986	• pas de signal de sécrétion.
FGF-3 (int2)	245, 274	11q13 Yoshida et al, 1988	• expression importante dans les dérivés de l'endoderme primitif (Jakobovits et al, 1986). Il n'est pas détecté dans les tissus adultes.
FGF-4 (hst-1)	206	11q13 Yoshida et al, 1988	• isolé d'une tumeur d'estomac chez l'homme et du sarcome de Kaposi. Son expression est limitée à certains stades du développement.
FGF-5	268	4q21 Nguyen et al, 1988	• isolé dans le cerveau néonatal humain (Zhan et al, 1988). Il est fortement exprimé durant l'embryogénèse chez la souris (Herbert et al, 1990).
FGF-6 (hst-2)	198	12p13 Marics et al, 1989	• rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules musculaires (Pizette et al, 1996).
FGF-7 (KGF)	194	15q15-21.1	• produit par les fibroblastes, c'est un facteur exclusivement mitogène pour les cellules épithéliales via le KGFR ou FGFR2(IIIb) (Yan et al, 1993b).
FGF-8 (AIGF)	215	10q24 Payson et al, 1996	• isolé d'une lignée cellulaire d'un carcinome mammaire de souris androgéno-dépendant (Tanaka et al, 1992). Rôles dans la gastrulation, le développement cérébral et la morphogénèse des membres et de la face.
FGF-9 (GAF)	208	13q11-q12 Mattei et al, 1995	• isolé d'un gliome humain (Naruo et al, 1993). Rôle dans le développement squelettique et cérébral. Il possède un signal de sécrétion non-clivé (Revest et al, 2000).
FGF-10	215	5p12-p13 Emoto et al, 1997	• homologue du FGF-7. Etroite régulation fonctionnelle avec le FGF-8. Rôle dans la formation des poumons et d'initiateur des bourgeons de membres (Ohuchi et al, 1997; Sekine et al, 1999).
FGF-11 (FHF-1)	243	17p12-p13 Verdier et al, 1997	• ND
FGF-12 (FHF-2)	241	3q28 Verdier et al, 1997	• expression dans l'embryon de souris au niveau des membres, du myocarde et du système nerveux central (Hartung et al, 1997).
FGF-13 (FHF-3)	216	Xq21 Lovec et al, 1997	• forte homologie avec le FGF-8 (70%) (Greene et al, 1998). Rôle dans le système nerveux central (prolifération et différenciation des neurones) (Hartung et al, 1997).
FGF-14 (FHF-4)	247	ND	• expression embryonnaire dans le cerveau, les artères, le thymus et la corde (Wang et al, 2000).
FGF-15 ⁽²⁾	ND	ND	• expression restreinte dans le développement du système nerveux (McWhirter et al, 1997).
FGF-16	207 (rat)	ND	• forte homologie avec le FGF-9 (73%) et pas de signal de sécrétion (Miyake et al, 1998). Chez l'embryon, il est exprimé surtout dans les adipocytes (Miyake et al, 1998) où son action mitogène autocrine se fait <i>via</i> le FGFR4 (Konishi et al, 2000). Chez l'adulte, il est exprimé préférentiellement dans le coeur.
FGF-17	216 (rat)	14 (souris) Xu et al, 1999	• dans l'embryon de souris, il est exprimé dans le système nerveux central, le squelette (cartilage) et le système vasculaire (Xu et al, 1999).
FGF-18	ND	14p11 Hu et al, 1999	• expression embryonnaire dans le coeur, le muscle squelettique, et le pancréas (Hu et al, 1999). Chez l'adulte, expression préférentielle dans les poumons (Ohbayashi et al, 1998). Il est capable de stimuler la prolifération des cellules intestinales et hépatiques (Hu et al, 1998).
FGF-19 ⁽²⁾	ND	11q13.1 Xie et al, 1999	• fixation exclusive sur le FGFR4 (Xie et al, 1999). Chez le foetus, il est exprimé dans le cartilage, la peau et la rétine.
FGF-20	211	8p21.3-p22 Kirikoshi et al, 2000	• phylogénétiquement proche du FGF-9 (71,6%) et du FGF-16 (66,2%). Il ne porte pas de séquence signal de sécrétion typique. Il est faiblement exprimé dans les tissus humains foetaux et dans des cancers primaires (Kirikoshi et al, 2000).
FGF-21	209	ND	• 35% d'homologie avec le FGF-19. Il possède un peptide signal de sécrétion en N-terminal. Chez la souris adulte, il est exprimé préférentiellement dans le foie et le thymus (Nishimura et al, 2000).

Tableau 1

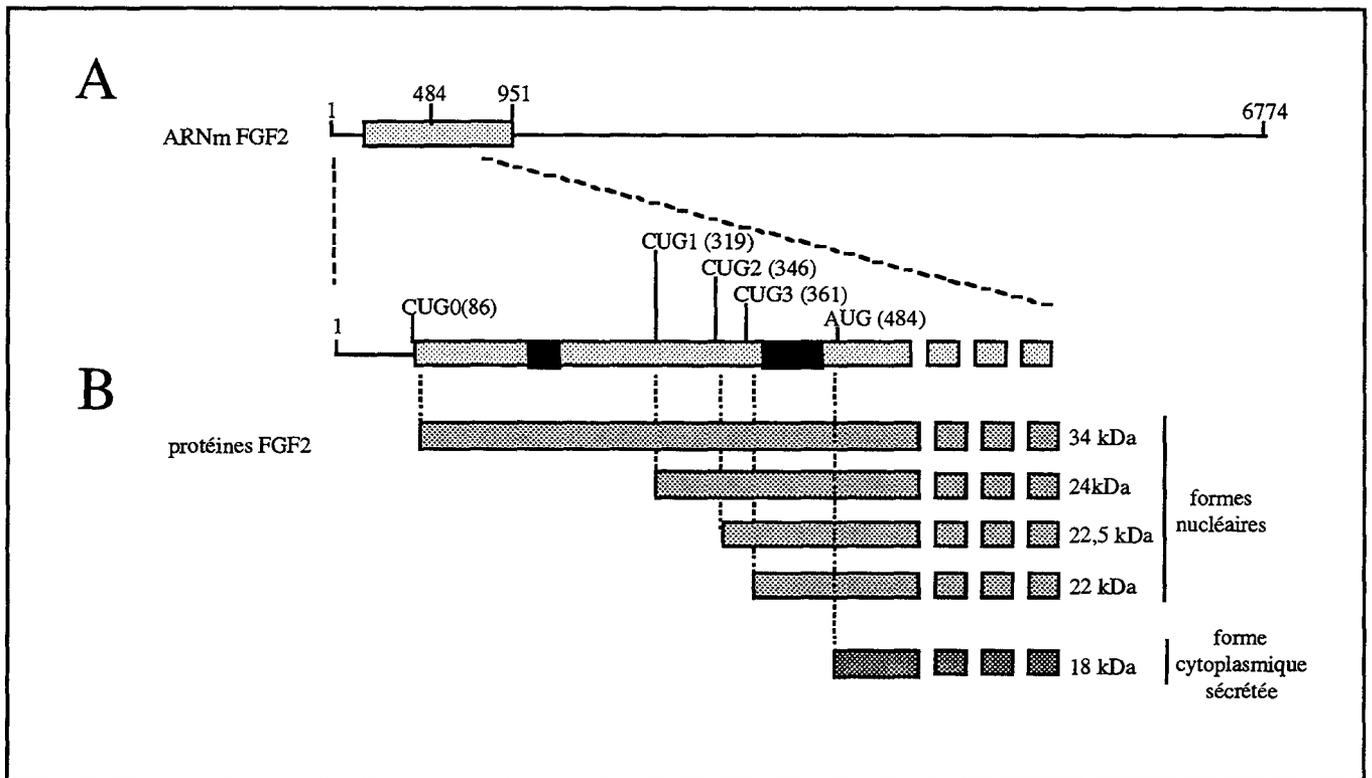


Figure 1 : FGF-2 humain, de l'ARNm à la protéine. (A) ARNm de FGF-2 avec les 288 pb du cadre de lecture ouvert (ORF, Open Reading Frame) (rectangle) et les deux régions non traduites aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm (trait noir). En dessous, agrandissement de la région 5' de l'ARNm avec la position des 4 codons CUG et du codon AUG d'initiation de la traduction. Les rectangles noirs représentent les séquences de localisation nucléaire des formes de haut poids moléculaires du FGF-2. (B) Représentation des formes protéiques de haut poids moléculaire du FGF-2 présentes préférentiellement dans le noyau, et de la forme de 18 kDa qui est cytoplasmique et sécrétée dans le milieu extracellulaire.

I.1/ Caractéristiques structurales

Comme nous venons de le souligner, les 21 membres de la famille des FGFs ont une homologie de séquence relativement bien conservée. Cependant très peu d'études relatent les caractéristiques structurales de chacun de ces membres, sauf pour le FGF-1 et le FGF-2 pour lesquels la structure du gène et de la protéine sont bien caractérisées. Dans ce premier paragraphe de l'introduction, nous détaillerons donc principalement les résultats concernant le FGF-2, étant donné d'une part, les nombreuses données disponibles et d'autre part, les travaux réalisés au cours de cette thèse concernent la signalisation intracellulaire du FGF-2. Le FGF-2 a été initialement purifié à partir de la glande pituitaire comme un agent mitogène stimulant la croissance des cellules NIH3T3 (Gospodarowicz, 1974) puis trouvé ultérieurement dans de nombreux tissus et organes, sains et cancéreux où, comme nous le verrons dans le second paragraphe, il exerce de nombreux effets biologiques.

I.1.1/ Structure du gène FGF-2

Le gène FGF-2 humain a été localisé sur le chromosome 4, au niveau de la bande q26 (Mergia et al, 1986). Comme l'illustre la figure 1, la région codante de ce gène est scindée en trois exons séparés par 2 larges introns, et comprend également 2 régions non traduites de grande taille, aux extrémités 5' et 3' du gène (untranslated region, UTR). Le gène FGF-2, d'environ 35 kb code pour des ARN messagers de 4,6 et 2,2 kb. Les ARNm transcrits polyadénylés du FGF-2, contrairement à ceux du FGF-1, présentent plusieurs sites d'initiation de la traduction, donnant lieu à 5 protéines dont les effets biologiques sont différents. La traduction initiée au site classique AUG en position 484, code pour la protéine de 18 kDa (155 acides aminés). Plus en aval, on trouve trois sites de type CUG, en position 319, 346, et 361, codant respectivement pour des protéines de 24 (210 acides aminés), 22,5 (201 acides aminés) et 22 kDa (196 acides aminés) (Prats et al, 1989, Florkiewicz et al, 1989). Enfin, Arnaud *et al.* (1999) ont décrit récemment une nouvelle isoforme de FGF-2 de 34 kDa, résultant de la traduction initiée à partir d'un quatrième codon CUG, en position 86 à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm du FGF-2. Alors que la forme de 18 kDa qui ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (ou NLS, pour Nuclear Localization Sequence), est retrouvée surtout dans le cytoplasme, les formes de haut poids moléculaires, traduites à partir

des quatre codons d'initiation CUG, sont localisées principalement dans le noyau des cellules, du fait de la présence d'une NLS du côté N-terminal de la protéine (Bugler et al, 1991; Arnaud et al, 1999).

Le promoteur du gène FGF-2 a été caractérisé et de multiples éléments régulateurs ont été identifiés. Il ne contient pas de séquence TATA (TATA box) caractéristique des promoteurs, mais cinq boîtes GC, sites probables de fixation du facteur de transcription SP-1 et un site de fixation potentiel pour AP-1 (Activator Protein 1) ont été mis en évidence (Shibata et al, 1991). Par ailleurs, en utilisant des transfections de la région promotrice du gène FGF-2 marquée à la luciférase, l'équipe de Stachowiack a montré que la région comprise entre -650 et +314 du gène FGF-2 est suffisante pour supporter une activité basale du promoteur et conférer une activation par des facteurs de croissance (EGF, PDGF), par la protéine kinase C, ou encore par l'AMPc (Moffett et al, 1998). Ils ont également identifié un élément de réponse aux facteurs de croissance (GFRE, growth factor response element) en position -555 à -512 pb, soulignant l'étroite relation qu'il existe entre les différents facteurs de croissance (Moffett et al, 1998).

Une des particularités du gène FGF-2 est la possibilité de transcription d'un ARNm anti-sens, *fgf2*, complémentaire de la région UTR en 3' de l'ARNm de FGF-2. A l'origine décrit chez des ovocytes de *Xenopus laevis* (Volk et al, 1989), l'antisens *fgf2*, d'une taille de 1,5 kb, a été mis en évidence chez le poulet (Savage et al, 1995) et le rat (Li et al, 1996). Chez l'humain, il a été détecté dans de nombreux tissus et organes tels que le coeur, le colon, le foie, les muscles squelettiques, les testicules et les ovocytes (Knee et al, 1994). On le trouve également dans des lignées cellulaires humaines de cancer du sein (T47D) et de glioblastome (Murphy et Knee, 1994). De manière intéressante, il semble que l'abondance des transcrits sens et anti-sens du gène FGF-2 soit inversement corrélée dans des lignées cellulaires humaines de glioblastomes (U87-MG), de cancer du sein (T47D) ou lymphoïdes (Jurkat) (Murphy et Knee, 1994; Gagnon et al, 1999), mais aussi dans le rein et le cerveau de rat (Li et al, 1997; Knee et al, 1997). Ces données suggèrent que l'anti-sens *fgf2*, du fait de sa complémentarité avec 446 nucléotides de l'ARNm sens du FGF-2, peut former des ARN double brins, régulant ainsi l'utilisation des sites de polyadénylation et la demie-durée de vie de l'ARNm de FGF-2, et par conséquent, les effets biologiques de celui-ci. En

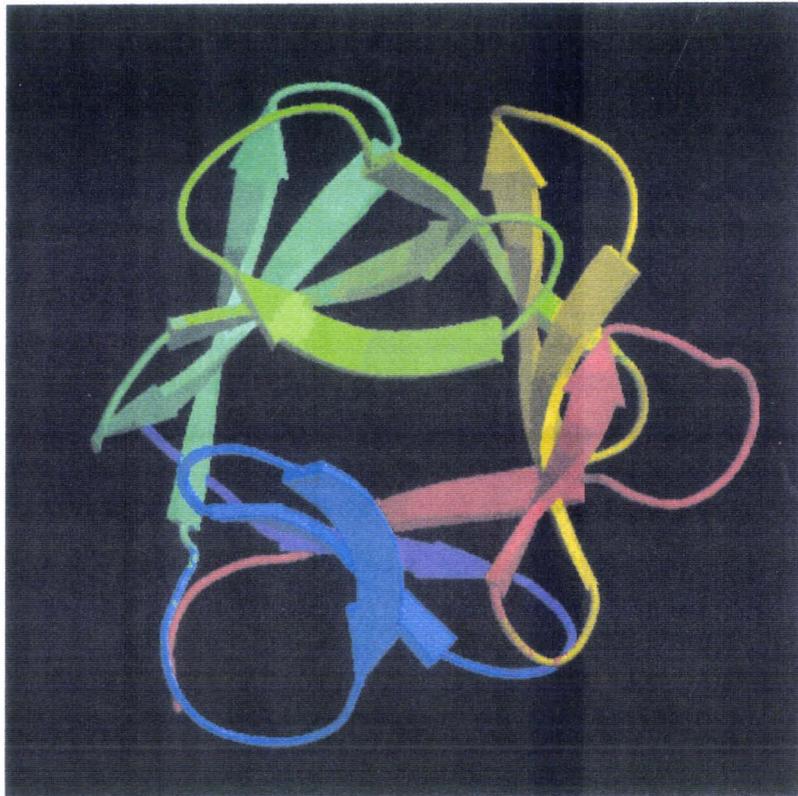


Figure 2 : Structure en feuillets β du FGF-2. Les trois groupes des 3-4 feuillets β (représentés en forme de flèche) sont colorés en rouge, en jaune, en vert, et en bleu. L'extrémité N-terminale est en rouge, l'extrémité C-terminale en bleu.

effet, l'utilisation *in vitro* du transcript anti-sens ou d'oligonucléotides anti-sens du FGF-2 peut, en diminuant la synthèse du FGF-2 endogène, réguler négativement les activités biologiques de celui-ci, telles que la prolifération des cellules musculaires (Schmidt et al, 1997), la différenciation et la survie de cellules rétinales d'embryon de poulet (Désirée et al, 1998), l'angiogenèse intratumorale et la croissance tumorale *in vivo* dans des souris *nude* (Maret et al, 1995; Wang et Becker, 1997), ou encore, la capacité de migration et d'invasion des cellules en diminuant la production de protéases (MMP-2) induite par le FGF-2 (Miyake et al, 1997). Mais la fonction du transcrit anti-sens n'est pas seulement de réguler le FGF-2, car *gfg2* code pour une protéine nucléaire fonctionnelle de 35 kDa, homologue de la famille Mut T (Li et al, 1996; Li et al, 1997; Knee et al, 1997). Ces protéines ont une activité enzymatique de nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase, et jouent un rôle important dans le métabolisme en éliminant les formes mutagènes de dGTP du pool de nucléotides (revue dans Bessman et al, 1996).

I.1.2/ Structure de la protéine FGF-2

Le FGF-2 est un polypeptide basique, globulaire non-glycosylé de 18 kDa et de point isoélectrique 9,6. Des études structurales ont permis de classer le FGF-2 et le FGF-1 dans la famille de l'interleukine 1 (IL-1). En effet, la structure tridimensionnelle du FGF-2 déterminée par cristallographie aux rayons X peut être assimilée à une pyramide trigonale avec une forte homologie structurale avec l'IL-1 β . Comme le montre la figure 2, le FGF-2 est composé de 11 feuillets β formant trois groupes de trois à quatre feuillets β anti-parallèles, chaque feuillet β étant lié au feuillet adjacent par des liaisons hydrogènes (Zhu et al, 1991). Le coeur de la protéine est rendu très hydrophobe par les nombreuses chaînes d'acides aminés aromatiques. En revanche, la surface du FGF-2 est riche en acides aminés chargés, notamment des résidus Lysine et Arginine, qui confèrent le haut point isoélectrique de la molécule. Parmi les acides aminés conservés dans la famille des FGFs, la plupart sont localisés à l'intérieur du coeur en structure β , suggérant que leur structure doit être globalement identique à celle du FGF-2 (Zhang et al; 1991; Eriksson et al, 1991; Moy et al, 1996).

La forme de 18kDa comprend quatre cystéines en position 25, 69, 87 et 92, la première et la dernière étant très conservées dans la famille des FGFs (Burgess et Maciag, 1989). Aucune de

ces quatre cystéines n'est engagée dans un pont disulfure, mais une dimérisation du FGF-2 est possible dans des conditions non dénaturantes entre les résidus Cys 69 et 87 (Zhang et al, 1991). Il faut noter que ces quatre résidus ne semblent pas jouer un rôle structural majeur puisque leur mutation par des résidus Ser ne modifie pas l'activité biologique du FGF-2 (Seno et al, 1988; Fox et al, 1988; Arakawa et al, 1989). En revanche, pour le FGF-1, la mutation des trois cystéines induit une stimulation de la prolifération cellulaire plus importante et indépendante de l'héparine ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité à la dégradation, indiquant un rôle fonctionnel important pour ces résidus (Xue et al, 2000).

I.2/ Effets biologiques des FGFs

I.2.1/ Le développement embryonnaire

Les FGFs ont d'importantes fonctions dans le développement embryonnaire (cf tableau 1). Les FGF-1, FGF-2, FGF-3 et FGF-7 sont des inducteurs du mésoderme dans la jeune blastula de Xénope (Kimelman et al, 1988; Grunz et al, 1988; Paterno et al, 1989; Slack et al, 1987; Amaya et al, 1993). Les FGFs dont le FGF-4 (Arman et al, 1998), le FGF-8 (Sun et al, 1999), le FGF-10 (Kato et Sekine, 1999), le FGF-14 (Wang et al, 2000) et le FGF-17 (Xu et al, 1999) sont également nécessaires pour le développement embryonnaire précoce et tardif chez la souris. Au cours de ces dix dernières années, des travaux portant sur l'étude des patrons d'expression des différents FGFs dans la souris ont montré que les FGFs sont actifs dès l'embryogenèse, puis au cours du développement foetal et enfin, chez l'adulte, avec des spécificités temporelles et spatiales différentes et plus ou moins restreintes (Hebert et al, 1990; DeLapeyrière et al, 1993; Hartung et al, 1997; McWhriter et al, 1997; Xu et al, 1998; Miyake et al, 1998; Hoshikawa et al, 1998; Sekine et al, 1999; Xie et al, 1999; Wang et al, 2000). De plus, des études utilisant des souris "*knock-out*" montrent que l'absence d'un gène codant pour un membre de la famille des FGFs entraîne des phénotypes allant à des défauts mineurs jusqu'au caractère létale de la mutation. Ainsi, les souris *fgf-1^{-/-}* sont viables et fertiles, et présentent un cerveau et des membres normaux (Miller et al, 2000). Mais chez les souris *fgf-2^{-/-}*, qui sont aussi viables et fertiles, des défauts phénotypiques tels qu'une diminution du nombre et de l'organisation des neurones dans le cortex cérébral (Dono et al, 1998; Ortega et al, 1998; Vaccarino et al, 1999; Raballo et al, 2000), des défauts de

vascularisation accompagnés d'une hypotension (Dono et al, 1998; Zhou et al, 1998), des os plus petits avec une mauvaise minéralisation (Montero et al, 2000) et des déficiences hématopoïétiques (Miller et al, 2000) ont été observés. Ces défauts relativement mineurs ne sont pas dûs à une redondance fonctionnelle du FGF-1 et du FGF-2, car des souris à la fois *fgf-2*^{-/-} et *fgf-1*^{-/-} ne présentent pas des phénotypes plus graves que ceux observés chez les souris *fgf-2*^{-/-} (Miller et al, 2000). La plupart des souris homozygotes *fgf-3*^{-/-} meurent à la naissance avec une queue plus courte, et celles qui survivent présentent en plus des défauts dans l'oreille interne (Mansour, 1994). Le FGF-6, dont l'expression est restreinte au muscle squelettique (DeLapeyrière et al, 1993) n'est pas vital pour les souris qui sont en apparence tout à fait normales (Fiore et al, 1997), mais il est indispensable pour la régénération musculaire (Floss et al, 1997). Au contraire, la mutation du gène *fgf-4* est létale dès les stades précoces du développement (Moon et al, 2000), et les souris *fgf-10*^{-/-} meurent dès la naissance et présentent une absence totale de développement des poumons et des membres restés à l'état de bourgeon (Min et al, 1998; Sekine et al, 1999). Des travaux de "knock-out" ou l'expression *in vivo* de récepteurs mutés ont démontré également les fonctions essentielles des récepteurs de haute affinité des FGFs, les FGFRs. La délétion du gène *fgfr1* chez la souris entraîne une distribution aberrante du mésoderme avec par exemple l'absence totale de somites, et montre que le FGFR1 est essentiel pour la croissance des embryons dès la postimplantation et pour leur organisation axiale (Deng et al, 1994; Yamaguchi et al, 1994). Quant au FGFR2, ses fonctions sont indispensables pour le développement embryonnaire précoce dès les premières heures d'implantation du blastocyste et la morphogénèse des poumons (Arman et al, 1998, 1999). La délétion de la troisième boucle immunoglobuline de ce récepteur est létale pour les embryons et démontre l'importance de la signalisation induite par le FGFR2 dans la formation du placenta et l'induction des membres, via les FGF-8 et FGF-10 (Xu et al, 1998). La mutation d'un seul acide aminé dans la séquence du FGFR3, ou la délétion du gène codant pour ce récepteur a mis en évidence le rôle essentiel du FGFR3 dans la morphogénèse du squelette. En effet, les souris homozygotes, exprimant le récepteur muté ou n'exprimant plus le gène *fgfr3* meurent à la naissance avec de grandes anomalies dans l'ossification (Colvin et al, 1996; Segev et al, 2000). Par ailleurs, les mutations dans la séquence des FGFRs, et notamment dans celle du FGFR3, existent à l'état naturel chez l'homme où elles conduisent à des maladies génétiques graves avec de profondes anomalies dans le développement squelettique (revue dans Burke et al, 1998). Ce point

sera abordé dans le paragraphe II.1 (p.18) lors de la description de la structure des FGFRs. Toutes ces données montrent bien l'ampleur de l'implication des FGFs et de leurs récepteurs dans le développement embryonnaire des mammifères, aussi bien à des stades très précoces comme la prégastrulation qu'à des stades plus tardifs du développement tels que la morphogenèse des membres et de différents organes vitaux.

I.2.2/ La régénération et la réparation tissulaires

Une autre fonction connue des FGFs et en particulier des FGF-1 et FGF-2 est la réparation et la régénération tissulaires. Le processus de cicatrisation fait intervenir des phénomènes de migration, de prolifération, de différenciation cellulaires et d'angiogenèse, pour la mise en place d'un tissu cicatriciel appelé tissu de granulation. C'est grâce à la libération par les cellules endommagées de molécules chémo-attractives comme le FGF-2 que dans un premier temps, les cellules du tissu conjonctif autour de la blessure migrent et prolifèrent pour former le tissu de granulation. Dans un deuxième temps, la néovascularisation de la cicatrice au cours de laquelle l'activité angiogénique du FGF joue un rôle primordial se met en place. En effet, des études expérimentales ont montré que le FGF accélère la vitesse de cicatrisation de l'épithélium de la peau (Thomas et al, 1987) et de la cornée (Assouline et al, 1989; Dabin et Courtois, 1991). Par ailleurs, les FGFs sont impliqués dans la régénération du membre du pleurodèle (Boilly et al, 1990), du foie (Kan et al, 1989), et des nerfs périphériques (Cordeiro et al, 1989).

I.2.3/ L'angiogenèse

Un des rôles majeurs des FGFs *in vivo* est l'induction de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est-à-dire l'angiogenèse. Ce processus a lieu dans des conditions physiologiques telles que le développement du système vasculaire pendant la croissance embryonnaire et foetale et la vascularisation utérine lors du cycle menstruel. Mais il contribue également au développement de la croissance tumorale en permettant la néovascularisation nécessaire à l'oxygénation et à la croissance des cellules cancéreuses. L'angiogenèse fait appel à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales, ainsi qu'à la dégradation de la matrice

extracellulaire par des protéases, permettant ainsi la progression des néovaisseaux. Des études *in vivo* dans des souris *nude* et l'utilisation de modèles *in vitro* tels que la formation de tubes dans un gel tridimensionnel, ont montré l'activité angiogénique des FGF-1, FGF-2 et FGF-4 (revue dans Gerwins et al, 2000) Cette activité est due à la capacité des FGFs à stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Tanako et al, 1994; Bagheri-Yarmand et al, 1998; Tanaka et al, 1999; Kanda et al, 2000), ainsi que la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire comme la collagénase I (Arbiser et al, 1998), les métalloprotéinases (MMP) (Deroanne et al, 1997; Partridge et al, 2000), ou l'activateur du plasminogène de type urokinase, l'uPA (Besser et al, 1995; Bastaki et al, 1997, Giuliani et al, 1999; Ribatti et al, 1999). Dans ce processus physiologique interviennent également les deux types de récepteurs des FGFs. En effet, la transfection des cellules par un anti-sens de l'ARNm du FGFR1 ou l'inhibition de l'activité tyrosine-kinase de ce récepteur par le PD166866 bloque l'angiogenèse induite par le FGF-2, démontrant ainsi la nécessité des FGFRs dans la transduction du signal angiogénique (Wang et Becker, 1997; Panek et al, 1998). La signalisation déclenchée par le FGF-2 dans l'angiogenèse est encore mal comprise, mais une étude récente a montré à l'aide d'inhibiteurs spécifiques l'implication des Sérine/Thréonine kinases p42/p44 et p38 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que dans la formation *in vitro* de capillaires sanguins, grâce en partie à une augmentation de synthèse de protéases (uPA, MMP) par p42/p44 MAPK et à une réorganisation des protéines du cytosquelette par la p38 MAPK (Tanaka et al, 1999). Quant aux sites de fixation de basse affinité, les héparanes sulfates (HS), ils participent non seulement à la formation du complexe ternaire FGF-FGFR-HS et donc à la signalisation du FGF, mais régulent aussi la biodisponibilité du FGF avec l'action concertée de protéases qui permettent son relargage dans le milieu environnant (Li et al, 1994; Whitelock et al, 1996; Lundin et al, 2000). Outre les études *in vitro*, des travaux utilisant des cellules fibroblastiques NIH 3T3, de cancer de la vessie NBT-II ou du sein MCF-7, exprimant un membre de la famille des FGFs (FGF-1, FGF-2, FGF-4) ont montré que *in vivo*, ces cellules forment des tumeurs hautement vascularisées lorsqu'elles sont injectées à des souris *nude* (Yoshida et al, 1994; Jouanneau et al, 1997; McLeskey et al, 1996, 1998b; Zhang et al, 1999). D'autre part, il a été montré dans certains cas que le FGF peut induire l'angiogenèse indirectement, en stimulant la synthèse et la sécrétion de d'autres facteurs angiogènes comme le VEGF (Vascular Endothelial

FGF	Lignée cellulaire	Caractères observés	Références
FGF-1	fibroblastes Swiss 3T3	• perte de l'inhibition de contact et prolifération accrue. Petites tumeurs non progressives <i>in vivo</i> .	Jaye et al, 1988
	fibroblastes NIH 3T3	• croissance sans sérum, formation de colonies en agar mou, et tumorigène <i>in vivo</i> .	Bunnag et al, 1991
	cellules de carcinome de vessie de rat (NBT-II)	• hautement tumorigène <i>in vivo</i> .	Jouanneau et al, 1997
FGF-2	fibroblastes de hamster	• croissance sans sérum et formation de colonies en agar mou.	Neufeld et al, 1988
	mélanocytes normales de souris	• croissance autonome et perte de différenciation cellulaire. Non tumorigène <i>in vivo</i> .	Dotto et al, 1989
	fibroblastes NIH 3T3	• morphologie transformée et tumorigénique <i>in vivo</i> .	Quarto et al, 1991
	astrocytes foetaux humains	• croissance indépendante d'ancrage et perte de l'inhibition de contact.	Gately et al, 1995
	cellules mammaires immortalisées, HBL-100	• croissance en agar mou. Non tumorigène <i>in vivo</i> .	Soultou et al, 1996
	cellules épithéliales de prostate (PNT I A)	• croissance indépendante du sérum et de l'ancrage. Prolifération accrue.	Ropiquet et al, 1997
	mélanocytes humaines normales	• croissance indépendante d'ancrage en agar mou. Augmentation de la survie et de la prolifération <i>in vivo</i> .	Nesbit et al, 1999
FGF-3	fibroblastes NIH 3T3	• formation de colonies en agar mou.	Goldfarb et al, 1991
FGF-4	fibroblastes NIH 3T3	• croissance indépendante du sérum et de l'ancrage en agar mou.	Talarico et Basilico, 1991
	cellules épithéliales différenciées de la thyroïde de rat	• perte de la différenciation et croissance indépendante de la thyrotropine.	Battaglia et al, 1993
	cellules mammaires immortalisées, HBL-100	• croissance sans sérum, et en agar mou. Tumorigène <i>in vivo</i> .	Soultou et al, 1996
	cellules mammaires normales de souris EF43	• formation de tumeurs dans des souris <i>nude</i> .	Deroanne et al, 1997
FGF-6	fibroblastes	• capacité transformante.	Coulier et al, 1994
FGF-7	cellules épithéliales humaines de prostate PNT1A	• potentiel invasif avec la surexpression de protéases. Croissance indépendante d'ancrage et prolifération accrue.	Ropiquet et al, 1999
FGF-8	fibroblastes NIH 3T3	• formation de colonies en agar mou et tumorigène <i>in vivo</i> .	Kouhara et al, 1994
	fibroblastes NIH 3T3	• changements morphologiques et tumorigène <i>in vivo</i> .	MacArthur et al, 1995b
FGF-17	fibroblastes NIH 3T3	• activité transformante.	Xu et al, 1999

Tableau 2 : Activité transformante *in vitro* et *in vivo* des FGFs (liste non exhaustive).

Growth Factor) (Mandriota et Pepper, 1997; Deroanne et al, 1997; Seghezzi et al, 1998). Par ailleurs, l'activité angiogénique des FGFs est corrélée avec le développement de différents types de tumeurs, comme les cancers de la peau (Arbiser et al, 1998), de la vessie (O'Brien et al, 1997) et du sein (Heffelfinger et al, 1999) et les mésothéliomes (Kumar-Singh et al, 1999). Les études *in vitro* et *in vivo* et la corrélation entre l'angiogenèse et le développement tumoral ont amené l'idée de traiter les tumeurs solides en inhibant la néovascularisation tumorale. Ce concept est de plus en plus concret. En effet, des études *in vitro* testent les propriétés antagonistes de molécules sur l'activité angiogénique du FGF, comme la suramine (Tanako et al, 1994), l'ADN complémentaire anti-sens du FGF-2 ou du FGFR1 (Wang et Becker, 1997), un inhibiteur spécifique du FGFR1 (Panek et al, 1998), un dérivé du dextran (Bagheri-Yarmand et al, 1998), ou encore un analogue de la porphyrine (Aviezer et al, 2000). L'efficacité de certains composés anti-angiogéniques est d'ailleurs déjà en cours d'évaluation clinique (revues dans Kerbel, 2000; Hagedorn et Bikfalvi, 2000).

I.2.4/ La transformation cellulaire et le développement tumoral

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les FGFs sont capables de stimuler la prolifération, la différenciation et la migration d'un grand nombre de types cellulaires et d'induire l'angiogenèse. Or, la dérégulation de ces fonctions peut conduire à une transformation progressive des cellules et au développement d'une tumeur. Certains membres de la famille des FGFs, tels que le FGF-3 (*int2*) dans des carcinomes mammaires de souris induits par le virus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), le FGF-4 (*hst1*) ou le FGF-5 (*hst2*) dans des tumeurs humaines d'estomac (Human Stomach Tumor), ont été originellement identifiés comme produits d'oncogènes. Comme il est indiqué de manière non exhaustive dans le tableau 2, les FGFs sont capables d'induire *in vitro* la transformation de différents types cellulaires, et sont responsables de la tumorigénicité *in vivo* des cellules transfectées et inoculées dans des souris *nude*. Même si dans certains cas le caractère transformant induit par la transfection d'un gène codant pour un FGF n'est que partiel ou nécessite un haut niveau d'expression du FGF, cela souligne le rôle possible des FGFs dans les processus pathologiques tels que la cancérisation en stimulant la croissance des cellules de manière autocrine.

Nous nous attarderons plus particulièrement sur les conséquences de l'expression des FGFs dans les cellules mammaires, grâce aux travaux basés sur la transfection des cellules avec un membre de la famille des FGFs. Ainsi, les cellules hormono-dépendantes de cancer du sein MCF-7 transfectées par le FGF-1 deviennent tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des souris *nude* et provoquent l'apparition de métastases et de nombreux vaisseaux sanguins, soulignant ainsi le rôle autocrine du FGF-1 sur ces cellules tumorales (Zhang et al, 1997, 1999). La transfection de ces mêmes cellules par le FGF-4 induit également l'apparition de tumeurs vascularisées dans ces souris, même lorsque celles-ci sont traitées par le tamoxifène, un anti-oestrogène. Ces résultats suggèrent que non seulement les FGFs participent à la tumorigenèse, mais qu'ils interviennent aussi dans la progression de la croissance tumorale vers un phénotype oestrogène-indépendant, voire résistant aux anti-oestrogènes (McLeskey et al, 1993, 1998a, 1998b). De même, lorsque le FGF-3 ou le FGF-4 est transfecté dans des cellules mammaires myoépithéliales de souris (Hajitou et al, 1998) et dans les cellules HBL-100 (Souttou et al, 1996), l'un et l'autre confèrent à ces cellules un haut potentiel tumorigénique *in vivo*. Par contre, la transfection des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 par le FGF-2 (forme de 18 kDa) diminue leur malignité en inhibant leur potentiel migratoire et invasif *in vitro* et leur tumorigénicité *in vivo*. Cet effet inhibiteur n'est pas observé lorsque les cellules sont transfectées par les deux formes de haut poids moléculaires (22 et 24 kDa) ou par les 3 formes (18, 22, et 24 kDa) du FGF-2 (Korah et al, 2000). Ces résultats soulignent le rôle différent des isoformes du FGF-2 dans la croissance cellulaire, et montrent que la forme de 18 kDa, lorsqu'elle est exprimée seule, est capable par un mécanisme autocrine d'inhiber la croissance de certaines cellules tumorales. Ces études de transfection de FGF dans des cellules mammaires soulignent la probable implication de certains FGFs dans la tumorigenèse mammaire. Mais une surexpression du FGF n'est pas forcément obligatoire pour contribuer au caractère agressif des cellules. En effet, il a été montré dans différentes lignées cellulaires de carcinomes de colon que le caractère invasif des cellules est corrélé avec la production de FGF-2 endogène qui agit de manière autocrine, et que l'ajout de FGF-2 dans le milieu de culture est capable d'augmenter la capacité d'invasion de ces cellules (Galzie et al, 1997). De même, l'expression du FGF-2 dans des cellules cancéreuses de poumon est corrélée à une division cellulaire plus rapide et à une croissance indépendante d'ancrage parallèlement à une forte expression des FGFR1 et R2 (Berger et al, 1999).

En plus des FGFs, les différents FGFRs (FGFR1, R2, R3 et R4), du fait de leur spécificité vis-a-vis de certains FGFs (détaillée dans la partie suivante) peuvent jouer des rôles différents sur la croissance cellulaire et le développement de la malignité. Feng *et al.* (1997) ont montré que la transition de cellules épithéliales de prostate non malignes vers un caractère malin est accompagnée de la perte progressive du phénotype différencié et de la communication avec le stroma. Un des phénomènes pouvant expliquer cette perte de sensibilité aux facteurs du stroma qui, dans des conditions normales régule la prolifération des cellules épithéliales en produisant de nombreux facteurs de croissance, est la réduction de l'expression du FGFR2IIIb (ou KGFR) concomitante à l'apparition du FGFR1 dans les cellules pré-malignes, accélérant la progression vers un phénotype malin. En effet, lorsque les cellules épithéliales expriment essentiellement le KGFR, seul le FGF-7 (ou KGF, Keratinocyte Growth Factor) qui est produit uniquement par les fibroblastes peut réguler de manière paracrine la croissance des cellules épithéliales. Mais avec l'augmentation du rapport FGFR1/KGFR, les cellules épithéliales deviennent alors sensibles à d'autres FGFs produits par le stroma et/ou par les cellules épithéliales elles-mêmes (Feng et al, 1997). Une expression différentielle entre les isoformes (obtenues par épissage alternatif) d'un même FGFR a également été observée au cours de la progression des cellules vers la malignité. Ce processus a été décrit pour le FGFR1 à deux boucles immunoglobulines (forme beta) dont l'expression augmente parallèlement à la malignité des cellules cancéreuses du pancréas par rapport au FGFR1 à trois boucles immunoglobulines (forme alpha) principalement détecté dans les tissus normaux (Kobrin et al, 1993).

Ainsi, les FGFs sont capables d'induire la transformation des cellules *in vitro* et *in vivo*, notamment en stimulant de manière autocrine ou paracrine la prolifération cellulaire. Le rôle dans la tumorigénicité des cellules et son implication dans l'angiogenèse tumorale en font une famille de facteurs de croissance qui se révèle être de plus en plus partie prenante dans le processus de cancérisation, par l'intermédiaire des FGFRs. Nous développerons ultérieurement l'implication des FGFs et de leurs récepteurs dans le cancer du sein afin de mieux comprendre le contexte scientifique de cette thèse qui a pour but d'étudier le mécanisme d'action intracellulaire du FGF-2 dans une lignée cellulaire de cancer du sein.

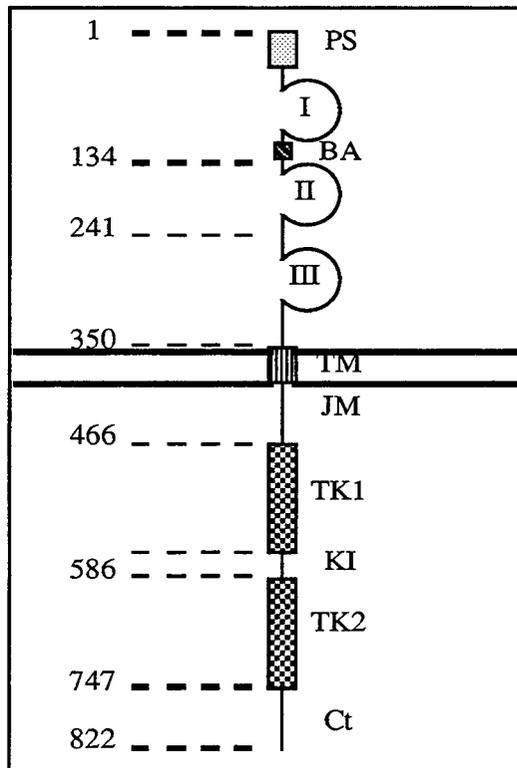


Figure 3 : Structure générale du FGFR. Les numéros des acides aminés sont indiqués pour le FGFR1. Les boucles Immunoglobulines sont numérotées de I à III. PS, peptide signal; BA, boîte acide; TM, transmembranaire; JM, juxtamembranaire; TK, tyrosine kinase; KI, kinase insert; Ct, extrémité C-terminale.

II/ LES RECEPTEURS DES FGFs

Les activités biologiques du FGF-2 sont médiées par deux types de sites de fixation. Les sites de haute affinité ($K_d = 10\text{-}600\text{ pM}$) sont des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (FGFR) présents à la surface de nombreux types cellulaires et dans différents tissus. Les sites de basse affinité sont des protéoglycannes de type héparane sulfate (HSPG) localisés dans les membranes cellulaires et au niveau de la matrice extracellulaire; l'affinité des FGFs pour cette classe de récepteurs varie de 2 à 20 nM. Si le récepteur membranaire est considéré comme le véritable récepteur dans le sens où il initie la signalisation intracellulaire grâce à son activité tyrosine kinase, il est maintenant clairement établi que les sites de basse affinité interviennent non seulement dans la stabilisation du complexe FGF-FGFR, mais aussi dans la régulation de la signalisation intracellulaire en permettant l'induction de signaux qui mènent aux effets biologiques du FGF. Etant donnée l'implication directe des FGFRs dans la signalisation intracellulaire du FGF, dans ce chapitre, nous détaillerons davantage la structure de ces derniers.

II.1/ Les récepteurs de haute affinité

La famille des FGFRs comprend des isoformes multiples, produits de quatre gènes : *flg/FGFR1*, *bek/FGFR2*, *cek2/FGFR3* et *FGFR4*. Ces gènes sont portés par quatre chromosomes différents, respectivement les chromosomes 8, 10, 4, et 5 (revues dans Jaye et al, 1992; Johnson et Williams, 1993). A ce jour, on ne compte pas moins d'une vingtaine d'isoformes au total pour les quatre récepteurs, la plupart provenant des gènes codant pour les FGFR1 et R2. En effet, des épissages alternatifs qui ont lieu surtout dans la région extracellulaire des FGFRs, aboutissent à différentes isoformes à partir d'un seul gène. Par analogie structurale, les FGFRs appartiennent au groupe des récepteurs tyrosine-kinase qui comporte d'autres récepteurs de facteurs de croissance, tels que le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le NGF (Nerve Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor). Ces récepteurs portent une activité enzymatique catalysant spécifiquement la phosphorylation de leurs substrats peptidiques sur des résidus Tyrosine (revue dans Ullrich et Schlessinger, 1990). Les FGFRs sont des protéines transmembranaires glycosylées dont l'organisation structurale générale comporte trois domaines (Figure 3). Le domaine extracellulaire contient deux ou trois boucles de type immunoglobuline (Ig) stabilisées par

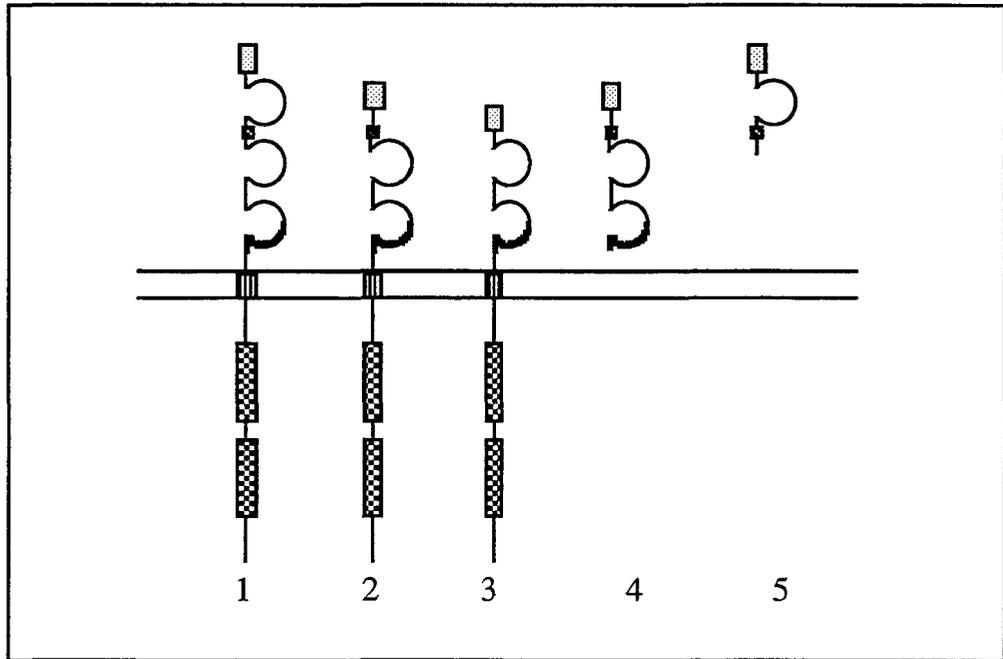


Figure 4 : Diversité des isoformes des FGFRs. Le trait épais de la deuxième moitié de la troisième boucle Ig représente l'épissage alternatif des exons IIIb ou IIIc (*D'après Dionne et al, 1991*).

forme 1 : FGFR le plus long, avec les 3 boucles Ig.

forme 2 : délétion de la boucle Ig I (FGFR1, FGFR2)

forme 3 : délétion de la boucle Ig I et de la boîte acide (FGFR2)

forme 4 : FGFR sécrété avec délétion du domaine cytoplasmique, transmembranaire, et d'une partie de la boucle Ig III (FGFR1)

forme 5 : FGFR sécrété ne comportant plus que la boucle Ig I avec la boîte acide et le signal de sécrétion (FGFR2).

un pont disulfure, une séquence de sécrétion en N-terminal et une séquence juxtamembranaire du côté C-terminal. Il comporte six à neuf sites potentiels de N-glycosylation (Dionne et al, 1990). Ces modifications post-traductionnelles semblent nécessaires à la fonctionnalité du récepteur, notamment pour la fixation des FGFs, et leur présence peut expliquer en partie la grande variabilité de masse moléculaire apparente des FGFRs (125-165 kDa) et les différences d'affinité du ligand pour son récepteur (10-600 pM). On trouve ensuite un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Ce dernier est composé de deux domaines à activité tyrosine kinase interrompus par une courte séquence (insert), d'un domaine juxtamembranaire en N-terminal, et d'une séquence C-terminale en dehors du domaine tyrosine kinase.

II.1.1/ Le domaine extracellulaire

Ce domaine extracellulaire est codé par plusieurs exons pouvant être soumis ou non à l'épissage alternatif. Le premier exon invariant code pour un signal de sécrétion N-terminal.

• Boucle Immunoglobuline-like I

L'exon alpha codant pour la première boucle Ig est soumis à un épissage alternatif par excision, et sa présence ou son absence définit respectivement les formes α (3 boucles) ou β (2 boucles) du FGFR (formes 1-3 de la figure 4). L'épissage alternatif de la boucle Ig I n'a lieu que pour les gènes FGFR1 et R2, les isoformes FGFR3 et R4 n'ayant été décrites à ce jour que sous la forme α . La séquence peptidique de cette première boucle Ig est très peu conservée entre les FGFRs (21 à 38%) en comparaison avec les deux autres boucles (63 à 82%) (revue dans Jaye et al, 1992). Elle n'est pas requise pour la fixation du FGF-2 ou des molécules sulfatées sur les FGFRs. Cependant, des études *in vitro* ont montré qu'un mutant FGFR1 délété de la première boucle et de la boîte acide a une plus grande affinité pour l'héparine et pour le FGF-2, suggérant un rôle de régulation négative de ces deux éléments dans l'interaction du récepteur avec son ligand et les sites de basse affinité (Shi et al, 1993; Wang et al, 1995a). Ces données *in vitro* sont appuyées par des observations *in vivo*. En effet, un switch de l'épissage alternatif des FGFRs à trois boucles (α) vers les récepteurs à deux boucles Ig (β) a été observé dans des tumeurs du

pancréas, du cerveau, du sein et de glioblastome. L'exclusion de l'exon α ou l'augmentation du rapport des transcrits FGFR1 β /FGFR1 α entraîne une augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand et de ce fait, induit la transformation néoplastique des cellules normales et la progression vers un phénotype plus agressif des cellules cancéreuses (Kobrin et al, 1993; Yamaguchi et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995; Luqmani et al, 1995; Jin et al, 2000). Ainsi, comme nous venons de le voir, une différence fonctionnelle existe entre les formes longues (α) et courtes (β) des FGFRs, due à l'influence de la première boucle Ig sur l'affinité des FGFs et de l'héparine pour les récepteurs de haute affinité. De plus, cet épissage alternatif semble jouer un rôle important dans la progression tumorale en modifiant les réponses des cellules vis-à-vis de l'activité paracrine ou autocrine des FGFs.

- **La boîte acide**

Un seul exon code pour le domaine entre les boucles Ig I et II qui est caractérisé par un regroupement d'acides aminés acides (Glu, Asp) et de résidus Sérine et Thréonine définissant le domaine de la boîte acide (acid box) comportant 4 à 8 acides aminés acides et dont la séquence est relativement divergente parmi les 4 FGFRs. Cet exon peut être partiellement ou entièrement délété sur le FGFR1 β et le FGFR2 β , mais cela n'affecte pas la fixation du ligand (Jaye et al, 1992; Hou et al, 1992). Le domaine acide ne semble pas avoir de fonction directe, mais il coopère avec la première boucle Ig pour réguler l'affinité du FGFR pour le FGF et des sites de basse affinité (Shi et al, 1993; Wang et al, 1995a). Le FGFR1, qui a la plus longue série de résidus acides parmi les quatre récepteurs, peut présenter ou non le dipeptide Arg-Met (RM) en C-terminal du domaine acide. Ce dipeptide serait un site reconnu par une protéase, permettant la conversion des formes FGFR1 α en FGFR1 β et régulant ainsi l'affinité des ligands pour leur récepteur (Johnson et al, 1990). Les isoformes FGFR3 et R4, qui sont toujours de formes α , ne possèdent pas de résidus basiques homologues à ce dipeptide.

• Boucle Immunoglobuline-like II

La deuxième boucle Ig est codée par deux exons invariants dans les quatre FGFRs. Elle comporte le site primaire d'interaction du récepteur avec le FGF et une séquence d'environ 20 acides aminés dans sa partie N-terminale constituant le site de fixation de l'héparine ; la plupart des acides aminés intervenant dans cette reconnaissance sont très conservés parmi les FGFRs des vertébrés (Kan et al, 1993; Kan et al, 1996). La présence invariable de la boucle Ig II aussi bien dans les tissus sains que cancéreux indique le rôle essentiel de cette partie du récepteur pour la fixation du ligand mais également pour celle des héparanes sulfates qui jouent un rôle critique dans la formation du complexe FGF-FGFR et la régulation de l'activité des FGFRs. Ces interactions seront détaillées dans le paragraphe suivant.

• Boucle Immunoglobuline-like III

La séquence entre les boucles Ig II et III et la partie N-terminale de la boucle Ig III sont codées par un exon invariant (exon IIIa), alors que la région C-terminale de cette dernière boucle est codée par un autre exon soumis à un épissage alternatif (exon IIIb ou IIIc). Ces séquences participent à la fixation du FGF-2 sur le récepteur (Plotnikov et al, 1999) et déterminent la spécificité ligand/récepteur (Wang et al, 1995). De plus, les interactions à l'interface entre les deux récepteurs du dimère ont été localisées dans la région inter-boucle et la partie N-terminale de la boucle Ig III (Pantoliano et al, 1994; Wang et al, 1997) en plus de la région décrite dans la boucle Ig II du FGFR par Plotnikov *et al.* (1999).

La troisième boucle Ig est codée par plusieurs exons dont le nombre dépend du gène FGFR. Alors que le gène FGFR4 contient uniquement l'exon IIIc' (Vainikka et al, 1992), les gènes FGFR1, R2 et R3 possèdent 2 exons adjacents, les exons IIIb et IIIc, qui codent pour des variants de la moitié C-terminale de la boucle Ig III (Champion-Arnaud et al, 1991; Johnson et al, 1991). Dans le cas du FGFR2, l'épissage de ces deux exons IIIb ou IIIc est mutuellement exclusif et comme pour l'épissage alternatif de l'exon alpha de la première boucle Ig, l'utilisation alternative de ces exons est corrélée à des processus biologiques importants, à savoir la spécificité de fixation du ligand sur son récepteur d'une part, et le phénotype des cellules, d'autre part. En ce qui

concerne le premier point, c'est la moitié C-terminale de la boucle Ig III qui détermine la spécificité de reconnaissance du FGFR pour les FGFs (Yan et al, 1992, 1993a). Par ailleurs, différents groupes ont montré que le FGFR2(IIIb) (KGF) et le FGFR2(IIIc) (BEK) ne sont jamais coexprimés à la surface d'une même cellule, l'expression de l'une ou l'autre de ces deux isoformes définissant un phénotype cellulaire différent (Yan et al, 1993b; Wang et al, 1995b). Ainsi, les cellules épithéliales expriment uniquement les transcrits IIIb, et les cellules fibroblastiques, les transcrits IIIc. Par contre, l'utilisation de ces deux exons pour le FGFR3 n'est pas tissu-spécifique, puisque les cellules fibroblastiques expriment un mélange des formes IIIb et IIIc du FGFR3 (Scotet et Houssaint, 1995). *In vivo*, un switch de l'expression exclusive de l'isoforme FGFR2(IIIb) vers l'isoforme FGFR2(IIIc) a été associée à une évolution vers la malignité de cellules épithéliales de prostate qui perdent ainsi leur dépendance vis à vis des facteurs de croissance produits par le stroma, dont le FGF-7 ou KGF (Yan et al, 1993b; Carstens et al, 1997). En revanche, l'expression de ces deux variants ne varie pas entre les tissus mammaires normaux et cancéreux (Luqmani et al, 1996).

La troisième boucle des FGFR1 et R2 peut être sujette à une variation supplémentaire. En effet, il existe un site de polyadénylation en aval du premier exon codant pour la boucle Ig III qui donne lieu à un produit tronqué et sécrété auquel il manque la région transmembranaire et le domaine intracellulaire (Johnson et al, 1991) (cf la forme 4 de la figure 4). Très récemment, une forme tronquée du FGFR4 a été décrite dans des cellules épithéliales intestinales (Takaishi et al, 2000). La forme tronquée du FGFR1 est capable de fixer avec une affinité 10 fois plus importante le FGF-2 (30 nM) que le FGF-1 (300 nM) (Duan et al, 1992). La fonction de ce variant de FGFR capable de fixer le FGF et l'héparine, n'est pas clairement définie. Cependant des études récentes indiquent un rôle régulateur des récepteurs solubles dans l'activité paracrine des FGFs. En effet, *in vitro*, sa présence dans le milieu de culture inhibe la prolifération induite par le FGF-2 dans les cellules HL-60 (Wang et al, 2000), et *in vivo*, il affecte la croissance et le développement de nombreux organes tels que les reins et les poumons, et des membres de souris (Celli et al, 1998). Il pourrait agir en séquestrant les molécules de FGF libres, les empêchant ainsi de se fixer aux récepteurs membranaires, ou jouer le rôle de dominant négatif en se dimérisant avec le domaine extracellulaire d'un récepteur non tronqué (Johnson et al, 1991; Duan et al, 1992; Werner et al,

1992). Cependant, il semble que l'affinité pour le FGF soit considérablement diminuée comparée aux formes membranaires, et rapidement perdue du fait de l'instabilité de ces formes tronquées (Kan et al, 1996).

Il faut noter que la présence des ponts disulfures au niveau des trois boucles Ig sont essentielles pour l'intégrité et la fonctionnalité des FGFR. En effet, des mutations conduisant à la création ou la délétion d'un résidu Cystéine dans le domaine extracellulaire entraînent une dimérisation covalente des récepteurs à travers des ponts disulfures intermoléculaires, et par conséquent conduisent à une autophosphorylation des FGFRs indépendante du ligand et à une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase des récepteurs (Neilson et Friesel, 1996). Ces mutations existent à l'état naturel, notamment dans la troisième boucle Ig, (cf p.7) et sont responsables de nombreuses maladies génétiques comme le syndrome de Crouzon (revue dans Burke et al, 1998).

II.1.2/ Les domaines juxtamembranaires et transmembranaire

Les domaines juxtamembranaire extracellulaire, transmembranaire, et une grande partie du domaine juxtamembranaire intracellulaire sont codés par un même exon, dont la séquence en acides aminés est relativement divergente parmi les quatre gènes codant pour les FGFRs. Ces domaines semblent jouer un rôle important dans l'oligomérisation des récepteurs. En effet, des mutations individuelles naturelles dans le domaine transmembranaire du FGFR3 stabilise la conformation dimérique des récepteurs, entraînant ainsi une stimulation indépendante du ligand de l'activité tyrosine kinase du récepteur. Cette signalisation constitutive et soutenue conduit à un développement anormal du squelette et du crâne, responsable de maladies comme l'achondroplasie (Neilson et Friesel, 1996; Webster et Donoghue, 1996; Li et al, 1997; Raffioni et al, 1998). Par ailleurs, un épissage alternatif dans le domaine intracellulaire juxtamembranaire peut donner lieu ou non à un dipeptide Thr-Val, site potentiel de phosphorylation pour une Ser/Thr kinase telle que la protéine kinase C, et qui jouerait un rôle dans le métabolisme des FGFRs (Hou et al, 1991; Gillespie et al, 1995).

II.1.3/ Le domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire kinasique et la région C-terminale des récepteurs sont codés par au moins 8 exons (Johnson et al, 1991). Le domaine kinasique est composé d'un site de fixation de l'ATP séparé du domaine catalytique par un insert de 14 acides aminés. La séquence de ce dernier diffère parmi les FGFRs, alors que les deux domaines adjacents sont très conservés. Ce domaine intracellulaire du récepteur est primordial pour l'activité des FGFs. En effet, la mutation de certains résidus ou la troncation, naturelle ou non, du récepteur dans cette région est corrélée à une diminution, voire à une absence de signalisation, et par conséquent de l'activité biologique des FGFs comme la transformation cellulaire des fibroblastes NIH3T3 (Li et al, 1994) ou l'effet mitogène (Wang et al, 1996b). De plus, des mutations naturelles de résidus basiques adjacents au site d'autophosphorylation dans le FGFR3 rendent alors possible la fixation de l'ATP sur son site, qui est normalement inaccessible en absence du ligand par un phénomène d'autoinhibition (Mohammadi et al, 1996b), ce qui induit une activation du récepteur indépendante du ligand, provoquant des troubles profonds du développement osseux responsables de maladies génétiques létales (Webster et al, 1996; revue dans Burke et al, 1998). Enfin, l'extrémité C-terminale du FGFR semble réguler négativement l'activité du récepteur, puisque des mutations dans cette région entraînent un niveau plus élevé des phosphorylations basales (Lorenzi et al, 1997).

Le domaine kinasique du FGFR1 contient au moins sept sites d'autophosphorylation de tyrosine : la tyrosine 463 dans la région juxtamembranaire, les tyrosines 583 et 585 dans l'insert, les tyrosines 653 et 654 dans la boucle d'activation et les tyrosines 730 et 766 dans l'extrémité C-terminale du récepteur (Shi et al, 1993; Mohammadi et al, 1996a). L'étude de la structure du domaine kinasique du FGFR1 a mis en évidence l'éloignement relatif des tyrosines par rapport au site catalytique du FGFR, et supporte donc le modèle dans lequel la dimérisation des récepteurs induite par le ligand est essentielle pour l'autophosphorylation des deux récepteurs (*trans*-autophosphorylation) (Mohammadi et al, 1996b). L'utilisation de FGFR1 mutés dans lesquels un ou plusieurs résidus Tyrosine ont été changés en phénylalanine a montré que la *trans*-autophosphorylation des tyrosines 653 et 654 est primordiale pour l'activation de l'activité kinasique du FGFR1 et la stimulation par le FGF-1 de la prolifération des myoblastes L6, de la différenciation des cellules PC12 (Mohammadi et al, 1996a) et de l'induction de l'uPA (Roghani et

al, 1996). Au contraire, la Tyr-766 n'est pas requise pour l'activité mitogène du FGF mais elle est indispensable pour la fixation de la phospholipase C gamma (Shi et al, 1993; Mohammadi et al, 1991), l'hydrolyse des phosphoinositols (Mohammadi et al, 1992) et l'internalisation du récepteur (Sorokin et al, 1994). Quant aux autres tyrosines (463, 583, 585 et 730), elles ne sont nécessaires ni au recrutement et à l'activation des protéines de signalisation -qui seront détaillées dans la partie sur la signalisation des FGFs-, ni à l'activité mitogénique ou différenciatrice du FGF-1 (Mohammadi et al, 1996a). Par contre, la phosphorylation de la Tyr-463 et -730 est indispensable pour l'induction de l'activité de l'uPA (Dell'Era et al, 1999). Ces dernières données mettent en exergue la différence de signalisation par le FGF entre la stimulation de la prolifération et celle de la migration auquel peut être rattachée indirectement l'activation de l'uPA ; ceci a fait l'objet d'une revue dont le titre est "*FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways*" et qui est fournie en annexe de la thèse (Boilly et al, 2000).

La comparaison des séquences peptidiques des quatre FGFRs a permis de déterminer que les sites d'autophosphorylation sont plus ou moins conservés entre les récepteurs : les Tyr-463 et -585 sont trouvées dans les FGFR1 et R2, la Tyr-583 dans les FGFR1 à R3, et les Tyr-730 et -766 dans les quatre FGFRs (Mohammadi et al, 1996b). Ces différences subtiles qui existent entre les domaines cytoplasmiques des FGFRs leur confèrent pourtant une signalisation et des activités biologiques différentes. Wang *et al.* (1994) ont caractérisé les protéines de signalisation activées par le FGFR1 et le FGFR4 dans des cellules lymphoïdes BaF3 et myoblastiques L6 transfectées par l'une ou l'autre de ces deux isoformes de FGFR. Ils ont montré que le FGFR1, qui stimule la croissance de ces cellules en présence de FGF-1 ou FGF-2, active davantage la phospholipase C gamma, SHC et les MAPK que le FGFR4, qui lui, n'a aucun potentiel mitogénique dans ces cellules. Une étude plus récente réalisée à partir de récepteurs FGFR chimères (domaine extracellulaire du récepteur du PDGF β et domaines transmembranaire et intracellulaire du FGFR1, R3 ou R4) aboutit à la même conclusion : Les différents FGFRs activent plus ou moins fortement les molécules de signalisation selon l'intensité de leur activité tyrosine-kinase, celle du FGFR4 étant la plus faible (Raffioni et al, 1999). Outre une signalisation différente entre les quatre types de FGFRs, il faut noter qu'une hétérodimérisation est possible entre des récepteurs de type différent (R1, R2, R3, R4) et/ou résultant d'un épissage alternatif (formes alpha ou beta, formes IIIb ou IIIc) qui, on l'a vu, peut modifier considérablement l'affinité et l'activité des FGFs (Bellot et al,

1991; McKeehan et Kan, 1994; Nurcombe et al, 2000). Si l'on prend en compte ces deux phénomènes, s'offrent alors à la cellule-cible des combinaisons multiples de dimères de récepteurs, et par conséquent, une régulation extrêmement fine de la signalisation induite par le FGF, tant en intensité et durée du signal qu'en recrutement de protéines intracellulaires.

II.1.4/ Affinité des FGFs pour les FGFRs

Au cours du développement embryonnaire, les FGFs sont impliqués dans de nombreuses fonctions qui parfois s'opposent, nécessitant une régulation extrêmement fine de leurs activités et de leur spécificité. Celle-ci est permise par une expression des FGFs et de leurs récepteurs qui est régulée dans l'espace et le temps, et d'autre part, par une régulation de la spécificité de fixation des FGFs sur les différentes isoformes des FGFRs. Cette dernière, comme nous allons le voir maintenant, est rendue très complexe du fait de la redondance de fixation d'un FGF sur plusieurs récepteurs et de reconnaissance par un même récepteur de plusieurs FGFs.

Des études de mutagenèse dirigée des FGFRs à différents endroits du domaine extracellulaire ont permis d'identifier quelques séquences essentielles qui confèrent la spécificité du ligand. La délétion de la première boucle Ig du domaine extracellulaire et de la boîte acide adjacente du FGFR n'affecte pas la spécificité de fixation des FGFs (Miki et al, 1992; Hou et al, 1992; Wang et al, 1999, Chellaiah et al, 1999) mais peut augmenter l'affinité du ligand pour son récepteur, suggérant que la boucle Ig I et la boîte acide dissuaderaient le site de fixation du FGF sur son récepteur et que leur délétion faciliterait alors l'accessibilité de ce site au ligand (Shi et al, 1993; Wang et al, 1995). La boucle Ig II est la plus conservée parmi les FGFRs. L'homologie de séquence entre la boucle II des quatre FGFRs chez l'homme, le rat, la souris, le poulet et le xénope est de 65%, alors qu'elle n'est que de 17% et 51% pour les boucles I et III, respectivement (Jaye et al, 1992; Xu et al, 1992; Johnson et Williams, 1993). Il a été montré que cette seconde boucle est indispensable pour la fixation des FGFs et de l'héparine (Kan et al, 1993) et qu'elle constitue le site primaire de fixation des FGFs sur leurs récepteurs de haute affinité, site commun et nécessaire pour tous les FGFs (Wang et al, 1999). Dans le cas du FGF-1 qui fixe tous les récepteurs (cf Tableau 3), ce site est nécessaire et suffisant pour sa fixation. D'une manière générale, la

FGFR	FGF-1	FGF-2	FGF3	FGF4	FGF5	FGF6	FGF7	FGF8	FGF9
1b	++++	++	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1c	++++	++++	-	++++	++	++	-	-	+
2b	++++	+/-	++	+	+/-	+/-	+++	+/-	+/-
2c	++++	++	+/-	++++	+	++	+/-	+	+++
3b	++++	-	-	-	-	-	-	-	++
3c	++++	++++	-	+++	+	+/-	-	++	++++
4	++++	++++	+/-	++++	+/-	+++	-	+++	+++
(2Ig)									

Tableau 3 : Activités mitogènes relatives des FGF-1 à FGF-9 sur les cellules BaF3 transfectées par une forme de FGFR. L'activité mitogène des FGFs pour chaque récepteur est relative à celle du FGF-1 (100%) : +++++, de 90 à 110%; +++, de 70 à 89%; ++, de 40 à 69%; +, de 10 à 39%; +/-, de 2 à 9%; -, de 0 à 1,9% (D'après Ornitz et al, 1996) .

spécificité de reconnaissance est donnée par une région du FGFR comprenant le lien entre les boucles Ig II et III et la partie N-terminale de la boucle Ig III, mais les deux boucles II et III étant nécessaires pour la fixation spécifique du ligand. La boucle Ig III isolée ne permet pas la fixation des FGFs, la présence des séquences adjacentes étant requise (Miki et al, 1992; Hou et al, 1992; Wang et al, 1999; Chellaiah et al, 1999; Plotnikov et al, 1999). La fixation du FGF-2 sur le FGFR1 et le R3 nécessite deux sites : le lien entre les domaines Ig I et II et le domaine Ig II d'une part, et le domaine Ig III d'autre part. Ces deux régions agissent de manière coopérative et assurent une fixation optimale du FGF-2 sur son récepteur (Chellaiah et al, 1999).

Comme le montre de manière résumée le tableau 3, chaque FGF se fixe avec plus ou moins d'affinité sur les différentes isoformes des FGFRs, sauf le FGF-1 qui se fixe indifféremment sur toutes les formes des récepteurs, et qui à ce titre, est qualifié de « ligand universel ». Le FGF-2 les reconnaît également tous, mais avec une affinité moindre pour les FGFR3 et R4 et les isoformes IIIb. Pour les autres FGFs, un élément majeur déterminant pour la spécificité de fixation est l'épissage alternatif de la partie C-terminale de la troisième et dernière boucle Ig des FGFR1-R3. Le FGF-7 (KGF) est particulier puisqu'il se fixe uniquement sur la forme IIIb du FGFR2 appelé de ce fait, le KGFR, qui peut néanmoins lier le FGF-1 et FGF-2. Les formes b du FGFR2 (épithéliales) sont activées également par les FGF-3 et FGF-10, qui, avec le FGF-7, sont produits par les tissus mésenchymateux et agissent de manière paracrine sur les cellules épithéliales. Ces FGFs ne se fixent pas du tout sur les formes c (mésenchyme) des récepteurs. A l'inverse, le FGF-8 dont l'expression est essentiellement restreinte aux tissus épithéliaux, active le FGFR2c, mais pas le FGFR2b (Avivi et al, 1993; Yan et al, 1993b; Gilbert et al, 1993; Ornitz et al, 1996; Luo et al, 1998; Wang et al, 1999). Le FGF-4 active la forme c, et pas ou peu la forme b, des FGFR1-R3, les FGF-5 et FGF-6 également, mais avec une affinité nettement moindre (Ornitz et al, 1996). Le FGF-9 reconnaît davantage les formes c des récepteurs que les variants FGFRIIIb, et n'active pas les FGFR1b et FGFR2b. Quant au FGFR3b, il est très spécifique puisqu'il ne fixe que le FGF-1 et le FGF-9 (Hecht et al, 1995; Ornitz et al, 1996; Santos-Ocampo et al, 1996). Le FGF-6 peut activer les FGFR1c et FGFR2c, mais son activité est faible pour le FGFR3c (Pizette et al, 1991; Ornitz et al, 1996). De même, les FGF-8, FGF-17 et FGF-18 activent les FGFR2c et FGFR3c mais faiblement le FGFR1c (MacArthur et al, 1995a; Ornitz et al, 1996). Enfin, la forme soluble sécrétée des FGFR comprenant l'exon IIIa est capable de lier les FGFs mais avec une

affinité plus importante pour le FGF-2 (Duan et al, 1992; Wang et Thomas, 1994). Ainsi, comme le montrent ces études, des différences de spécificité de fixation existent non seulement entre des variants d'épissage alternatifs (IIIb versus IIIc), mais aussi entre les quatre types de récepteurs ayant subi le même épissage, ce qui permet *in vivo* de réguler finement l'action des FGFs sur leurs cellules-cibles et sur les cellules productrices.

II.1.5/ Le Cysteine-Rich FGF Receptor (CFR)

En plus des récepteurs membranaires de haute affinité décrits ci-dessus, une autre protéine ancrée à la membrane et fixant le FGF a été identifiée : le récepteur au FGF riche en cystéines (CFR). Purifié initialement dans les embryons de poulet comme une protéine fixant le FGF, le CFR est une glycoprotéine de 150 kDa (Burrus et al, 1989, 1992). Par la suite, une homologie de plus de 90% a été trouvée entre le CFR humain et la protéine MG-160 spécifique de l'appareil de Golgi de rat (Gonatas et al, 1995) et avec l'ESL-1, une protéine fixant la E-sélectine et localisée à la surface cellulaire (Steedmaier et al, 1995). La protéine CFR, comme celle de rat n'est pas détectée à la surface cellulaire, mais elle est concentrée dans la membrane de l'appareil de Golgi (Gonatas et al, 1995; Zuber et al, 1997). Cependant, une forme du CFR clivée au niveau de la région cytoplasmique C-terminale a été mise en évidence. Ce CFR soluble sécrété par les cellules est détecté au niveau de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire (Steedmaier et al, 1997; Zuber et al, 1997). La séquence du CFR révèle une répétition de 16 unités riches en cystéine dans le domaine situé dans la partie intraluminaire de l'appareil de Golgi, et une courte séquence cytoplasmique de 13 acides aminés. Le CFR fixe spécifiquement les membres de la famille des FGFs, tels que les FGF-1, FGF-2, FGF-3 et FGF-4 (Burrus et al, 1992; Köhl et al, 2000). De plus, Zhou *et al.* (1997) ont montré que la fixation du FGF-2 sur le CFR ne requière pas d'héparane sulfate et que les régions du FGF-2 qui interagissent avec le FGFR ou le CFR sont identiques, suggérant une fixation mutuellement exclusive des FGFs sur l'un ou l'autre des récepteurs. D'un point de vue fonctionnel, le CFR réduit l'accumulation intracellulaire des FGF-1 et FGF-2 exogènes lorsqu'il est exprimé dans des cellules CHO, non pas en bloquant leur entrée dans la cellule ou en diminuant leur stabilité, mais plutôt en augmentant considérablement leur circulation intracellulaire des compartiments d'endocytose jusqu'à la surface membranaire, via

l'appareil de Golgi (Zuber et al, 1997). Très récemment, Köhl *et al.* (2000) ont montré que le CFR empêche également la sécrétion du FGF-3 synthétisé en le séquestrant dans l'appareil de Golgi. Quant à la forme soluble du CFR, elle pourrait jouer un rôle identique à celui des FGFR tronqués. Ainsi, même si les effets du CFR sur l'activité biologique des FGFs sont encore très peu connus, il semble néanmoins que leur présence extra- et/ou intra-cellulaire régule de manière importante les réponses des cellules-cibles aux FGFs.

II.2/ Les récepteurs de basse affinité

Une des propriétés des FGFs est leur forte affinité pour l'héparine, ce qui permet d'ailleurs de purifier sélectivement ces facteurs de croissance (Burgess et Maciag, 1989). Cette affinité reflète l'affinité pour les molécules de type héparine, les protéoglycannes de type héparane sulfates (HSPG). Ces molécules de haut poids moléculaire représentent les sites de liaison de basse affinité des FGFs et possèdent un Kd de l'ordre de 1-10 nM pour le FGF-2 (Fernig et Gallagher, 1994). Les HSPG sont produits par les cellules et sont présents à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus et organes de mammifères (revue dans Kjellen et Lindahl, 1991). Ils interagissent directement avec le FGF-2, modulant ainsi sa distribution et son activité biologique (Iozzo, 1998).

II.2.1/ Caractéristiques structurales

Les HSPG sont composés d'un axe protéique ou core protéique, sur lequel un nombre variable de chaînes de glycosaminoglycannes sulfatés (GAG) de type héparane sulfates sont fixées par des liaisons covalentes O-glycosidiques. Les héparanes sulfates (HS) sont des chaînes linéaires de répétitions d'unités disaccharidiques composées d'un acide hexuronique (acide glucuronique ou iduronique) et d'une D-glucosamine, et dont la longueur varie de 50 à 150 sucres (masse moléculaire de 5000 à 100000). Ces chaînes polysaccharidiques sont plus ou moins sulfatées (O- et N-sulfatation) et N-acétylées. L'ensemble de ces modifications donnent lieu à de nombreux HS qui diffèrent dans leur structure, dans la nature des unités saccharidiques et dans le degré de sulfatation de celles-ci. En particulier, le degré de sulfatation des HSPG influence fortement l'effet

protecteur de ces molécules vis à vis des enzymes de dégradation (Coltrini et al, 1993) et leur effet sur les activités biologiques du FGF-2 et du FGF-1 telles que la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire (Brickman et al, 1998; Nurcombe et al, 2000). Par ailleurs, la nature du groupement sulfate joue un rôle différent dans la fixation du FGF-2 sur ses récepteurs de basse affinité et son activité biologique. En effet, les groupements N-sulfates et 2-O-sulfates des HS sont indispensables pour la fixation du FGF-2 (Ishai-Michaeli et al, 1992; Turnbull et al, 1992). Quant à la 6-O-sulfatation, si elle influence peu la fixation du FGF-2, sa présence dans les HS et l'héparine semble néanmoins requise pour l'activité mitogène du FGF-2 (Pye et al, 1998; Lundin et al, 2000). Par ailleurs, l'enchaînement même des sucres des HS est crucial : Turnbull *et al.* (1992) ont identifié la séquence dissaccharidique d'un acide iduronique O-sulfaté et d'une glucosamine N-sulfatée (Ido(2-OSO₃) alpha 1,4 GlcNSO₃) comme étant nécessaire à la fixation de l'héparane sulfate sur le FGF-2. Ces modifications des héparanes sulfates jouent donc un rôle primordial dans la spécificité d'interaction et de liaisons des HSPG avec leurs ligands présents dans la matrice extracellulaire et dans divers processus biologiques (revue dans Turnova et al, 2000). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les HSPG intervenant dans la régulation de l'activité du FGF-2. Ce dernier est capable de se fixer *in vivo* sur trois types principaux d'HSPG : le syndecan, le glypican et le perlecan. Mais dans la plupart des études *in vitro*, l'héparine est couramment utilisée de manière pratique et fonctionnelle pour mimer les effets des HSPG sur les cellules.

II.2.1.1/ Le syndecan

Les premiers HSPG pouvant fixer le FGF-2 ont été identifiés en 1990 comme appartenant à la famille des syndecans (syndecans 1-4) (Kiefer et al, 1990). Ces protéines transmembranaires de 309 acides aminés portent dans leur domaine extracellulaire des GAG essentiellement de type héparane sulfates, et leurs domaines C-terminal et transmembranaire sont très conservés. Il a été montré que les syndecans sont capables de réguler positivement la signalisation et l'activité biologique du FGF-2 en permettant la formation d'un complexe ternaire FGF-2-FGFR-HSPG hautement actif (Steinfeld et al, 1996). Les résultats de la transfection de cellules endothéliales par le syndecan-1 ou le syndecan-4 ont montré que dans ces cellules, l'expression du syndecan-4 augmente la prolifération et la migration des cellules induites par le FGF-2 et que cet effet

spécifique du syndecan-4 est médié par son extrémité cytoplasmique, probablement via l'activation de la protéine kinase C (Volk et al, 1999). Dans des cellules de lymphome, l'expression du syndecan-1 est capable de réguler positivement l'activité du FGF-2 (Filla et al, 1998). De plus, les syndecans possèdent un site de clivage protéolytique près de leur région transmembranaire (revue dans Bernfield et al, 1992), et la formation de syndecans solubles peut réguler l'activité du FGF-2. En effet, le relargage de leur domaine extracellulaire dans le milieu de culture inhibe l'activité mitogène du FGF-2 probablement en séquestrant les molécules de FGF-2, les empêchant ainsi de se fixer aux FGFRs (Zhou et al, 1997; Kato et al, 1998).

Si les syndecans sont capables de réguler l'activité du FGF-2, le FGF-2 peut aussi moduler cette régulation en influençant lui-même l'expression des syndecans par l'intermédiaire de l'élément de réponse spécifique, le FiRE (FGF-inducible responsive element) présent dans le gène du syndecan-1. Il a été montré que l'augmentation de la transcription des ARNm du syndecan-1 par le FGF-2 passerait par l'activation de la PKA (Protein Kinase AMPc dépendante) qui stimulerait la fixation de facteurs de transcription tels que l'AP-1 (Activator protein-1) sur le FiRE (Jaakkola et al, 1998; Pursiheimo et al, 2000). Le FGF-2 est également capable d'induire l'expression du syndecan-3 lors du développement des membres (Dealy et al, 1997) ou de l'ossification (Shimazu et al, 1996), et du syndecan-4 dans des cellules musculaires (Cizmeci-Smith et al, 1997). Compte tenu de l'effet potentiateur des récepteurs de basse affinité sur la signalisation du FGF-2, ces données montrent que ce facteur de croissance peut exercer un rétrocontrôle positif sur la prolifération en augmentant le nombre de sites de fixation à la surface des cellules.

II.2.1.2/ Le glypican

Une autre catégorie d'HSPG, les glypicans, peut fixer le FGF-2. Contrairement aux syndecans, ils ne possèdent pas de région transmembranaire mais sont ancrés dans la membrane par l'intermédiaire d'un glycoposphatidylinositol, et ne portent que des héparanes sulfates sur leur domaine protéique (Brunner et al, 1991; Aviezer et al, 1994). Le glypican-1 potentialise la fixation du FGF-2 sur le FGFR1 en augmentant l'affinité du ligand pour son récepteur et permet la stimulation de la prolifération par le FGF-2 (Steinfeld et al, 1996; Bonney-Barkay et al, 1997). De

plus, l'utilisation de son anti-sens atténue la réponse mitogène du FGF-2 dans des cellules épithéliales cancéreuses du pancréas (Kleef et al, 1998). Mais cet effet positif dépend du type cellulaire car la surexpression du glypican-1 dans les cellules endothéliales humaines ne modifie pas la réponse mitogène et migratoire dépendante du FGF-2 (Volk et al, 1999). De plus, l'effet potentiateur du glypican-1 n'est pas spécifique au FGF-2 puisque il stimule également l'activité du FGF-1, mais pas celle du FGF-7, dans les cellules BaF3 exprimant le KGFR (Berman et al, 1999).

II.2.1.3/ Le perlecan

Le dernier type d'HSPG considéré comme sites de basse affinité du FGF-2 est le perlecan, localisé dans les membranes basales et la matrice extracellulaire. Le core protéique, de 400 à 450 kDa, est composé de 5 domaines et porte les chaînes d'héparanes sulfates en N-terminal de la protéine (revue dans Iozzo, 1998). Le perlecan fixe le FGF-2 via ses chaînes d'héparanes sulfates et présente le FGF-2 à ses récepteurs de haute affinité, participant ainsi aux réponses cellulaires induites par ce facteur de croissance. La transfection stable d'antisens du DNA complémentaire du perlecan dans des fibroblastes NIH3T3 et dans des cellules humaines de mélanome entraîne une réduction du niveau de perlecan et la suppression de la croissance et de l'angiogenèse induites par le FGF-2 (Aviezer et al, 1994, 1997). De plus, la digestion par des protéases du perlecan libère le FGF-2 fixé sur ses chaînes d'héparane sulfate, suggérant fortement que *in vivo*, le relargage du FGF-2 par des protéases permet aux cellules tumorales d'assurer la présence de molécules actives sur les sites d'invasion, favorisant ainsi la croissance des métastases et l'angiogenèse tumorale (Whitelock et al, 1996). Plus récemment, les travaux de Sharma *et al.* (1998) sur des cellules de carcinome de colon humain et de mélanome de souris ont permis de conclure au même rôle positif du perlecan sur la tumorigenèse induite par le FGF-7 qui, par ailleurs se fixe sur le core protéique du perlecan et non sur les chaînes d'HS comme le FGF-2 (Mongiat et al, 2000). Notons cependant que la suppression de l'expression du perlecan dans des cellules de fibrosarcome conduit à la stimulation indépendante du FGF-2 de leur prolifération et de leur capacité invasive, soulignant ainsi l'importance du contexte cellulaire pour l'activité biologique du perlecan pendant la progression tumorale (Mathiak et al, 1997).

Ainsi, comme les récepteurs de haute affinité, les sites de fixation de basse affinité, les HSPG, sont essentiels pour l'activité biologique du FGF-2. En effet, ils optimisent la présentation du ligand aux FGFRs et participent à la formation du complexe ternaire FGF-2-FGFR-HSPG. De plus, ils assurent une protection du FGF-2 contre la dégradation protéolytique. De nombreux travaux ont mis en évidence leur contribution essentielle dans le rôle du FGF-2 aussi bien dans un contexte "normal" tel que le développement, que pathologique comme la progression tumorale.

II.2.2/ Rôle des HSPG

C'est vers le milieu des années 1980 qu'il a été reporté que les héparanes sulfate protègent le FGF-2 de la dénaturation thermique (Gospodarowicz et Cheng, 1986) et de la dégradation protéolytique (Saksela et al, 1988). Les HS permettent également de limiter la diffusion du FGF-2 dans un endroit précis d'un tissu, ou entre deux éléments tissulaires, et de le mettre à disposition d'un nombre restreint de cellules (Vlodavsky et al, 1987; Rudland et al, 1996). En diminuant la diffusion du FGF-2, les HSPG augmentent sa probabilité de rencontre avec ses récepteurs de haute affinité à l'approche des cellules, du fait du nombre relativement peu important de FGFRs à la surface cellulaire. Cependant, la présence d'HS à la surface des cellules n'est pas une garantie de la capacité de ces HS à potentialiser l'action du FGF-2. Deux études récentes ont mis en évidence l'importance de la cinétique de fixation du FGF-2 sur ses récepteurs et ont montré que la nature même des chaînes d'HS joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité du FGF-2. En effet, en mesurant la capacité de fixation du FGF-2 à l'aide du Biosensor, Rahmoune *et al.* (1998) ont caractérisé les cinétiques de fixation du FGF-2 sur des HS issus de différents types de cellules mammaires (épithéliales, myoépithéliales, fibroblastiques, et épithéliales cancéreuses) et du milieu conditionné de ces cellules. Ils ont démontré l'existence de deux sites distincts de fixation du FGF-2 sur ces HS : un site qualifié de "slow/low", qui a une vitesse d'association lente et une affinité faible pour le FGF-2; et un site qualifié de "fast/high", dont la vitesse d'association et l'affinité pour le FGF-2 sont élevées. La présence de l'un et/ou l'autre de ces deux sites sur les chaînes d'HS est corrélée à l'activité mitogène du FGF-2. En effet, lorsque les deux sites sont présents sur les HS à la surface des cellules, ces dernières ne répondent pas au FGF-2. En revanche, si les

cellules ne possèdent qu'un seul type de sites HS, le FGF-2 induit leur prolifération. Cette situation existe dans des situations physiologiques et pathologiques. Ainsi, les HS des milieux de culture des cellules myoépithéliales et fibroblastiques possèdent les deux catégories d'HS et sont incapables d'activer le FGF-2, alors que ceux issus des cellules épithéliales "normales" et malignes ne possèdent que le site slow/low et activent le FGF-2. Une explication possible est la suivante : si le FGF-2 s'associe et se dissocie rapidement des HS "fast/high", sa diffusion est possible et il n'y a pas d'action positive sur l'activité biologique de la protéine du fait de la trop grande rapidité de dissociation. La prolifération des cellules n'est alors pas stimulée par le FGF-2. Par contre, lorsqu'il s'associe rapidement et se dissocie lentement des HS "slow/low", une action potentiatrice de stabilisation du complexe FGF-2-FGFR est possible, induisant ainsi l'effet biologique du FGF-2. Cependant, cette hypothèse doit être nuancée par les résultats obtenus par Fernig *et al.* (2000). La prolifération de la lignée cellulaire épithéliale mammaire cancéreuse MDA-MB-231 qui possède les deux types de sites d'HS n'est pas stimulée par FGF-2. Après un traitement par le chlorate de sodium qui réduit la sulfatation des HS, les cellules MDA-MB-231 deviennent sensibles au FGF-2 et ne possèdent alors plus que des sites "fast/high", (mais dont la constante d'association est la moitié de la valeur des sites "fast/high" des cellules MDA-MB-231 non traitées). D'après ces résultats qui diffèrent sur ce dernier point de ceux obtenus par Rahmoune *et al.* (1998), il semble donc que ce ne soit pas la présence seule des sites "fast/high" qui ait en elle-même un effet inhibiteur, mais plutôt la présence combinée des deux types de sites de fixation "slow/low" et "fast/high" (Fernig et al, 2000).

Le rôle des HSPG dans la signalisation du FGF-2 est désormais confirmé. Les sites de fixation de basse affinité stabilisent le complexe ligand/récepteur et participent directement à la formation de complexe multimérique, intervenant de ce fait dans la signalisation du FGF-2 en induisant un signal plus fort (Pantoliano et al, 1994; Spivak-Kroizman et al, 1996; Krufka et al, 1996; Fannon et al, 2000). De plus, une étude récente sur des fibroblastes mammaires de rat a montré qu'un traitement de ces cellules par le chlorate inhibe la réponse mitogène de ces cellules au FGF-2 parallèlement à une réduction partielle ou totale des événements de signalisation induits par le FGF-2 dans les cellules non traitées (Delehedde et al, 2000). Ces résultats soulignent donc l'implication des sites de basse affinité dans la signalisation intracellulaire du FGF-2. Cependant,

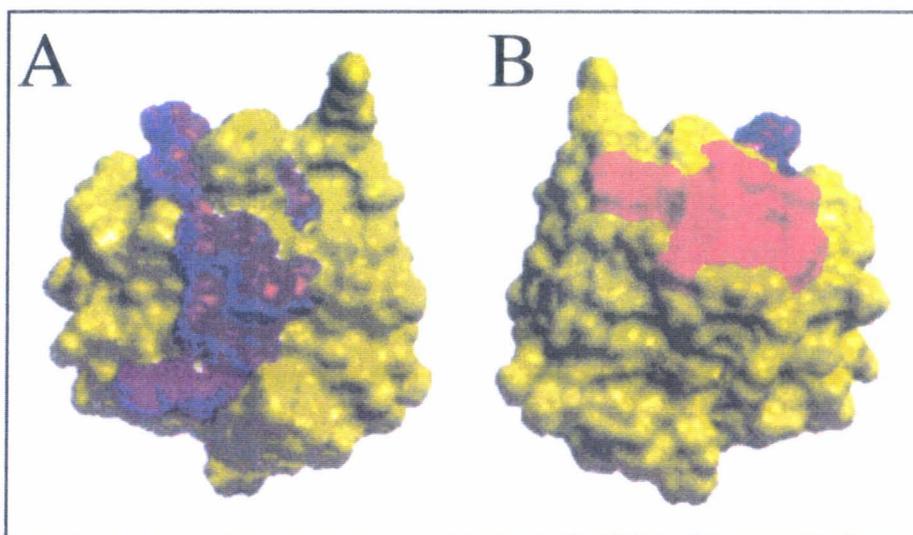


Figure 5 : Représentation tridimensionnelle des sites primaires et secondaires d'interaction du FGF-2 avec le FGFR. A) Les résidus d'acides aminés de la molécule de FGF-2 (en vert) correspondant au site primaire sont en mauve. Le site secondaire n'est pas visible sur cette vue car il est sur la face de la molécule de FGF-2 diamétralement opposée au site primaire. B) Rotation de la molécule de FGF-2 vue en A d'un angle de 180° par rapport à un axe vertical. Les acides aminés correspondant au site secondaire sont en rouge (*d'après Venkataraman et al, 1999*).

in vitro, il existe une dose optimale d'héparine pour la stabilisation du complexe et la transphosphorylation du récepteur. En effet, à forte concentration, l'héparine a un effet négatif sur l'action du FGF-2. Cet effet biphasique peut s'expliquer par le modèle d'interaction des molécules sulfatées avec le FGF-2 et les FGFRs proposé par Ornitz *et al.* (1992, 1995) et Spivak-Kroizman *et al.* (1994) et dans lequel l'héparine ou les HS établissent un pont entre les deux complexes FGF-2-FGFR. En effet, ils ont montré qu'à concentration optimale, l'héparine fixe simultanément deux molécules de FGF-2, facilitant leur fixation sur un dimère de FGFR. Mais en excès, l'héparine, qui ne fixe alors plus qu'une seule molécule de FGF-2, abolit la formation des dimères de FGF-2 et inhibe la signalisation de ce facteur de croissance. D'autres travaux supportent le modèle dans lequel les HS ne sont pas absolument indispensables pour la signalisation du FGF-2 mais la facilitent en augmentant le temps d'association entre le FGF-2 et le FGFR (Roghani et al, 1994; Fannon et Nugent, 1996; Padera et al, 1999).

III- INTERACTION DU FGF AVEC SES RECEPTEURS

Dans ce paragraphe, nous allons détailler les sites de fixation du FGF-2 sur ses récepteurs de haute et de basse affinité, ainsi que les interactions qui existent entre les deux FGFRs du dimère et entre le FGFR et les molécules sulfatées.

III.1/ Les récepteurs de haute affinité (FGFR)

III.1.1/ Interaction FGF - FGFR

III.1.1.1/ Site primaire d'interaction FGF-2-FGFR

Les études qui ont permis une avancée considérable dans la compréhension de l'interaction des FGFs avec les FGFRs ont pris comme modèle structural le FGF-2 avec le FGFR1 principalement, et peu le FGF-1 et le FGFR2. Dans la suite de ce paragraphe, nous évoquerons donc essentiellement les données concernant le FGF-2. Deux sites de fixation du FGF-2 sur le FGFR ont été identifiés (Figures 5 et 6A) : un site primaire où le FGF-2 interagit directement avec le FGFR, et un site secondaire, où le FGF-2 est en contact avec l'autre FGFR du dimère de récepteurs (Springer et al, 1994; Zhu et al, 1995; Plotnikov et al, 1999). Par ailleurs, la fixation du

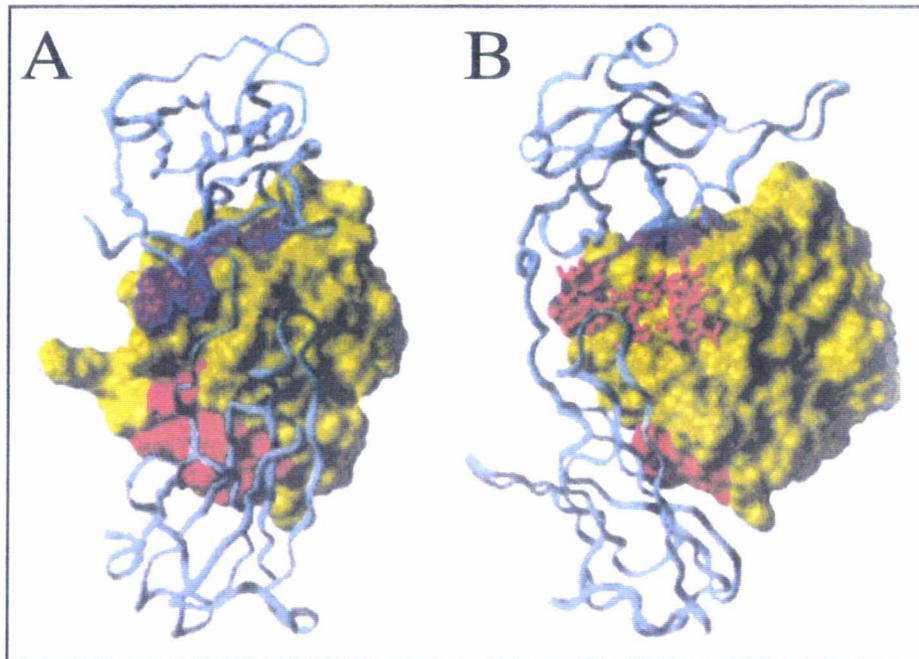


Figure 6 : Modèle moléculaire du complexe du FGF-2 avec ses récepteurs.

A) Représentation tridimensionnelle du complexe FGF-2-FGFR : La molécule de FGF-2 (en vert) interagit avec les domaines Ig II et III du FGFR (en bleu). La boucle Ig II du FGFR interagit avec le site primaire (en mauve) d'interaction du FGF-2 et la boucle Ig III avec le site secondaire (en rouge). La boucle Ig I n'est pas représentée sur cette figure. Le lien entre les domaines Ig II et Ig III est long et flexible afin de permettre le positionnement correct des deux boucles Ig aux deux faces diamétralement opposées de la molécule de FGF-2. B) Représentation tridimensionnelle de l'interaction du FGF-2 avec le FGFR et les chaînes d'héparanes sulfates (HS). Le site de fixation des HS (en orange) se situe entre les sites primaire (en mauve) et secondaire (en rouge) du FGFR (en bleu) sur la molécule de FGF-2 (en vert). Les HS peuvent se fixer au FGF-2 de telle sorte qu'ils interagissent aussi avec le FGFR (*d'après Venkataraman et al, 1999*).

FGF-1 et du FGF-2 sur leurs récepteurs n'induit aucun changement conformationnel de ces facteurs de croissance (Plotnikov et al, 2000).

Le site primaire représente une surface d'environ 2700 Angstroms², avec un Kd de 41 nM et comprend les interactions du FGF-2 avec des résidus de la boucle Ig II, de la boucle Ig III, et du lien entre ces deux boucles du FGFR1. Les acides aminés du FGF-2 engagés dans le site primaire sont en mauve sur la figure 5A. Les interactions entre le FGF-2 et la seconde boucle Ig sont essentiellement de nature hydrophobe (Baird et al, 1988; Eriksson et al, 1991; Zhang et al, 1991; Springer et al, 1994; Pantoliano et al, 1994; Plotnikov et al, 1999). La mutation individuelle de ces résidus hydrophobes par un résidu Alanine entraîne une diminution dramatique (d'un facteur 100) de la fixation du FGFR1 sur le FGF-2 (Springer et al, 1994). Par ailleurs, trois des acides aminés du FGFR1 interagissant avec le FGF-2 sont conservés entre les quatre isoformes des récepteurs, suggérant que ce site d'interactions hydrophobes doit être conservé pour la fixation des autres membres de la famille des FGFs. Ceci est appuyé par les travaux de Wang *et al.* (1999) qui ont montré que la boucle Ig II isolée du FGFR1 est capable de fixer à elle-seule le FGF-1, le FGF-2 et le FGF-7 avec cependant des affinités différentes.

Les quatre acides aminés (248-252) formant le lien entre les boucles Ig II et III sont très conservés parmi les FGFRs. Des études de mutagenèse dirigée ont mis en évidence l'importance des liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les acides aminés Asn104-Tyr106 et Tyr106-Glu96 du FGF-2. En effet, elles permettent le bon positionnement des résidus Glu96 et Asn104 pour l'interaction avec le FGFR1 en réduisant la liberté conformationnelle des chaînes de ces résidus amino-acides (Zhu et al, 1995, 1997). Les interactions FGF-2-FGFR2 et FGF-1-FGFR1 au niveau du lien entre les deux boucles (figure 6A) sont presque identiques à celles décrites dans le complexe FGF-2-FGFR1 (Plotnikov et al, 2000). L'alignement de séquences des 19 premiers FGFs montre que l'Asn104 du FGF-2 est remplacée par un résidu Asparagine dans la plupart des FGFs. Cependant, les FGF-8, FGF-17 et FGF-18 ont une Thréonine à cette position, dont la chaîne latérale est plus courte que l'asparagine, suggérant que l'affinité de ces FGFs pour les FGFRs sera plus faible, alors que la substitution de Asn104 par une Valine dans les FGF-11, FGF-12 et FGF-13 doit entraîner une très forte diminution de la fixation sur les FGFR (Plotnikov et al, 2000).

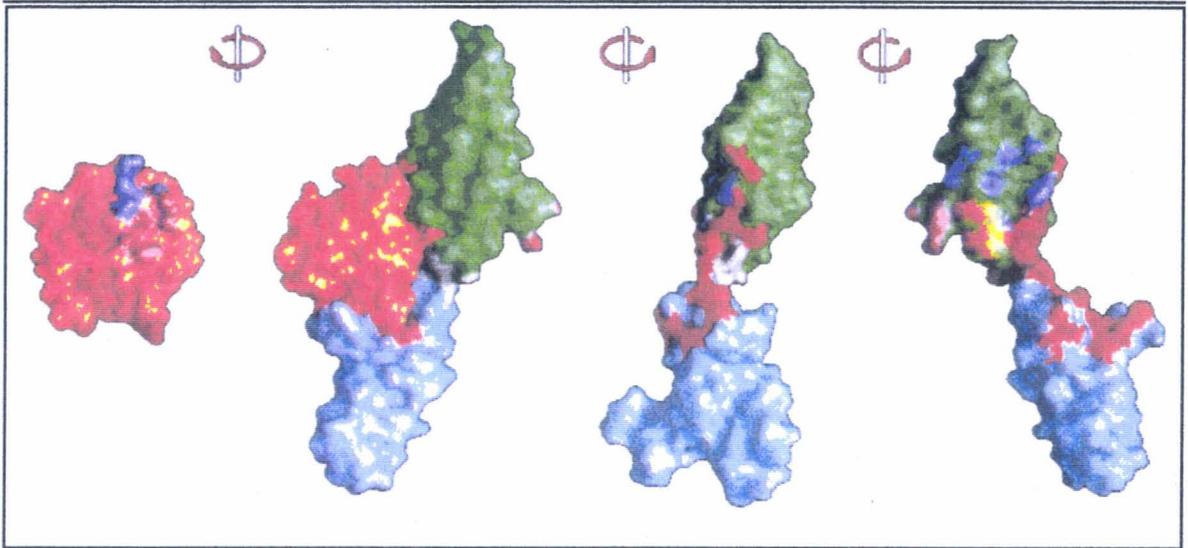


Figure 7 : Localisation des différents sites d'interaction à la surface des molécules de FGF-2 et de FGFR1. La molécule de FGF-2 est en orange, les domaines Ig II et Ig III du FGFR sont en vert et bleu, respectivement. Le lien entre ces deux domaines est en gris. Les sites primaire et secondaire d'interaction FGF-2-FGFR sont respectivement en rouge et en mauve. Le site de fixation des HS est en bleu. La surface des boucles Ig II engagée dans l'interaction directe FGFR-FGFR est en jaune. Pour mieux visualiser les surfaces fonctionnelles sur le FGF-2 et le FGFR, les deux molécules ont été séparées l'une de l'autre et tournées d'un angle de 90° selon l'axe vertical (D'après Plotnikov et al, 1999).

La région C-terminale de la boucle Ig III n'est pas indispensable pour une fixation efficace des FGF-1, FGF-2 ou FGF-7 sur le FGFR1 (Wang et al, 1999). En effet, les interactions entre la boucle Ig III et le FGF-2 ont lieu dans la partie haute (N-terminale) de cette boucle (Yayon et al, 1993; Plotnikov et al, 1999). Les acides aminés du FGF-2 en contact avec la boucle Ig III du récepteur sont différents parmi les 19 autres FGFs étudiés, ce qui peut expliquer la spécificité de reconnaissance entre les différentes isoformes des FGFs et des FGFRs (Wang et al, 1995b; Ornitz et al, 1996).

Ainsi, différentes études structurales des complexes FGF-FGFR, dont la plus récente est celle réalisée par Plotnikov *et al.* (2000), ont permis de mieux comprendre les interactions intermoléculaires entre les FGFs et les FGFRs, représentées sur la figure 7. Il en ressort deux points essentiels :

- Les contacts établis entre les acides aminés du FGF et la boucle Ig II et le lien Ig II-Ig III du FGFR définissent un site général de fixation pour tous les complexes FGF-FGFR. En effet, les acides aminés des deux éléments en contact sont bien conservés parmi les 19 FGFs étudiés et les quatre FGFRs.
- La spécificité FGF-FGFR est due aux interactions entre l'extrémité N-terminale et les régions centrales des FGFs avec la partie N-terminale de la boucle Ig III soumise à l'épissage alternatif. Ces interactions qui sont à la fois de nature polaire et hydrophobe, font intervenir des acides aminés très divergeants entre les différents FGFs et FGFRs, contribuant ainsi à la spécificité de reconnaissance FGF-FGFR (Plotnikov et al, 2000).

III.1.1.2/ Site secondaire d'interaction FGF-2-FGFR

Un site d'interaction secondaire entre le FGF-2 et le FGFR intervient pour la stabilisation du dimère de récepteurs. Sept résidus amino acides du FGF-2, indiqués en rouge sur les figures 5B et 6A, établissent des liaisons essentiellement de nature non spécifique (de type Van der Waals) avec l'autre FGFR du dimère sur une surface de seulement 735 Angstroms² (en mauve sur la figure 7). La nature non spécifique des contacts pourrait permettre à d'autres combinaisons FGF-FGFR d'adopter une forme dimérique (Plotnikov et al, 1999).

III.1.2/ Interactions FGFR-FGFR

L'activité biologique des FGFs requière la dimérisation des récepteurs après la fixation du ligand. Plotnikov *et al.* (1999) ont montré que la dimérisation des récepteurs est stabilisée par deux types d'interactions : celles du FGFR avec le FGF-2, décrites précédemment, et celles des deux FGFRs entre eux. En ce qui concerne le FGFR1, ces interactions sont limitées dans la région N-terminale de la boucle Ig II, pour une surface de contact de seulement 300 Angstroms² (en jaune sur la figure 7). Les liaisons sont de type hydrophobe (Ala171-Ala171), hydrogène (Thr173-Thr173 et Lys172-Asp218) et de Van der Waals (Ala171-Ala171 et Lys172-Lys172). Les acides aminés impliqués dans ces interactions entre les deux récepteurs sont plus ou moins conservés entre les quatre récepteurs, mais les interactions à l'interface des deux récepteurs sont compatibles avec une hétérodimérisation des récepteurs. Cette observation à partir d'analyse structurale est confirmée par des données *in vitro*. En effet, dans des cellules NIH3T3 transfectées à fois par le FGFR1 et le FGFR2, le FGF-1 est capable d'induire une transphosphorylation hétérologue entre les deux isoformes des récepteurs (Bellot et al, 1991).

III.2/ Les sites de basse affinité

III.2.1/ Interaction FGF-2-héparine

Des sites spécifiques de fixation de l'héparine sur le FGF-2 ont été identifiés par analyse structurale du FGF-2 complexé ou non à des oligosaccharides et sont indiqués dans les figures 6B et 7. Le FGF-2 s'associe à l'héparine avec une constante de dissociation de l'ordre de 470 nM -soit 10 fois plus élevée que pour les récepteurs de haute affinité (Pantoliano et al, 1994)- par l'intermédiaire d'un groupement de résidus d'acides aminés basiques à la surface du FGF-2, et dont la distribution de la charge positive est perpendiculaire à l'axe de symétrie du FGF-2. Le site primaire de fixation qui possède la plus grande affinité pour l'héparine, est constitué des chaînes latérales des résidus Asn28, Arg121, Lys126 et Lys135 du FGF-2. Un site de plus faible affinité, le site secondaire, comprend les résidus Lys27, Asn102 et Lys136 du FGF-2 (Thompson et al, 1994; Faham et al, 1996). Par ailleurs, la fixation de fragments d'héparine sur le FGF-2 n'induit pas de changement majeur dans la conformation du squelette polypeptidique (Faham et al, 1996)

même si l'analyse par spectroscopie à infrarouge a montré un léger changement de conformation au niveau des feuilletts β du FGF-2 suite à la fixation de l'héparine (Prestrelski et al, 1992).

III.2.2/ Interactions héparine-FGFR

En plus des interactions directes du FGF-2 avec ses récepteurs de haute et de basse affinité, des contacts directs s'établissent entre le FGFR et l'héparine, consolidant davantage encore le complexe ligand-récepteur. En effet, il existe un domaine conservé de fixation de l'héparine à l'intérieur même du FGFR. Kan *et al.* (1993) ont été les premiers à définir l'existence d'un canyon chargé positivement sur les faces internes des boucles Ig II des deux récepteurs constituant le dimère. La charge positive du canyon est donnée par six résidus Lys (160, 163, 172, 175, et 177) de la boucle Ig II du récepteur. Ce canyon est prolongé latéralement par les deux molécules de FGF fixées sur cette même boucle de chaque récepteur du dimère. Cet ensemble constitue donc le site de fixation de l'héparine sur le complexe FGF-2-FGFR. L'ajout de l'héparine à ce complexe augmente l'affinité du FGF-2 pour son récepteur d'un facteur 10, suggérant l'importance de ce double contact (Pantoliano et al, 1994). Ces données issues de l'analyse structurale sont appuyées par des études biochimiques qui ont déterminé la longueur minimale de l'héparine nécessaire à la signalisation du FGF-2 (Ishihara et al, 1992; Omitz et al, 1992; Ishai-Machaeli et al, 1992). Les résultats indiquent qu'un hexasaccharide dérivé de l'héparine est incapable d'augmenter l'affinité du ligand pour son récepteur et d'induire la prolifération dépendante du FGF-2, et n'est donc pas potentiateur de l'effet biologique du FGF-2. En revanche, de par sa grande affinité pour le FGF-2, un hexasaccharide peut inhiber l'interaction des HSPG présents à la surface des cellules et ainsi, diminuer la prolifération induite par le facteur de croissance. L'oligosaccharide le plus court biologiquement actif est un octasaccharide, et l'activité augmente parallèlement au nombre d'unités saccharidiques jusqu'à atteindre un plateau à partir d'un dodécasaccharide. Ainsi, ce dernier est assez long pour atteindre les deux sites de fixation sur le FGFR et sur les molécules de FGF-2, et par conséquent stabiliser l'interaction FGF-2-FGFR et potentialiser l'activité biologique du FGF-2. Par contre, l'hexasaccharide, s'il est assez long pour se fixer sur le canyon dans les FGFR, n'est pas assez long pour atteindre ceux des FGF-2, ce qui peut expliquer son manque d'effet activateur.

Les résultats de l'étude structurale réalisée par Plotnikov *et al.* (1999) sont concordants avec des travaux antérieurs (Eriksson *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1991; Venkataraman *et al.*, 1999). Cependant, de par la construction du FGFR utilisée (seulement les boucles Ig II et III), cette étude ne montre pas les éventuels rôles de la boucle Ig I et de la boîte acide située entre les boucles Ig I et II, qui comme nous l'avons vu dans le paragraphe concernant la structure du FGFR, peuvent réguler l'activité biologique du FGF-2. Une interaction entre la boîte acide et les résidus basiques du site de fixation de l'héparine de la boucle Ig II pourrait être responsable de cet effet régulateur. En effet, en empêchant d'une part l'héparine de se fixer sur le récepteur, et d'autre part en recouvrant partiellement les boucles Ig II et III, site de fixation du FGF, la boucle Ig I aidée de la boîte acide serait capable d'affecter l'interaction du FGF-2 avec son récepteur (Wang *et al.*, 1995a).

IV/ SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES FGFs

Dans les cellules eucaryotes, la phosphorylation des protéines constitue un des principaux mécanismes de régulation des processus cellulaires. Cette réaction, simple et réversible, permet à elle seule de produire un changement conformationnel qui peut affecter l'état d'agrégation d'une protéine, ses interactions avec d'autres molécules, sa translocation d'un compartiment à un autre, et aussi sa fonction physiologique. Cette réaction est catalysée dans la cellule par des protéines kinases qui représentent un groupe de phosphotransférases d'une grande diversité. Les protéines kinases ont en commun la région qui porte l'activité enzymatique, région très conservée au cours de l'évolution. En revanche, les domaines non directement liés à cette fonction sont très divergents et sont importants pour la localisation cellulaire, la régulation et l'activation de ces enzymes, qui sont elles-mêmes très régulées (Hanks *et al.*, 1988). On peut mesurer l'importance de cette régulation en notant qu'un certain nombre de protéines kinases qui ont perdu la capacité d'être régulées peuvent induire la transformation cellulaire. En effet, presque 50% des oncogènes décrits jusqu'à présent codent pour des protéines kinases qui sont constitutivement hyperactives. Parmi ces protéines, on trouve les tyrosine-kinases, capables de transférer un groupe phosphate de l'ATP sur un résidu tyrosine.

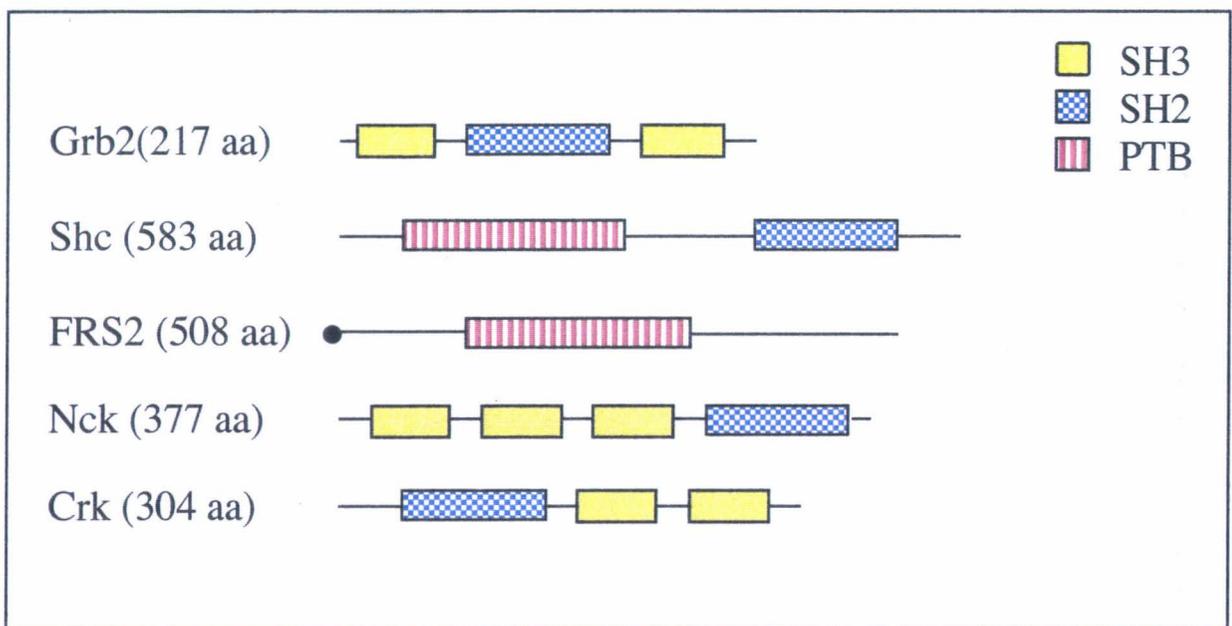


Figure 8 : Organisation structurale des protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation du FGF. SH, src-homology; PTB, Phosphotyrosine binding, ●, site de N-myristoylation en N-terminal de FRS2.

Les cascades de signalisation formées par les réseaux de protéines kinases permettent à la cellule d'amplifier rapidement le signal avec une faible consommation d'énergie et sont déclenchées par des protéines variées, et notamment les facteurs de croissance. Ces protéines de signalisation contiennent souvent des domaines conservés qui ne possèdent pas d'activité catalytique, les domaines SH2 et SH3. Le domaine SH2 (Src Homology 2) composé d'une centaine d'acides aminés, participe directement à la fixation du substrat en reconnaissant des courtes séquences peptidiques contenant des tyrosines phosphorylées. Quant aux domaines SH3, ils sont responsables de l'interaction protéine-protéine en se fixant sur des courtes séquences peptidiques riches en proline. Les protéines à domaine SH2 sont subdivisées en deux classes : la classe I qui porte une activité enzymatique comme les protéines Src, PLC, ou PKC, et la classe II qui est représentée par les adaptateurs comme Grb2, Shc, ou Nck, dans lesquels le domaine SH2 est associé avec d'autres régions conservées et sans activité catalytique. L'ensemble de ces protéines joue un rôle primordial dans la transduction des voies de signalisation dont nous allons maintenant étudier le détail en ce qui concerne le FGF.

IV.1/ Les protéines adaptatrices

En aval des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que le FGFR, on trouve des protéines adaptatrices à domaines SH2 (Src Homology-2) ou, dans le cas de FRS2, avec un domaine de fixation des phosphotyrosines, le domaine PTB, qui leur permettent de s'associer directement aux tyrosines phosphorylées du récepteur activé. Ces protéines établissent la liaison entre le signal membranaire et le signal intracellulaire. La figure 8 décrit de manière schématique l'organisation structurale des adaptateurs que nous allons maintenant décrire.

IV.1.1/ Grb2

Grb2 (Growth factor Receptor Binding protein) est une protéine de 23 kDa qui se fixe aux récepteurs des facteurs de croissance. Comme le montre la figure 8, Grb2 contient un domaine SH2 qui interagit avec le récepteur et deux domaines SH3 intervenant dans la fixation du facteur d'échange de nucléotide guanosine Sos (Son of Sevenless), Grb2 et Sos étant constitutivement associés. Ce complexe Grb2-Sos peut activer directement la protéine Ras ou indirectement

lorsqu'il est recruté par d'autres adaptateurs tels que Shc ou FRS2. Récemment, une protéine apparentée à Grb2, Grb14, a été identifiée comme pouvant s'associer au domaine cytoplasmique du FGFR1, et ce, au niveau de plusieurs sites d'autophosphorylation du récepteur (Reilly et al, 2000). En effet, la fixation de Grb14 sur le FGFR1 préalablement activé par le FGF-2, est abolie par des mutations Tyr→Phe dans l'extrémité C-terminale ou par la délétion de la région juxtamembranaire du récepteur. Grb14 aurait un rôle de régulation négative de la signalisation du FGF-2 puisque son expression dans des fibroblastes NIH3T3 diminue la réponse mitogène de ces cellules au FGF-2 (Reilly et al, 2000). Une étude précédente a montré que Grb14 inhibe aussi la prolifération induite par l'insuline dans des cellules CHO transfectées par le récepteur de l'insuline (Kasus-Jacobi et al, 1998), ce qui suggère que Grb14 peut réguler négativement la signalisation de différents mitogènes. D'autres études sont maintenant nécessaires pour identifier les cibles de Grb14 dans la signalisation du FGF-2.

IV.1.2/ Shc

La protéine Shc (SH2 domain-containing Collagen related, figure 8) dont on compte trois isoformes de 46, 52 et 66 kDa, est capable de se fixer et d'être phosphorylée par le FGFR (Vainikka et al, 1994). Dans le cas du FGFR1 de poulet, l'utilisation de peptides synthétiques a montré que Grb2 est capable de se fixer sur la tyrosine 556 (premier domaine kinasique), et Shc sur la tyrosine 764 (extrémité C-terminale) et avec une affinité moindre pour les tyrosines 556 et 728 (second domaine kinasique) du FGFR1 (Ward et al, 1996). Une fois phosphorylée, Shc s'associe alors avec le domaine SH2 de Grb2 (Salcini et al, 1994) ce qui permet l'activation de Sos et de la cascade Ras/MAPK (Mohammadi et al, 1991; Kouhara et al, 1997). Le complexe Shc-Grb2-Sos peut être aussi recruté par un autre adaptateur, p90/FRS2 décrit ci-après. Les trois isoformes de Shc ne semblent pas avoir la même fonction, et en particulier, p66 Shc semble jouer un rôle particulier. En effet, seules les formes de 46 et 52 kDa sont phosphorylées dans les cellules MCF-7 stimulées par le FGF-2; alors que dans les MCF-7 transfectées par *ras*, une surexpression de p66 Shc serait en partie responsable de l'inhibition de croissance induite par le FGF-2 dans ces cellules (Liu et al, 1999). Ces résultats sont en accord avec des travaux réalisés dans des cellules fibroblastiques stimulées par l'EGF et qui ont montré que p66 Shc n'active pas les MAPK et

inhibe l'activation du promoteur c-fos par l'EGF (Migliaccio et al, 1997). Néanmoins, l'expression et l'activation de p66 Shc sont augmentées dans une lignée variante hautement métastatique des cellules de cancer de sein, les MDA-MB-231 (F-11) par rapport à la lignée parentale (Jackson et al, 2000). De plus, dans cette même étude, une analyse par immunoblot révèle une expression plus forte de p66 Shc dans les tumeurs primaires mammaires provenant de patientes avec un envahissement ganglionnaire (N+) comparé aux patientes N-. Ces données suggèrent un éventuel rôle pour cet adaptateur, et en particulier pour la forme de 66 kDa, dans le processus métastatique des cancers du sein, mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer cette implication.

IV.1.3/ FRS2

La protéine FRS2 (FGF Receptor Substrate-2) est une protéine ubiquitaire d'environ 90 kDa, qui sert de pont entre le FGFR et les autres protéines de signalisation. Deux membres de la famille de FRS2 ont été décrits (Kouhara et al, 1997; Xu et al, 1998; Ong et al, 2000) : FRS2 α et FRS2 β , avec une homologie de séquence de 49% (Xu et al, 1998). Comme il est indiqué dans la figure 8, elles contiennent un site de myristoylation en N-terminal qui permet la localisation membranaire de FRS2 nécessaire à sa phosphorylation et la fixation de Grb2, un domaine de fixation des phosphotyrosines (PTB domain) et quatre tyrosines en C-terminal qui une fois phosphorylées, sont des cibles potentielles pour des protéines à domaines SH2 (Kouhara et al, 1997). Les protéines FRS2 ne contiennent donc pas à proprement parler de région SH2, mais c'est le domaine PTB qui reconnaît les tyrosines phosphorylées. L'activation de FRS2 est spécifique du FGF et du NGF et elle est impliquée aussi bien dans des processus de différenciation que de prolifération induits par ces facteurs de croissance (Rabin et al, 1993; LaVallee et al, 1998; Lin et al, 1998; Liu et al, 1999). Récemment, plusieurs études ont montré l'interaction du domaine PTB de FRS2 avec les régions juxtamembranaires de FGFR1 et de TrkA, le récepteur tyrosine kinase du NGF. Pour le FGFR1, c'est surtout la partie N-terminale de ce domaine qui intervient dans cette reconnaissance (Xu et al, 1998; Lin et al, 1998; Ong et al, 2000). Par ailleurs, Ong *et al.* (2000) ont observé une association constitutive de FRS2 avec le FGFR1, indépendamment de l'activation de ce dernier mais cette donnée est controversée par des études précédentes (Wang et

al, 1996a; Kouhara et al, 1997). En revanche, la tyrosine-phosphorylation de FRS2 est dépendante de la fixation du ligand et de l'activation du FGFR (Ong et al, 2000). A l'aide d'anticorps neutralisants anti-FRS2, par surexpression de FRS2 ou par mutagenèse dirigée, il a été montré que l'expression et l'activation de FRS2 sont directement impliquées dans l'activation des MAPK nécessaire à la synthèse d'ADN dans différents types cellulaires, ainsi que dans la différenciation des cellules PC12 induite par le FGF (Kouhara et al, 1997; Hadari et al, 1998; Ong et al, 2000). En effet, une fois activée par tyrosine phosphorylation, FRS2 sert de pontage entre le récepteur et la voie de Ras-MAPK en recrutant le complexe Grb2-Sos soit directement via le domaine SH2 de Grb2 (Ong et al, 1996; Wang et al, 1996a; Kouhara et al, 1997), soit indirectement par l'intermédiaire de Shc (Klint et al, 1995; Goh et al, 1996; Kanai et al, 1997) ou de la phosphatase Shp2 (Ong et al, 1997; Kouhara et al, 1997; Hadari et al, 1998). D'autre part, un nouvel élément dans la signalisation du FGF qui met en exergue l'importance de FRS2 dans l'activité biologique du FGF, a très récemment été identifié : il s'agit d'une protéine tyrosine-phosphatase de type récepteur, la protéine LAR (Wang et al, 2000). Ces auteurs ont montré qu'en déphosphorylant FRS2 et une autre protéine de 180 kDa, la phosphatase LAR empêche l'interaction de ces molécules avec Grb2, et de ce fait, réduit l'activation des MAPK par le FGF. Néanmoins, FRS2 n'est pas nécessairement requise pour la prolifération induite par le FGF, comme dans les cellules NIH3T3 transformées par *v-src* (Curto et al, 1998). De même, dans les cellules myoblastiques L6 transfectées par un variant naturel du FGFR1 délété de portions des boucles Ig II et III, une stimulation par le FGF-1 ou le FGF-2 n'induit non plus pas de phosphorylation de FRS2 (Lopez et Korc, 2000). Par ailleurs, une interaction entre FRS2 et les PKC λ et ζ activées a été détectée dans les fibroblastes Swiss 3T3 stimulés par le FGF-2. Cette association permettrait le recrutement de ces PKC près de la membrane où elles pourraient alors phosphoryler leurs substrats (Lim et al, 1999).

IV.1.4/ Nck

L'adaptateur Nck (Novel Cytoplasmic Kinase) représenté dans la figure 8 est une protéine comportant trois domaines SH3 et un domaine SH2 (Lehmann et al, 1990). Nck est phosphorylé après addition de facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF dans les fibroblastes NIH3T3

et dans les cellules A431 de carcinomes squameux (Roche et al, 1996; Lawe et al, 1997). L'utilisation de dominants négatifs de Nck et de Grb2 chez le Xénope a montré que ces deux adaptateurs sont requis pour l'activation des MAPK et l'induction du mésoderme induits par le FGF. En revanche, dans les cellules humaines 293, seul Grb2 est indispensable à l'activation des MAPK (Gupta et Mayer, 1998), alors que dans les cellules PC12, la surexpression de Nck inhibe l'induction de neurites induite par le FGF-2, indépendamment des MAPK (Rockow et al, 1996). Dans les cellules épithéliales MCF-7 transfectées par *ras*, Nck est tyrosine-phosphorylé après traitement par le FGF-2, qui inhibe la synthèse d'ADN de ces cellules, mais ne l'est pas dans les MCF-7 parentales dont la prolifération est stimulée par le FGF-2, suggérant un rôle négatif de Nck activé sur la prolifération des cellules MCF-7 (Liu et al, 1999). Dans les cellules endothéliales porcines, une stimulation par le FGF-2 n'entraîne pas non plus la phosphorylation de cet adaptateur, et la transfection de la protéine sauvage ou mutée ne modifie pas la prolifération induite par le FGF-2 (Larsson et al, 1999). Au vu de l'ensemble de ces travaux, il semble que le recrutement de la protéine Nck et son rôle dans les activités biologiques du FGF dépendent du type cellulaire étudié ainsi que de l'origine des cellules. D'autres études sont nécessaires pour définir le rôle exact de Nck dans la signalisation du FGF.

IV.1.5/ Crk

Crk (Chicken Related Kinase) est un protooncogène cellulaire dont il existe deux isoformes, Crk I (28 kDa) et Crk II (42 kDa) (Matsuda et al, 1992; Reichman et al, 1992). Crk II possède un domaine SH2 suivi de deux domaines SH3 (Figure 8), alors que Crk I comporte un domaine SH3 en moins. Crk peut être tyrosine-phosphorylé par le PDGF mais sans apparente conséquence sur les effets biologiques de ce facteur de croissance (Yokote et al, 1998) et par le NGF lors de la différenciation des cellules PC12 (York et al, 1998). Ce n'est que récemment que la tyrosine-phosphorylation de Crk a été montrée après stimulation par le FGF-2 de cellules endothéliales. Cette étude montre que la formation d'un complexe stable entre le FGFR1 et Crk est dépendante du FGF-2 et qu'elle se fait par l'intermédiaire du résidu Tyr463 phosphorylé dans le domaine juxtamembranaire du FGFR1. La mutation de cette tyrosine en phénylalanine inhibe la phosphorylation de Crk par le FGFR1 et réduit l'activation des MAPK et la prolifération médiées

par le FGFR1, mais pas la migration des cellules (Larsson et al, 1999). Cependant, la nécessité et l'importance de Crk, ainsi que les voies de signalisation activées par cet adaptateur dans les réponses cellulaires médiées par le FGF restent à préciser.

IV.2/ Les protéines à activité enzymatique

IV.2.1/ Src

La famille Src est constituée de neuf enzymes fortement apparentées, dont trois d'entre elles, dont Src, ont été initialement détectées sous leur forme oncogénique dans les génomes de virus (*v-src*, virus du sarcome de Rous). La protéine tyrosine kinase Src est localisée dans la membrane cellulaire grâce à sa séquence N-terminale qui permet la myristoylation de la protéine. Src comporte également un domaine SH3 et un domaine SH2 qui reconnaît et se fixe sur des résidus tyrosine phosphorylés et qui intervient également dans la régulation de l'activité catalytique de Src. Le domaine catalytique de Src comporte la Tyr-416 qui constitue le site majeur de phosphorylation de Src *in vivo* et qui, une fois phosphorylée, permet l'activation de la kinase Src. Enfin, le domaine C-terminal joue un rôle de régulation négative dans l'activité kinasique de Src. En effet, la phosphorylation de la Tyr-527 par la kinase C-terminal de Src (CSK) stabilise des interactions intramoléculaires qui inhibent l'activité catalytique de Src en la maintenant dans une conformation inactive (revue dans Schwartzberg, 1998).

Src interagit (in)directement avec les récepteurs tyrosine-kinases de plusieurs facteurs de croissance, tels que le PDGF, l'EGF, le NGF, l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), et les FGFs (revue dans Abram et Courtneige, 2000). Dans le cas du FGF, l'activation de cette tyrosine-kinase par les FGF-1 et FGF-2 a été étudiée dans plusieurs types cellulaires. Src semble être un substrat potentiel pour le FGFR, mais son association directe avec celui-ci semble controversée. En effet, Zhan *et al.* (1994) ont identifié un complexe FGFR1-Src dans les fibroblastes NIH3T3, alors qu'une telle association n'a été détectée ni dans ces mêmes cellules, ni dans des cellules endothéliales (Landgren et al, 1995), ni dans les myoblastes L6 pour le FGFR3 (Kanai et al, 1997). D'autre part, l'équipe de Landgren (1995) a montré que l'activité mitogène du FGF-2 peut activer ou inhiber Src selon le type cellulaire étudié, et que la PKC est responsable de l'inhibition

de l'activité de Src. Notons que la formation d'un complexe Src-PKC δ a été reportée, entraînant alors la tyrosine phosphorylation et la diminution de l'activité de la PKC δ (Zang et al, 1997). Ces données suggèrent l'existence d'un rétrocontrôle négatif réciproque de la PKC sur Src et de Src sur la PKC δ , mais dont la signification biologique reste à déterminer. Néanmoins, la transfection de cellules humaines de mélanomes et de fibroblastes par un FGFR1 dominant négatif (domaine kinasique) entraîne une forte diminution de l'activité de Src, de la prolifération et de la tumorigénicité de ces cellules, indiquant une contribution active de Src, activée par le FGFR1 dans la progression tumorale (Yayon et al, 1997). De plus, le pouvoir transformant de Src dans les NIH3T3 passe par une association constitutive du FGFR1 avec le complexe Shc-Grb2-Sos, alors que dans les cellules non transformées, le FGF induit une interaction du récepteur avec la phospholipase C gamma et l'adaptateur FRS2 (Curto et al, 1998). Ces résultats indiquent que Src est capable de stimuler la prolifération par la voie Ras/Raf/MAPK en recrutant préférentiellement le complexe Grb2-Sos par la protéine Shc, et non par FRS2. Par ailleurs, une étude *in vitro* a démontré une activation possible de Raf-1 par Ras et/ou Src, ces deux protéines agissant de manière synergique sur l'activation de Raf-1 (Stokoe et McCormick, 1997). D'autres protéines recrutées et activées par Src ont été identifiées. En effet, l'expression de Src dans les cellules épithéliales mammaires humaines HB4a (Smith et Crompton, 1998), dans les cellules Ba/F3 de souris (Odajima et al, 2000) et dans les cellules NIH3T3 (Zhang et al, 2000) active STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), qui induit alors la transcription de molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (cyclines D2 et E, c-myc). Il reste à déterminer si Src active aussi STAT3 dans le signal induit par le FGF, mais une étude récente laisse à penser qu'il existe un lien entre le FGFR et les facteurs de transcription STAT. En effet, l'expression de FGFR (R1, R3, ou R4) mutés rendus constitutivement activés dans des fibroblastes NIH3T3 entraîne la transformation cellulaire et l'activation, entre autres, de STAT1 et STAT3 (Hart et al, 2000).

D'autres réponses cellulaires induites par le FGF-1 ou le FGF-2 passent par une activation de Src. En effet, Src est impliquée dans la différenciation des cellules neuronales par l'intermédiaire de Ras, de Shc, des MAPK, et des Focal Adhesion Kinases (FAK) (Kremer et al, 1992; Kuo et al, 1997; Klint et al, 1999). La migration induite par le FGF est également

dépendante de Src dans plusieurs modèles -ce point est discuté dans la revue de Boilly *et al.* (2000) fournie en annexe-. Alors que des cellules qui n'expriment pas Src (Src^{-/-}) prolifèrent encore, elles ont perdu la capacité de migrer en réponse au FGF-1 (Liu et al, 1999). Le rôle de Src dans la migration cellulaire induite par le FGF passe par la tyrosine phosphorylation de protéines associées au cytosquelette, telles que la cortactine (Zhan et al, 1994; LaVallée et al, 1998; Liu et al, 1999) et les kinases FAK (Nurcombe et al, 2000). Ces dernières sont d'ailleurs capables d'activer la voie Ras/MAPK, soit en s'associant directement avec le complexe Grb2-Sos (Schlaepfer et al, 1994), soit indirectement en phosphorylant Shc (Schlaepfer et al, 1998).

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle pour Src dans les cancers dont le cancer du sein (revue dans Biscardi et al, 1999). L'activité tyrosine kinase est nettement plus élevée dans les tumeurs mammaires que dans les tissus sains (Hennipman et al, 1989), et en particulier, la fraction cytosolique contient environ 14 fois plus d'activité tyrosine kinase, dont 70% peuvent être attribués à Src (Ottenholff-Kalff et al, 1992). Les modèles de souris transgéniques indiquent également un rôle pour Src, notamment dans la tumorigénèse mammaire induite par le virus PymT (Polyoma middle T). Dans ce cas, les tumeurs et les métastases pulmonaires contiennent un haut niveau d'activité de Src, et ces tumeurs ne se développent pas dans des souris transgéniques Src^{-/-} (Guy et al, 1993). De plus une activation constitutive de Src par mutation entraîne des hyperplasies et une tendance à la néoplasie dans la glande mammaire de souris (Webster et al, 1995).

IV.2.2/ La phospholipase C gamma (PLC γ)

La PLC γ est une protéine à domaine SH2 dont l'activation permet l'hydrolyse de phospholipides inositols pour générer les seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Les travaux de Magnaldo *et al.* (1986) sur les fibroblastes CCL39 et de Moenner *et al.* (1987) sur des cellules épithéliales bovines ont suggéré que la PLC γ n'est pas impliquée dans la prolifération induite par le FGF dans ces cellules, malgré le fait que dans les cellules NIH3T3, le FGF-1 soit capable de tyrosine-phosphoryler cette enzyme (Burgess et al,

1990). D'ailleurs, le FGFR1 phosphoryle et active davantage la PLC γ que le FGFR4 (Vainikka et al, 1992). C'est en 1991 que Mohammadi *et al.* identifie la tyrosine 766 phosphorylée située à l'extrémité cytoplasmique du FGFR1 comme site de fixation du domaine SH2 de la PLC γ . La mutation de ce résidu Tyr-766 en une phénylalanine (F) sur le FGFR1 empêche la fixation de la PLC γ , l'hydrolyse des phosphatidyl inositols et le relargage du calcium intracellulaire. Mais elle n'a pas d'effet inhibiteur sur la prolifération induite par le FGF dans les myoblastes L6, les cellules BaF3 et les cellules endothéliales, sur la croissance des neurites dans les cellules PC12, et sur l'induction de la chémotaxie et de la migration des cellules endothéliales aortiques (Mohammadi et al, 1992; Peters et al, 1992; Spivak-Kroizman et al, 1994; Sorokin et al, 1994; Landgren et al, 1998). Cependant, dans des cellules hématopoïétiques BaF3 transfectées par le récepteur muté FGFR1 (Y766F), l'activation de Raf-1 et des MAPK diminue d'un facteur trois, et une légère baisse de la prolifération induite par le FGF-1 est observée (Huang et al, 1995). Ceci suggère fortement que la voie activée par la PLC γ n'est pas nécessaire, mais contribue néanmoins à l'activation de la cascade Raf/MAPK par le FGF, indépendamment de la protéine Ras. De plus, l'activation de la PLC γ est associée à l'activité mitogène du FGF-2 dans les cellules endothéliales de cornée (Kay et al, 1998) et participerait au remaniement du cytosquelette déclenché par la prolifération *via* la fixation du domaine SH3 de la PLC γ sur des protéines du cytosquelette (Park et al, 1999). Ainsi, dans plusieurs types cellulaires, le FGF est capable d'activer la PLC γ , mais dans la plupart des cas, cette activation ne semble indispensable ni à la prolifération, ni à la migration induites par le FGF.

IV.2.3/ La protéine kinase C (PKC)

Les PKC sont des sérine/thréonine kinases régulées par le calcium intracellulaire et des seconds messagers lipidiques, tels que le diacylglycérol produit par la PLC. La famille des protéine kinases C (PKC) est subdivisée en trois groupes : les PKC classiques (alpha, beta, gamma) qui sont activés par le calcium et le DAG, les PKC nouvelles (delta, epsilon, eta et theta) qui ne sont

dépendantes que du DAG, et les PKC atypiques (zeta et lambda) indépendantes du calcium et du DAG. Ces enzymes régulent de nombreux processus biologiques comme la croissance, l'apoptose ou l'organisation du cytosquelette (revue dans Toker, 1998). L'implication des PKC dans l'activité mitogène du FGF-2 dépend du type cellulaire étudié et par ailleurs, les isotypes de la PKC semblent intervenir différemment selon le type cellulaire, en fonction de leur sensibilité au calcium intracellulaire et aux phospholipides. En effet, par mesure de la translocation vers la membrane des PKC, ou en utilisant des inhibiteurs et/ou activateurs de PKC (phorbol esters, staurosporine), certaines équipes ont montré une intervention de la PKC dans l'activité du FGF dans des cellules endothéliales humaines (Kent et al, 1995) ou bovines (Presta et al, 1989; Daviet et al, 1990), des oligodendrocytes (Radhakrishna et Almazan, 1994), les fibroblastes Swiss 3T3 (Nanberg et al, 1990) ou des cellules cancéreuses prostatiques de rat (Hrzenjak et Shain, 1997). En revanche, des résultats contraires ont été trouvés dans les mêmes types cellulaires que précédemment, mais d'origine différente. Ainsi, la PKC n'est pas impliquée dans la prolifération dépendante du FGF-2 dans les cellules mésangiales (Issandou et Darbon, 1991), dans des cellules endothéliales murines (Kanda et al, 1997), et dans les fibroblastes de hamster CCL39 (Magnaldo et al, 1986) ou de souris NIH3T3 (Corbit et al, 1999). Pour les autres effets biologiques du FGF-2, la PKC semble requise pour la croissance de neurites dans les cellules PC12 (Corbit et al, 1999), pour la chimotaxie des cellules endothéliales bovines du cortex cérébral (Daviet et al, 1990), ou encore, pour l'inhibition de l'apoptose induite par le FGF-2 dans des cellules endothéliales aortiques bovines soumises à des radiations ionisantes (Haimovitz-Friedman et al, 1994). L'ensemble de ces données montre que l'implication de l'activité enzymatique de la PKC dans les effets biologiques du FGF dépend du type et de l'origine des cellules utilisées, et de ce fait, aucune conclusion générale ne peut être tirée sur l'intervention de la PKC dans la signalisation du FGF-2.

IV.2.4/ La phosphatidylinositol 3' kinase (PI3-K)

La PI3-K est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85) et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110). La sous-unité p85 contient deux domaines SH2 qui peuvent se fixer sur les récepteurs tyrosine-phosphorylés et recruter alors le complexe p85-p110 près de la membrane cellulaire. Une fois activée, la sous-unité p110

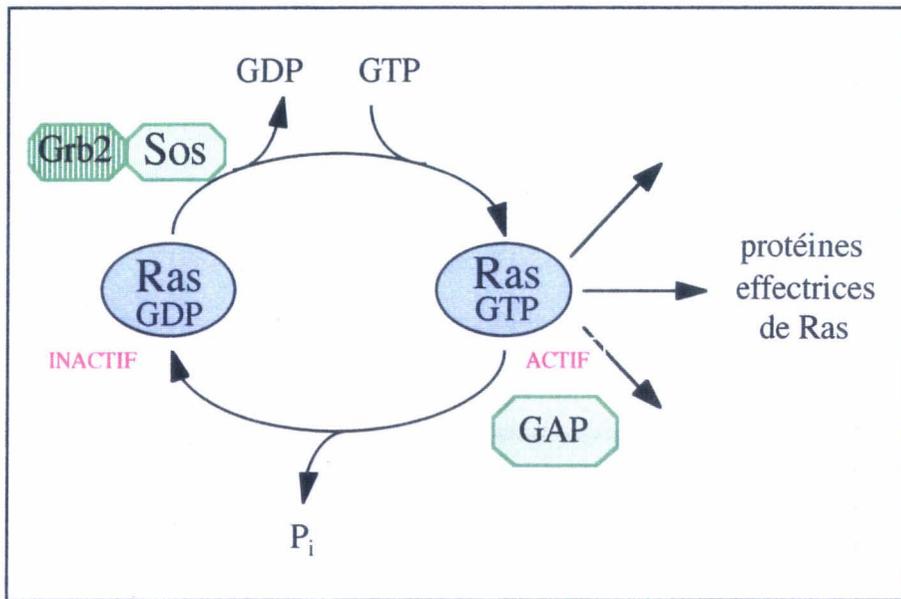


Figure 9 : Cycle d'activation de la protéine Ras.

phosphoryle des composés phosphoinositols (IP, PIP, PIP₂) qui agissent comme second messagers (revue dans Vanhaesebroeck et al, 1997). La PI3-K ne semble pas impliquée dans la transmission du signal mitogène induit par le FGF-2 dans différents types cellulaires, tels que les cellules musculaires (Milasincic et al, 1996; Derossi et al, 1998), les cellules astrogliales (Pomerance et al, 1994) ou les cellules épithéliales (Souttou et al, 1997). Mais une faible activation de cette enzyme a été montrée dans les cellules PC12 stimulées par les facteurs neurotrophiques, le FGF-2 et le NGF, alors que dans ces mêmes cellules, le facteur mitogène l'EGF, induit une très forte activation de la PI3-K (Raffioni et Bradshaw, 1992). La PI3-K pourrait davantage jouer un rôle dans la migration induite par le FGF-2 comme l'indiquent des travaux basés sur l'utilisation d'inhibiteur de cette enzyme, tel que la wortmannine, sur des cellules endothéliales (Landgren et al, 1998; Kay et al, 1998). Ainsi, le rôle exact de la PI3-Kinase dans l'effet biologique du FGF n'est pas encore précisément établi, même si les études citées ci-dessus semblent pencher vers la non-implication de cette kinase, au moins dans la prolifération induite par le FGF-2.

IV.3/ La voie Ras/Raf/MAPK

IV.3.1/ Ras

Les différents adaptateurs que nous venons de décrire établissent le lien entre le récepteur activé et la principale cascade de signalisation activée par les facteurs de croissance, la voie Ras/Raf/MAPK dont la protéine Ras est l'initiatrice. Ras appartient à la famille des protéines fixant les molécules de GTP. L'origine de son nom provient de sa découverte en tant qu'oncogène dans le génome du virus du sarcome de Rat (Rat Sarcoma virus). Ras est une protéine de 20-25 kDa ancrée dans la membrane plasmique et qui, dans son état inactif fixe le GDP, et dans sa forme active, le GTP. Cette étape est catalysée par des facteurs d'échange de nucléotide guanosine, les GEF (Guanosine nucleotide Exchange Factor) dont la protéine Sos fait partie. La réaction inverse qui inactive la protéine Ras est sous le contrôle de l'activité GTPase intrinsèque de Ras, activée par les GAP (GTPase Activating Protein). L'activation de Ras par le complexe Grb2-Sos entraîne l'interaction de Ras avec ces principales protéines effectrices, les Sérine/Thréonine Kinases cytoplasmiques, Raf. Le cycle de l'activation de la protéine GTPase Ras est représenté ci-dessous dans la figure 9.

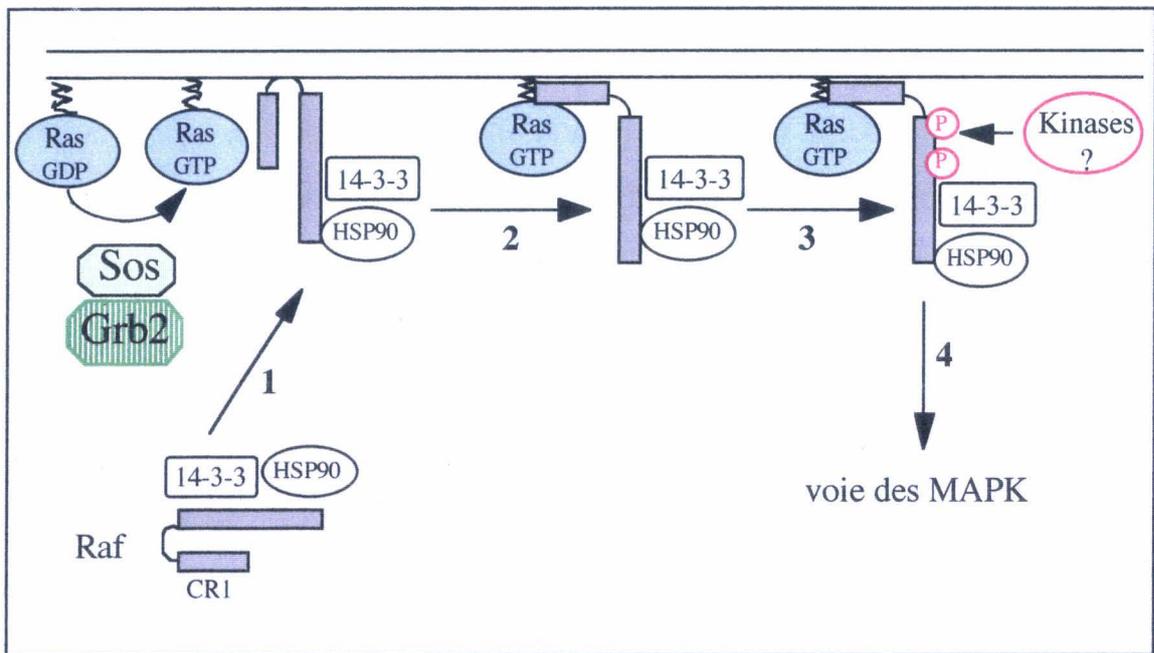


Figure 10 : Activation de la protéine kinase Raf. Etape 1 : relocalisation membranaire de Raf.

Etape 2 : changement conformationnel induit par Ras. Etape 3 : ceci entraîne la phosphorylation de Raf, puis l'activation de la voie des MAPK(Etape 4).

IV.3.2/ Raf

Il existe trois isoformes de Raf : A-Raf et C-Raf ou Raf-1 qui sont ubiquitaires, et B-Raf qui est exprimée essentiellement dans le cerveau et les testicules (revue dans Anton et Wennogle, 1998). La fixation de Ras sur la région N-terminale de Raf qui représente le domaine de fixation de Ras (RDB, Ras Binding Domain) encore appelé région conservée n°1 (CR1, Conserved Region), est nécessaire pour stimuler l'activité catalytique de Raf. En effet, comme le montre la figure 10, cela permet la translocation membranaire de Raf et entraîne un changement conformationnel de celle-ci, exposant alors le domaine CR3 de Raf à des protéines activatrices dont la nature reste à découvrir, et qui seraient activées elles-aussi par Ras (Li et al, 1998). L'activation complète de Raf requière non seulement son interaction avec la membrane plasmique, mais également sa phosphorylation sur des résidus Ser, Thr et Tyr. La protéine tyrosine kinase Src et les Ser/Thr Kinases PKC et KSR (Kinase Suppressor of Ras) seraient impliquées dans cette activation, mais il n'est pas exclu que Raf soit la cible de d'autres kinases qu'il reste à identifier (revue dans Denhardt, 1996). D'autre part, Raf est complexée à des protéines, et en particulier à l'HSP90 et aux protéines de la famille 14-3-3, représentées sur la figure 10. Les protéines 14-3-3 ont été identifiées comme des protéines associées à l'activation de Raf par plusieurs groupes à l'aide d'approches biochimiques et génétiques (Fantl et al, 1994; Freed et al, 1994; Irie et al, 1994, Yamamori et al, 1995). Bien qu'un rôle positif pour les 14-3-3 dans l'activité de Raf ait été mis en évidence dans la levure et la drosophile par des expériences génétiques (Chang et Rubin, 1997; Irie et al, 1994), les études biochimiques *in vitro* sont contradictoires. En effet, alors que certains auteurs rapportent que les 14-3-3 peuvent activer Raf (Freed et al, 1994; Fu et al, 1994; Li et al, 1995; Thorson et al, 1998), d'autres ont montré que la fixation des 14-3-3 n'est pas requise pour l'activité de Raf (Michaud et al, 1995; Suen et al, 1995; Clark et al, 1997). Tzivion *et al.* (1998) ont montré *in vivo* et *in vitro* que l'association des protéines 14-3-3 avec Raf dans un état inactif stabilise cette conformation, et qu'une fois Raf activée, les 14-3-3 facilitent cette activation, peut-être en interagissant spécifiquement avec le domaine kinase.

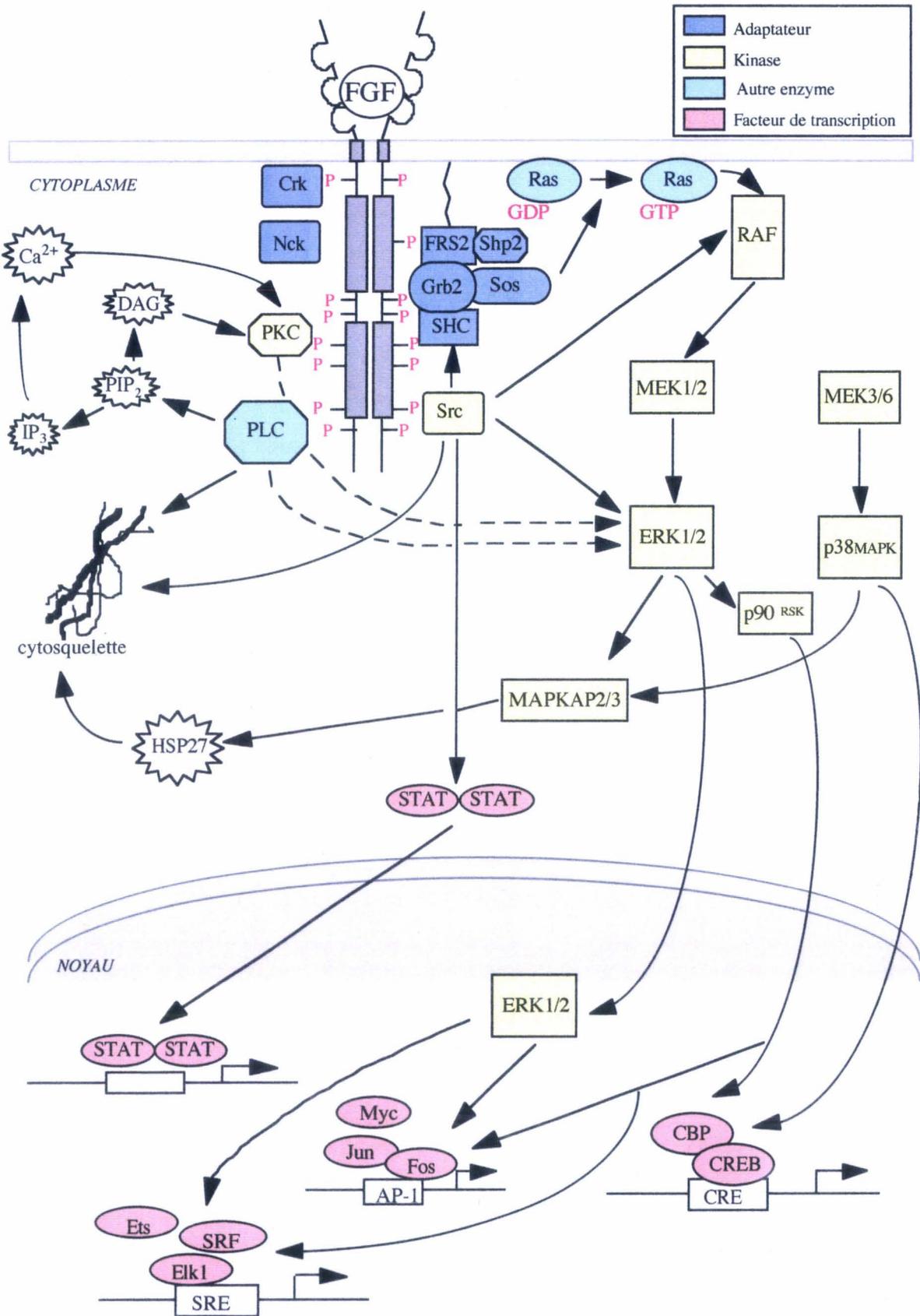


Figure 11 : Signalisation intracellulaire du FGF.

IV.3.3/ Le module des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)

Chez les Mammifères, 11 gènes de MAPK et 7 de MAPKK (ou MEK) ont été identifiés à ce jour. La famille des MAPK comprend trois groupes : les MAPK proprement dites, ou ERK (Extracellular-Regulated-Kinase, ERK1 à ERK5) dont les membres ERK1 et ERK2 sont activés par les MEK1 et MEK2 stimulées par des facteurs de croissance et/ou de différenciation; les JNK/SAPK α , β , γ (NH₂-terminal Jun Kinase / Stress-Activated Protein Kinase) activées par les MEK4 et MEK6; et les p38 MAPK α , β , γ et δ , activées par les MEK3 et MEK6 qui sont impliquées de manière générale dans des réponses au stress cellulaire, à l'inflammation et à l'apoptose (revue dans Lewis et al, 1998). Dans ce chapitre, nous évoquerons principalement les ERK1 et ERK2 (ou p42/p44 MAPK), étant donné leur rôle dans la réponse au FGF.

Une fois activées par la Ser/Thr kinase Raf, les MEK1/2 qui sont des kinases à double spécificité s'associent à leur substrat et le phosphorylent d'abord sur la Tyr183 (pour ERK2) puis sur la Thr185, ces deux événements étant nécessaires pour l'activation complète des ERK1/2 (Burack et Sturgill, 1997). Les ERK1/2 phosphorylées s'homodimérisent (revue dans Cobb et Goldsmith, 2000) et peuvent alors activer des substrats cytoplasmiques, indiqués sur la figure 11, tels que des Ser/Thr kinases et des protéines de signalisation (Sos, MEK). Parmi les kinases, on trouve les MAPKAP kinases (MAPK-activated protein kinases). La MAPKAP kinase-1 (ou p90 ribosomal S6 Kinase, p90RSK) établie un lien entre les MAPK et la régulation des gènes en phosphorylant des protéines impliquées dans la transcription, telles que CREB (cAMP Response Element Binding protein), CBP (CREB Binding Protein), c-fos, ou encore le SRF (Serum Response Factor) (revue dans Frödin et Gammeltoft, 1999). Quant aux MAPKAP kinase-2 et -3, elles peuvent être activées par ERK, p38 MAPK et JNK/SAPK, et phosphorylent l'HSP27 qui intervient dans la régulation de l'assemblage du cytosquelette. Les MAPK (ERK et p38) activent aussi d'autres Ser/Thr kinases, les Mnk1 et Mnk2 (MAPK-interacting kinase) qui régulent l'activité du facteur eucaryote d'initiation de la transcription, eIF-4E (Waskiewicz et al, 1997). De plus, les MAPK sont capables d'autoréguler négativement leur activation en phosphorylant leur propre kinase, MEK1 (Xu et al, 1999) et l'adaptateur Sos, entraînant la déstabilisation des complexes comme Sos-Shc et Sos-Grb2 (Rozakis-Adcock et al, 1995). Par ailleurs, ERK1/2 activées et dimérisées peuvent être transloquées au noyau où elles vont phosphoryler des facteurs

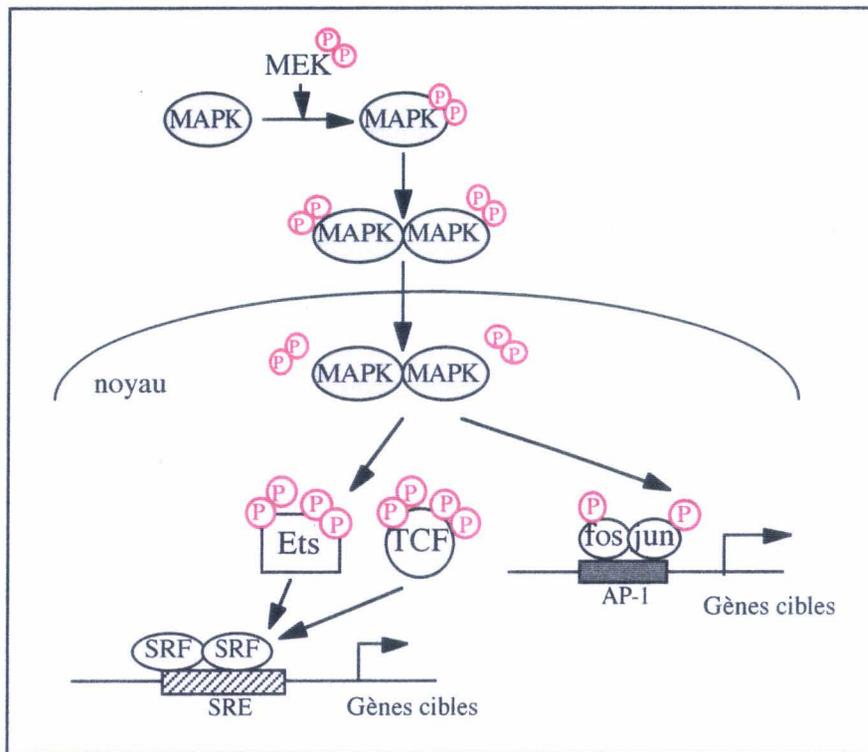


Figure 12 : Activation des facteurs de transcription après translocation nucléaire des MAPK. Le signal mitogène est transmis jusqu'au noyau par l'intermédiaire des MAPK qui vont activer différents facteurs de transcription afin de permettre la transcription de gènes nécessaires à la prolifération.

de transcription nucléaires. Cette translocation nucléaire est indispensable à l'expression des gènes induite par les facteurs de croissance et à l'entrée dans le cycle cellulaire (Lenormand et al, 1993; Lenormand et al, 1998; Brunet et al, 1999; Hulleman et al, 1999). Comme le montre la figure 12, parmi les cibles nucléaires de ERK1/2, il y a le complexe ternaire p62^{TCF}/Elk-1 (Gille et al, 1992; Janknecht et al, 1993) et les facteurs de transcription Ets-1 et Ets-2 (revue dans Wasylyk et al, 1998) qui interagissent tous les trois avec le SRF pour activer la transcription via les SRE (Serum Response Element) présents dans les promoteurs des "immediate early genes". On trouve aussi les facteurs de transcription c-myc (Seth et al, 1992; Davis, 1993), c-jun (Pulverer et al, 1991) et c-fos (Okazaki et Sagata, 1995), les deux derniers se fixant sur le site AP-1 dans le promoteur des gènes cibles.

L'activation des MAPK (ERK1/2) par l'intermédiaire des protéines Ras/Raf principalement, est fréquemment reportée dans les différentes réponses biologiques induites par le FGF. Ainsi, les protéines ERK1/2 sont activées lors de la réponse mitogène au FGF dans des cellules endothéliales (D'Angela et al, 1995; Tanaka et al, 1999; Larsson et al, 1999), des fibroblastes (LaVallee et al, 1998), des cellules épithéliales (Liu et al, 1998), des cellules musculaires (Bogoyevitch et al, 1995; Milasincic et al, 1996; Kanai et al, 1997; Miralles et al, 1998), ou encore dans les cellules BaF3 (Huang et al, 1995). D'autres effets biologiques du FGF tels que la migration (Sa et al, 1995; van Puijenbroek et al, 1997; Nurcombe et al, 2000), la différenciation (Chung et al, 1998; Maher et al, 1999), l'angiogenèse (Tanaka et al, 1999) et l'effet anti-apoptotique du FGF (Gardner et Johnson, 1996) requièrent aussi l'activation des MAPK. De manière intéressante, la réponse mitogène induite par le FGF entraîne généralement une activation rapide et transitoire de ERK1/2, de l'ordre de une à quelques dizaines de minutes (Bogoyevitch et al, 1995; Milasincic et al, 1996; Liu et al, 1998). Par contre, les processus de migration et de différenciation induits par le FGF ont recouru le plus souvent à une activation soutenue des MAPK, de l'ordre de plusieurs heures (van Puijenbroek et al, 1997; Maher, 1999). Ceci n'est pas spécifique au FGF, puisque d'autres facteurs de croissance comme l'EGF ou le NGF utilisent aussi ce différentiel de durée pour l'activation des MAPK selon leur effet mitogène et/ou différenciateur (Traverse et al, 1992; Tombes et al, 1998; Descamps et al, 1998; revue dans Marshall, 1995). Il faut noter que si ERK1/2 sont impliquées dans la signalisation du FGF-2, elles

sont parfois nécessaires mais pas suffisantes pour la réponse biologique induite. De plus, les MAPK peuvent être activées indépendamment des protéines Ras et/ou Raf, mais par d'autres protéines de signalisation telles que la PLC gamma (Huang et al, 1995), la PKC (Schweppe et al, 1997) ou Src (Stockoe et McCormick, 1997; Curto et al, 1998).

En outre, certains travaux récents ont souligné l'implication de la p38MAPK dans la signalisation du FGF-2. Une étude récente publiée en 1999 par Maher a modifié le schéma généralement admis des kinases impliquées dans un signal mitogène. En effet, dans les fibroblastes Swiss 3T3, le FGF-2 induit une activation soutenue de ERK1/2 qui n'est pas indispensable à la stimulation de la prolifération induite par le FGF-2. Par contre, l'activation prolongée de la p38MAPK qui phosphoryle certaines cibles comme la MAPKAP-2, est absolument nécessaire pour la réponse mitogène du FGF-2 dans ces cellules (Maher, 1999). Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec le FGF-1 par LaVallee *et al.* (1998) qui montrent que dans ces mêmes cellules fibroblastiques, la synthèse d'ADN induite par le FGF-1 requière l'activation de ERK1/2. Ainsi, la p38MAPK peut dans certains cas se révéler être plus importante que les ERK1/2 dans l'activité mitogène du FGF-2. Une autre étude appuie ces données : à l'aide de l'inhibiteur spécifique SB203580 et de transfection de la p38MAPK, l'étude de l'activité transcriptionnelle induite par le FGF-2 dans des cellules humaines de neuroblastome a révélé que le FGF-2 stimule la transcription de gènes dépendante du facteur de transcription CREB via l'activation de Ras et de la p38MAPK qui active CREB par phosphorylation (Tan et al, 1996). Ces résultats mettent en exergue l'existence de voies de transduction communes entre un signal de stress qui fait appel généralement à la p38MAPK et le signal déclenché par le FGF-2. La p38MAPK contribue également à d'autres activités du FGF comme l'angiogenèse. En effet, Tanaka *et al.* (1999) ont montré à l'aide d'inhibiteurs que les kinases ERK1/2 et p38MAPK participent ensemble à la formation des vaisseaux sanguins, à la prolifération et à la migration de cellules endothéliales murines stimulées par le FGF-2, en activant la dégradation de la matrice extracellulaire et en entraînant une réorganisation du cytosquelette respectivement. Il semble donc que de plus en plus, on en vienne à découvrir non pas une séparation nette et bien définie entre les voies et les rôles des différentes isoformes de la famille des MAPK, mais au contraire, une implication plus ou moins importante de chacune d'entre elles selon la réponse biologique, avec

l'importance du ratio de leur activité respective, et dans d'autres cas, une convergence possible des signaux de transduction à certains niveaux de la cascade de signalisation.

Comme nous le verrons dans le chapitre 2, les facteurs de croissance tels que les FGFs jouent un rôle important dans la croissance des cellules cancéreuses mammaires. Vue leur importance, l'expression et l'activation de protéines impliquées dans les cascades de signalisation sont donc très étudiées dans cette pathologie, d'autant que la signalisation des hormones stéroïdiennes (oestrogène et progestérone) converge aussi vers certaines de ces protéines, comme les MAPK (Migliaccio et al, 1996; Koibuchi et al, 1997; Lange et al, 1998). Plusieurs études relatent une hyperexpression des ARNm des MAPK dans les cellules mammaires épithéliales malignes ainsi qu'une activité kinasique nettement plus élevée dans les tissus cancéreux que dans les tissus bénins ou normaux (Sivaraman et al, 1997), et dans une lignée cancéreuse mammaire hormono-indépendante par rapport à une lignée de cellules hormono-dépendantes (Coutts et Murphy, 1998). Comme l'ont récemment montré des études sur des lignées cellulaires de cancer du sein, les ERK1/2 et p38MAPK semblent intervenir également dans l'invasion et les métastases tumorales. En effet, Reddy *et al.* (1999) ont montré que l'expression de la protéase MMP-9 dans la lignée cellulaire métastatique SKBR-3 est régulée positivement par une voie impliquant ERK1/2. Quant à la p38MAPK, elle peut réguler l'adhésion des cellules métastatiques MDA-MB-435 sur le collagène IV, un composant de la matrice extracellulaire (Paine et al, 2000) et elle est essentielle pour l'expression d'une autre protéase, l'uPA et de son récepteur uPAR (Huang et al, 2000). Ainsi, non seulement l'activité des MAPK est primordiale dans la croissance des cellules épithéliales de cancer du sein, mais un rôle supplémentaire émerge pour ces kinases dans la régulation de l'invasion tumorale et du processus métastatique.

L'ensemble des données concernant les différentes protéines de signalisation impliquées dans la signalisation intracellulaire du FGF et que nous venons de décrire dans ce paragraphe est rassemblé dans la figure 11. Il apparaît donc que les signaux de transduction induits par les FGFs sont multiples, complexes et différents selon le type cellulaire étudié. On remarquera que peu d'études portent sur les cellules épithéliales et en particulier, au début de cette thèse très peu de

données étaient disponibles sur la signalisation du FGF-2 dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Nous avons donc entrepris d'étudier les effets intracellulaires du signal mitogène du FGF-2 dans une lignée, les cellules hormono-dépendantes MCF-7, étant donné l'implication de ce facteur de croissance dans la cancérogenèse mammaire et son intérêt potentiel dans le traitement de cette pathologie. Dans ce but, nous avons développé l'analyse protéomique dont les principales caractéristiques et les champs d'applications majeurs sont décrits dans le chapitre 3.

CHAPITRE 2

IMPLICATION DES FGFS ET DE LEURS RECEPTEURS DANS LE CANCER DU SEIN

Dans ce chapitre, nous allons aborder rapidement la structure de la glande mammaire ainsi que la régulation de sa croissance par différents facteurs, notamment les hormones et les facteurs de croissance puis nous développerons le rôle des FGFs et de leurs récepteurs dans le sein normal et cancéreux.

I/ GENERALITES

I.1/ Structure et développement de la glande mammaire

D'un point de vue structural, la glande mammaire est constituée de lobes et de canaux galactophoriques entourés de tissu conjonctif dense dans lequel cheminent des vaisseaux sanguins. Les acini sont groupés de façon très dense autour d'un canal alvéolaire. Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent pour former un canal lobulaire. Cette petite structure forme un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour donner un canal galactophore de premier ordre, et l'ensemble des lobules qu'il draine forme un lobe glandulaire. Dans le sein, il y a 15 à 20 lobes qui sont séparés par du tissu conjonctif dense, et donc 15 à 20 canaux galactophores, chacun d'entre eux s'ouvrant à l'extérieur au niveau du mamelon.

Un canal, quelque soit son niveau dans l'arbre galactophorique, est tapissé d'une couche interne de cellules épithéliales doublée d'une couche perpendiculaire discontinue de cellules myoépithéliales, les deux couches cellulaires reposant sur une membrane basale. Autour de cette structure, on trouve un manchon fibroblastique, le tout étant entouré de tissu conjonctif. De manière plus précise, le sein est formé de quatre types cellulaires distincts. Les cellules épithéliales, de forme cylindrique, forment les alvéoles et les canaux; elles synthétisent et sécrètent le lait. Ces cellules sont ceinturées par les cellules myoépithéliales, de forme allongée, et qui ont pour fonction

de faire évacuer le lait en se contractant. Dans le mésenchyme ou stroma, les adipocytes produisent des acides gras polyinsaturés et leurs dérivés, les prostaglandines, qui contribuent à la prolifération et à l'organisation des cellules épithéliales, augmentent la vascularisation de la glande mammaire et favorisent la ramification des canaux mammaires. A proximité des cellules épithéliales, se trouvent également les fibroblastes, qui jouent un rôle important dans la formation et la différenciation de l'épithélium mammaire. En effet, ils synthétisent et sécrètent l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) qui stimule la prolifération des cellules épithéliales, et le collagène I qui participe à la formation de la matrice extracellulaire. Celle-ci exerce des rôles multiples dans l'intégrité de la glande mammaire, et sa dégradation est fortement régulée sous l'action concertée de protéases et d'anti-protéases. Son action sur les cellules épithéliales est essentielle. Notamment, elle permet à ces cellules de s'organiser en alvéoles, les sensibilise aux hormones lactogènes et inhibe leur croissance.

Le développement de la glande mammaire se fait en plusieurs étapes. Au cours de la vie foetale, les structures de base sont mises en place, à savoir le parenchyme composé de cellules épithéliales et myoépithéliales et le mésenchyme constitué de fibroblastes et d'adipocytes. A la puberté, des modifications morphologiques ont lieu, dues à l'augmentation des adipocytes et au développement des canaux mammaires sous l'effet d'interactions épithélio-mésenchymateuses. Mais c'est au cours de la gestation puis de la lactation que la glande mammaire achève son développement grâce aux signaux hormonaux qui induisent la prolifération des cellules souches, induisant l'extension des canaux galactophoriques et la différenciation des acini. Enfin, à chaque fin de cycle menstruel et à la ménopause, la glande mammaire subit une involution caractérisée notamment par une atrophie des structures épithéliales.

I.2/ Le cancer du sein

La majorité des cancers du sein résulte d'une prolifération maligne de l'épithélium mammaire des canaux (carcinomes canalaire) ou des lobules (carcinomes lobulaires). Si les cellules épithéliales n'ont pas encore franchi la membrane basale, on parle de carcinome *in situ*, par opposition au carcinome infiltrant. Dans les tumeurs mammaires, et en particulier lors des

métastases, l'équilibre est souvent rompu entre les protéases et les anti-protéases. Les cellules épithéliales ayant acquis la possibilité anormale de dégrader la matrice extracellulaire se multiplient à un rythme élevé et peuvent s'échapper de leur organe d'origine pour former des métastases.

De nombreux facteurs pronostiques ont été étudiés et contribuent à l'évaluation de l'agressivité et du potentiel métastatique de la tumeur mammaire. On distingue deux grandes catégories de facteurs pronostiques. Parmi les facteurs pronostiques cliniques et histologiques, on trouve l'âge et le statut ménopausal de la patiente, le diamètre de la tumeur, le type histologique et le grade histopronostique de la tumeur, et l'envahissement ganglionnaire axillaire (N-, N+). Les facteurs dits « biologiques » servent également au pronostic de la tumeur, le taux des récepteurs aux oestrogènes (RE) et à la progestérone (RPg) étant détecté en routine. Ce taux est effectivement essentiel car il permet de prédire la réponse à un traitement hormonal. On trouve aussi d'autres marqueurs tissulaires permettant une évaluation de l'activité proliférative tumorale (PCNA, Ki-67, thymidine kinase, la ploïdie), du développement précoce (IGFR, FGFR) ou tardif (EGFR, erb-B2), ou encore du potentiel invasif de la tumeur (protéases : cathepsine D, activateurs et inhibiteurs du plasminogène; métalloprotéases : stromélysine III; collagénases; pS2). La valeur indépendante de chacun des paramètres biologiques tissulaires n'est pas clairement démontrée et reste en cours d'évaluation tant technique que clinique. En pratique quotidienne, l'évaluation pronostique repose essentiellement sur le statut ganglionnaire (N), la taille tumorale (T), le grade histopronostique (GHP), l'âge et les récepteurs hormonaux (RE, RPg). Vue l'importance des facteurs pronostiques pour la caractérisation de la tumeur mammaire et son traitement, la recherche de nouveaux facteurs est un point crucial dans le combat contre le cancer et l'appréciation de leur réelle valeur prédictive est essentielle.

I.3/ Rôle des facteurs de croissance dans la prolifération des cellules épithéliales mammaires.

La croissance de la glande mammaire est sous le contrôle d'hormones et de facteurs de croissance qui agissent de manière autocrine et paracrine sur leurs cellules cibles, participant ainsi à l'homéostasie tissulaire du sein. Le sein étant un organe hormono-dépendant, les hormones stéroïdiennes et peptidiques (oestrogènes, progestérone, prolactine,...) qui stimulent la

prolifération ont un rôle essentiel dans la régulation de ce processus en influençant l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance et en modulant le nombre de leurs récepteurs cellulaires. Le développement d'un cancer du sein induit et requière un ensemble complexe de signaux de prolifération entre les cellules tumorales et le tissu normal environnant. Les facteurs de croissance sécrétés par les cellules normales ou tumorales et qui agissent par voie autocrine ou paracrine sont eux aussi essentiels pour la croissance des cellules malignes mais aussi pour la néovascularisation tumorale indispensable à la prolifération et favorisant la dissémination métastatique. De nombreux oncogènes ont été décrits comme étant amplifiés dans les tumeurs mammaires. Les protéines codées appartiennent notamment à la famille des facteurs de croissance (*c-sis*/PDGF-B, *hst*/FGF-4, *int2*/FGF3) et de leurs récepteurs (*erb-b1*/EGFR), ou interviennent dans la signalisation de ces facteurs de croissance (*src*, *ras*, *myc*), soulignant l'importance de ces derniers dans le développement et la progression tumorale mammaire. Parmi les facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la glande mammaire et que nous allons décrire brièvement, on distingue ceux qui régulent positivement la croissance des cellules épithéliales (revues dans Lippman et al, 1988; Dickson et al, 1992) de ceux qui ont un effet inhibiteur sur la prolifération (revue dans Le Bourhis et al, 2000).

I.3.1/ Facteurs inhibiteurs de la prolifération cellulaire

Les Transforming Growth Factor β (TGF β 1, β 2 et β 3) sont des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Les lignées cellulaires MCF-7, T47D et MDA-MB-231 sécrètent le TGF β , et dans les cellules hormono-sensibles, cette sécrétion est inhibée par les oestrogènes et activée par les anti-oestrogènes. Cependant, la plupart des lignées cellulaires dérivées de tumeurs mammaires humaines invasives sont plus ou moins sensibles, voire même résistantes à l'effet inhibiteur du TGF β alors que celui-ci est capable de stimuler la croissance des fibroblastes (Knabbe et al, 1987, Arteaga et al, 1988, Zugmaler et al, 1989). De plus, le TGF β semble contrôler la communication paracrine entre cellules tumorales et fibroblastes en stimulant la synthèse de protéases par les fibroblastes (collagénases, uPA, stromélysine) facilitant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire (Chua et al, 1985; Basset et al, 1990; Wolf et al, 1993).

Les IGFs (Insulin-like Growth factor) sont des mitogènes potentiels pour les cellules cancéreuses du sein, et dont la disponibilité est régulée par les IGFBPs (Insulin-like Growth factor Binding Protein) dont on compte au moins sept membres. *In vitro*, toutes les cellules cancéreuses mammaires sécrètent des IGFBPs, et dans les tumeurs sont exprimées préférentiellement les IGFBP-1 et -7 (Figueroa et Yee, 1992; Burger et al, 1998). La fonction de ces protéines dans la régulation de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires est encore mal comprise, mais elles semblent pouvoir agir d'une manière dépendante et indépendante des IGFs (revue dans Le Bourhis et al, 2000).

Le MDGI (Mammary Derived Growth Factor Inhibitor) est fortement exprimé lors de la lactation dans les cellules épithéliales dans lesquelles il serait impliqué dans le processus de différenciation. *In vitro*, il inhibe la croissance des cellules épithéliales humaines normales et cancéreuses (MaTu, T47-D) (Lehmann et al, 1989).

Il existe d'autres molécules, non apparentées aux facteurs de croissance, responsables de l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales telles que les mammostatines qui ne sont sécrétées que par les cellules épithéliales normales et qui agissent spécifiquement sur les cellules cancéreuses du sein; le TNF α (Tumor Necrosis Factor) qui est cytotoxique pour les cellules épithéliales malignes alors qu'il affecte peu la viabilité des cellules normales; ou certaines interleukines comme les IL-1, 4, 6, 8 qui sont produites par les cellules normales et cancéreuses, et dont l'IL-6, par exemple, inhibe seulement la croissance des lignées cellulaires de cancer du sein hormono-dépendantes (revue dans Le Bourhis et al, 2000).

I.3.2/ Les oestrogènes

Avant de citer les facteurs de croissance qui régulent positivement la prolifération des cellules mammaires, nous évoquerons les oestrogènes qui jouent un rôle essentiel dans la croissance de la glande mammaire normale et des cellules tumorales. En effet, les oestrogènes sont impliqués dans la stimulation de la croissance mammaire à la puberté et pendant la grossesse en stimulant la croissance des canaux et en augmentant les récepteurs à la progestérone, ce dernier point étant responsable de l'action synergique observée entre les oestrogènes et la progestérone sur

le développement lobulo-alvéolaire. Contrairement aux cellules épithéliales normales en primoculture qui pour la plupart ne sont pas stimulées par l'oestradiol alors qu'elles possèdent les récepteurs aux oestrogènes (RE), la croissance de plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein telles que les MCF-7 et les T47D qui expriment ces récepteurs, est augmentée en présence de cette hormone stéroïdienne. Les oestrogènes ont surtout une action indirecte sur la prolifération des cellules tumorales d'une part, en stimulant la synthèse et/ou l'activité de certains facteurs de croissance comme l'EGF, le TGF α , les IGF-I et -II, et de leurs récepteurs; d'autre part, en stimulant la synthèse de protéases (uPA, cathepsine D) qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire, vont contribuer à la multiplication des cellules épithéliales; et enfin, en stimulant l'activité des oncogènes c-myc et c-fos qui interviennent dans la prolifération cellulaire (revues dans Dickson et al, 1990; Woodward et al, 1998).

1.3.3/ Facteurs activateurs de la prolifération cellulaire

Les IGFs (Insulin-like Growth factor) (IGF-I et IGF-II) sont de puissants mitogènes pour les lignées cellulaires tumorales mammaires hormono-sensibles ou non qui expriment leur récepteur tyrosine kinase (Osborne et al, 1989; Peyrat et al, 1990). L'IGF-I sécrété par les fibroblastes du stroma agit de manière paracrine sur les cellules épithéliales et sa présence dans le plasma augmente chez les patientes atteintes d'une tumeur mammaire primaire par rapport aux sujets sains (Peyrat et al, 1993). L'IGF-II peut être sécrété par les lignées cellulaires cancéreuses hormono-dépendantes T47D et MCF-7 sous l'influence des oestrogènes (Yee et al, 1989).

Le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) est synthétisé par les plaquettes, mais aussi par les fibroblastes. Il présente deux sous-unités protéiques, la sous-unité A et la sous-unité B, et il agit sous forme d'homodimères (AA, BB) et d'hétérodimères (AB). Les cellules tumorales humaines T47D expriment les récepteurs du PDGF (α et β) et sont stimulées par le PDGF-AA et le PDGF-AB. Contrairement, aux cellules mammaires normales qui sécrètent préférentiellement le PDGF-AA, les cellules tumorales sécrètent surtout le PDGF-BB (Bronzert et al, 1987).

L'EGF (Epidermal Growth Factor) régule le développement de la glande mammaire de souris *in vivo* et *in vitro* (Vonderhaar, 1987; Coleman et Daniel, 1990) et stimule la prolifération

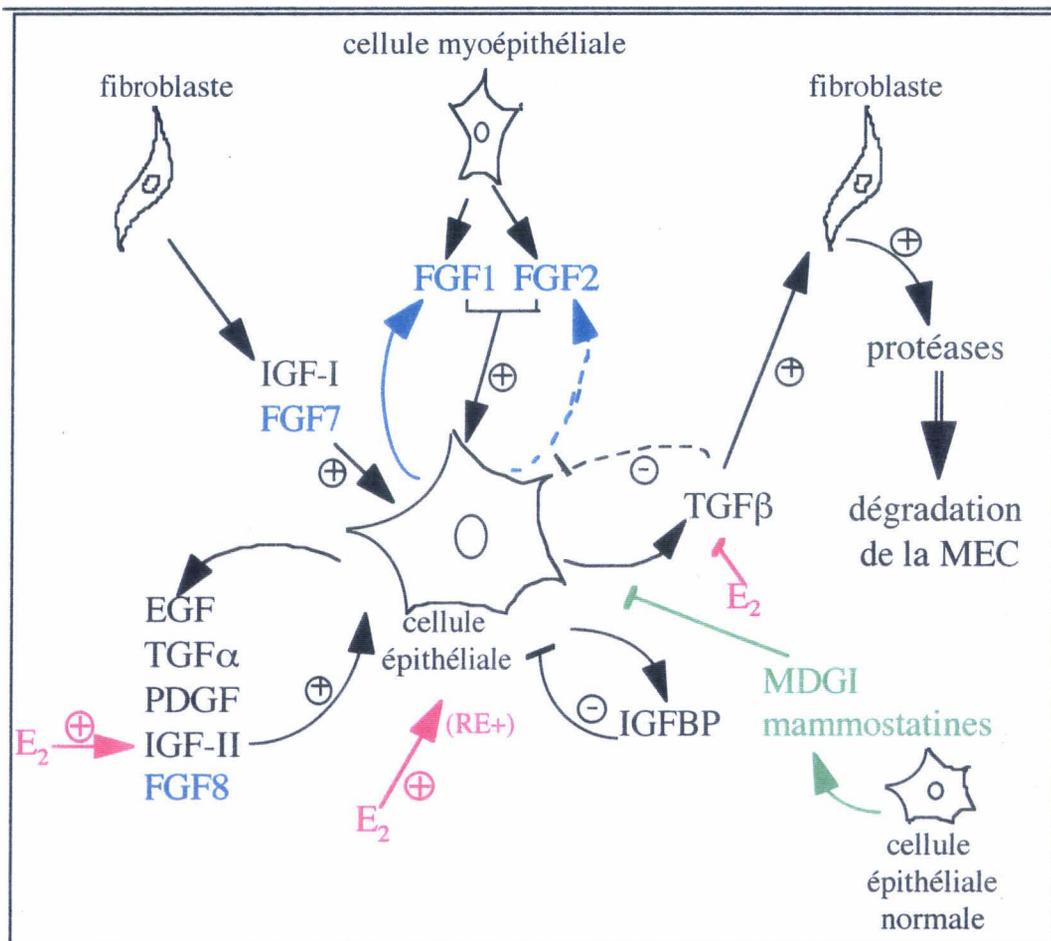


Figure 13 : Régulation de la croissance des cellules épithéliales mammaires cancéreuses.

E2, oestrogènes; +, activation de la prolifération (flèche normale); -, inhibition de la prolifération (flèche avec l'extrémité barrée). Les flèches en pointillés représentent l'action des facteurs de croissance dans certains cas.

des cellules épithéliales mammaires tumorales *in vitro*. Le TGF α (Transforming Growth Factor) appartient à la même famille que l'EGF et il est sécrété par les lignées de cellules de cancer du sein, agissant de manière autocrine sur les cellules productrices, ou de manière paracrine sur les cellules voisines. L'EGF et le TGF α agissent par l'intermédiaire du récepteur tyrosine kinase de l'EGF, l'EGFR, dont l'expression est détectée ou élevée dans 20 à 40% des tumeurs mammaires. De plus, ERBB2, un récepteur homologue de EGFR, est fréquemment amplifié dans le cancer du sein et constitue un des facteurs pronostiques particulièrement étudié dans cette pathologie (Seshadri et al, 1993; Révillion et al, 1998).

Le NGF (Nerve Growth Factor) a été récemment découvert dans notre laboratoire comme un facteur de croissance intervenant dans la glande mammaire. Alors que les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses expriment le récepteur à activité tyrosine kinase du NGF, TrkA, et son récepteur p75, le NGF stimule la prolifération des lignées cellulaires hormono-dépendantes (MCF-7, T47D) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231), mais pas des cellules épithéliales mammaires normales (Descamps et al, 1998). L'étude de l'expression des ARNm des récepteurs du NGF dans des biopsies de cancer du sein a mis en évidence une association entre l'expression importante de TrkA et la survie prolongée des patientes (Descamps et al, résultats soumis à publication).

La figure 13 résume les actions positives ou négatives, paracrines et autocrines, des diverses molécules que nous venons de voir sur la croissance des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Sur cette figure sont représentés également les membres de la famille des FGFS dont nous allons décrire les implications dans le sein normal et cancéreux dans le paragraphe qui suit. Ce schéma récapitulatif montre que les cellules cancéreuses sont soumises à de nombreux stimulus activateurs ou inhibiteurs de leur croissance, et qu'un dérèglement de cette balance en faveur des facteurs stimulateurs peut faciliter leur prolifération anarchique et le développement tumoral.

II/ LES FGFs ET LEURS RECEPTEURS DANS LE SEIN

En plus des différents facteurs de croissance que nous venons de citer, de nombreux travaux ont décrit l'expression des FGFs et de leurs récepteurs dans les tissus mammaires normaux et cancéreux, soulignant ainsi l'importance des FGFs dans la régulation de la croissance des cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses. Dans cette partie, nous allons détailler la présence des FGFs et de ses récepteurs dans la glande mammaire, dans les biopsies tumorales, ainsi que dans les lignées cellulaires couramment utilisées pour les études *in vitro* de l'action du FGF sur les cellules mammaires.

II.1/ Les FGFs

II.1.1/ Le FGF-2 dans la glande mammaire normale

La présence du FGF-2 et de ses ARNm a été détectée par northern-blot ou par immunohistochimie dans la glande mammaire normale de différents mammifères tels que l'homme et le rat. Leur localisation se situe dans les cellules myoépithéliales mais aucun marquage n'a été observé dans les cellules épithéliales (Barraclough et al, 1990; Gomm et al, 1991; Ke et al, 1993). La localisation du FGF-2 dans les cellules myoépithéliales mammaires est essentiellement intracellulaire, mais il est également détecté au niveau de la membrane cellulaire et de la matrice extracellulaire en contact avec ces cellules (Gomm et al, 1991). Cependant, dans une étude ultérieure, Gomm *et al.* (1997) ont confirmé la présence des transcrits du FGF-2 uniquement dans les cellules myoépithéliales mais ont détecté la protéine FGF-2 aussi bien dans ces dernières que dans les cellules épithéliales, les deux types cellulaires étant issus de réductions mammoplastiques. Il semble donc que le FGF-2 détecté dans les cellules épithéliales provienne des cellules myoépithéliales voisines. Par ailleurs, seule la croissance des cellules épithéliales humaines est stimulée par le FGF-2 (Li and Shipley, 1991; Gomm et al, 1997). En revanche chez le rat, les cellules myoépithéliales qui possèdent les récepteurs du FGF de haute et de basse affinité, prolifèrent en réponse au FGF-2 alors que les cellules épithéliales dans lesquelles les deux types de sites de fixation n'ont pas été détectés, ne répondent pas au FGF-2 (Fernig et al, 1990). Ainsi, dans la glande mammaire normale humaine, les cellules myoépithéliales expriment et sécrètent le

FGF-2 qui est alors stocké dans les membranes basales et qui peut agir de manière paracrine sur la survie et la croissance des cellules épithéliales adjacentes.

II.1.2/ Le FGF-2 dans les tumeurs mammaires

De nombreux travaux réalisés à partir de tissus mammaires bénins ou tumoraux ont tenté d'élucider le rôle du FGF-2 dans le développement et la progression tumorale des cellules du sein. C'est en 1986 que le FGF-2 est identifié pour la première fois dans une tumeur mammaire (Rowe et al, 1986). Comme dans le cas du sein normal, Gomm et col (1991) ont observé par immunohistochimie le FGF-2 uniquement dans les cellules myoépithéliales. Par la suite, plusieurs études ont confirmé l'expression du FGF-2 dans la plupart des cancers du sein, les niveaux d'expression des ARNm et de la protéine étant beaucoup plus faibles dans les tumeurs malignes que dans les lésions bénignes et le sein normal (Luqmani et al, 1992; Anandappa et al, 1994; Smith et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995; Yiangou et al, 1997; Heffelfinger et al, 1999). Cette diminution globale de l'expression du FGF-2 dans les tumeurs malignes peut s'expliquer par le fait que le nombre des cellules myoépithéliales, qui produisent le FGF-2, diminue lorsque la malignité de la tumeur augmente. Cependant, il faut souligner que dans l'étude réalisée par Anandappa *et al.* (1994), près d'un quart des biopsies cancéreuses exprime autant, voire plus de FGF-2 que les lésions bénignes. Ce résultat souligne l'hétérogénéité des cellules tumorales et suggère que certaines populations de cellules épithéliales tumorales peuvent acquérir la capacité d'exprimer le FGF-2 à un haut niveau. Par ailleurs, bien que la concentration sérique du FGF-2 augmente chez la plupart des patientes dès les premiers stades de la maladie (Kurobe et al, 1993; Takei et al, 1994; Sliutz et al, 1995), la présence du FGF-2 dans le sérum ne présente pas de corrélation avec la survie sans rechute des patientes (Colomer et al, 1997).

Plusieurs équipes ont étudié la valeur pronostique éventuelle de l'expression du FGF-2 dans les cancers du sein. Deux études réalisées en 1997 sur le taux d'ARNm du FGF-2 dans une série de 51 biopsies mammaires tumorales (Yiangou et al, 1997a) et sur le niveau protéique de FGF-2 sur 140 cytosols de tumeurs primaires (Colomer et al, 1997) ont établi une corrélation positive entre un haut niveau de FGF-2 et la survie globale et/ou sans rechute des patientes. Mais

	CEMN	MCF-7	T47D	MDA-MB-231	HBL-100
FGF-1	+	+	+	+	+
FGF-2	+	-	-	+	+
FGF-3	ND	-	-	-	-
FGF-4	ND	-	-	-	-
FGF-5	ND	-	-	+	ND
FGF-6	ND	-	-	-	-
FGF-7	-	-	-	-	-
FGF-8	+/-	+	+	+++	+++
FGF-9	ND	-	-	-	-

Tableau 4 : Expression des FGF-1 à FGF-9 dans les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN), cancéreuses (MCF-7, T47D, et MDA-MB-231) ou immortalisées (HBL-100). ND, non déterminé.

dans les deux cas, aucune association n'a pu être établie entre le taux de FGF-2 et d'autres facteurs pronostiques, tels que le grade histopronostique, le statut ménopausal, la présence de ganglions lymphatiques (N) ou des récepteurs aux hormones (RE, RPg). De plus, Colomer *et al.* (1997) et Smith et col (1999) ont observé que plus le niveau de FGF-2 est élevé, plus la tumeur est petite et à un stade peu avancé de la maladie. Par contre, l'étude de l'impact pronostique du FGF-2 réalisée par Eppenberger et col (1999) sur une série de 305 carcinomes primaires et 190 tumeurs N n'a pas permis de conclure à une association significative du FGF-2 avec la survie globale et la survie sans rechute, ni avec d'autres facteurs pronostiques (âge, taille, RE+, N). Ainsi, même si la valeur pronostique du FGF-2 dans le cancer du sein est discutée, il semble que sa présence dans les tumeurs mammaires soit associée plutôt à un bon pronostic et à une augmentation de la survie des patientes.

II.1.3/ Le FGF-2 dans les lignées de cellules mammaires

En plus de l'étude de l'expression et de la localisation du FGF-2 dans la glande mammaire normale et cancéreuse, l'utilisation de cellules mammaires cultivées *in vitro* facilite l'étude du rôle du FGF-2 dans le cancer du sein. Alors que les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) en primoculture expriment les transcrits du FGF-2 mais sont insensibles à l'activité mitogène de celui-ci (Li and Shipley, 1991), la prolifération des cellules épithéliales issues de biopsies tumorales et placées en culture primaire est stimulée par le FGF-2 (Takahashi et al, 1989). Comme le tableau 4 le résume, quelque soit la technique utilisée (Northern-Blot, PCR ou dosage de protection à la RNase), aucun transcrite du FGF-2 n'a pu être détecté dans les cellules de cancer du sein hormono-dépendantes MCF-7 et T47D (Luqmani et al, 1992; Anandappa et al, 1994; Chandler et al, 1999), contrairement à la lignée immortalisée de cellules épithéliales mammaires non tumorales HBL-100 et aux lignées cellulaires hormono-indépendantes MDA-MB-231 et BT20 qui elles, expriment le FGF-2 (Souttou et al, 1994; Anandappa et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995). La non-détection de ces ARNm dans la lignée MDA-MB-231 par Luqmani et col (1995) et Chandler et col (1999) est certainement due à un problème de sensibilité. En effet, El-Yazidi et Boilly-Marer (1995) n'ont détecté les transcrits du FGF-2 dans ces deux types cellulaires qu'après 40 cycles d'amplification PCR, alors qu'ils sont détectés bien avant dans les cellules HBL-100 et

les CEMN. En ce qui concerne la sensibilité de ces lignées cellulaires au FGF-2, la prolifération des cellules MCF-7 et T47D est stimulée par le FGF-2 (Karey et Sirbaska, 1988; Briozzo et al, 1991; Peyrat et al, 1991, 1992; Musgrove et Sutherland, 1993) alors que les cellules MDA-MB-231 et BT20 sont insensibles à celui-ci (Peyrat et al, 1991; Delehedde et al, 1995). Quant aux cellules HBL-100, elles produisent et sécrètent le FGF-2 qui stimule leur croissance de manière autocrine (Souttou et al, 1994).

II.1.4/ Les autres membres de la famille des FGFs

II.1.4.1/ Dans le sein normal et cancéreux

Avec le FGF-2, le FGF-1 est un des membres de la famille des FGFs le plus étudié. Dans le sein normal, les transcrits de FGF-1 mis en évidence par PCR sont exprimés dans les cellules myoépithéliales et épithéliales (Coope et al, 1997). Dans le cancer du sein, l'étude des transcrits du FGF-1 (RT-PCR et/ou northern-blot) et de la protéine (immunohistochimie, immunoblot) a montré que le FGF-1 est présent dans une très grande majorité des tumeurs primaires examinées. De plus, contrairement au FGF-2, il est beaucoup plus exprimé dans les tissus cancéreux que dans les tissus normaux ou bénins où il n'est pas ou très peu détecté (Smith et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995; Yoshimura et al, 1998). Il a également été mis en évidence dans des tissus normaux adjacents aux tumeurs (Smith et al, 1994). Cependant, d'autres travaux ont observé les résultats inverses. En effet, une expression plus importante du FGF-1 a été observée dans les lésions bénignes par rapport aux tumeurs primaires (Annandappa et al, 1994), et dans les tissus normaux par rapport aux tissus cancéreux (Bansal et al, 1995). La divergence de ces résultats met en évidence les différences de sensibilité des méthodes et/ou l'importance de l'intégrité des échantillons étudiés.

L'amplification des gènes *int2* (FGF-3) et *hst1* (FGF-4) a été reportée dans un nombre significatif de tumeurs mammaires humaines (Lidereau et al, 1988; Theillet et al, 1989; Champème et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995; Fioravanti et al 1997). Ces deux gènes localisés sur la bande q13 du chromosome 11 ont été trouvés co-amplifiés dans 17% des cancers du sein (Theillet et al, 1989). De plus, de manière très claire et unanime, l'amplification du gène *int2*, qui code pour

une protéine non-altérée dans les cancers du sein (Meyers et Dudley, 1992), est associée à un mauvais pronostic. Elle est en effet corrélée à un risque de rechute plus élevé, à une survie sans rechute plus courte, et à un haut risque de récurrence loco-régionale dans les tumeurs bien différenciées (RE+) (Lidereau et al, 1988; Borg et al, 1991; Champème et al, 1994; Fioravanti et al 1997).

Le FGF-7 qui est produit uniquement par les cellules stromales est mitogène pour les cellules épithéliales (Imagawa et al, 1994). Son transcrite a été détecté dans 30% des tumeurs (Penault-Llorca et al, 1995) et il est exprimé au même niveau dans les tissus mammaires normaux et cancéreux, essentiellement par les fibroblastes, puisque les cellules épithéliales contiennent un très faible niveau d'ARNm (Bansal et al, 1997). Une étude immunohistochimique a détecté le FGF-7 dans 2/3 des 80 carcinomes examinés et son expression tend à être associée avec le caractère bien différencié et peu agressif des tumeurs mammaires (Jacquemier et al, 1998).

Le FGF-8 est un facteur de croissance régulé par les androgènes (Tanaka et al, 1992). Dans le sein normal, une très faible expression des ARNm a été observée dans les cellules myoépithéliales et épithéliales issues de réduction mammoplastique (Marsh et al, 1999). La protéine correspondante a été détectée dans les cellules épithéliales ductales et lobulaires (Tanaka et al, 1998). Dans le cancer du sein, l'expression du FGF-8 est considérablement augmentée, tant au niveau transcriptionnel (détecté par RT-PCR ou hybridation *in situ*) que protéique (détection immunohistochimique) (Tanaka et al, 1998; Marsh et al, 1999).

Les autres membres de la famille des FGFs ont été très peu, voire pas du tout décrits dans les cellules mammaires normales ou cancéreuses, probablement à cause de leur découverte et de leur caractérisation relativement récentes. Les FGF-5, FGF-6 et FGF-9 sont exprimés respectivement dans 60%, 15%, et 37% des 103 tumeurs mammaires étudiées (Penault-Llorca et al, 1995). Une étude très récente rapporte l'expression stromale du FGF-10 au cours du développement post-natal de la glande mammaire de souris et sa diminution pendant les périodes de grossesse et de lactation, parallèlement à l'augmentation du ratio des cellules épithéliales par

rapport aux cellules stromales (Pedchenko et Imagawa, 2000). A ce jour, aucune étude ne relate l'expression des FGF-11 à FGF-20 dans le sein.

II.1.4.2/ Dans les lignées cellulaires

Le FGF-1 est exprimé dans les cellules épithéliales mammaires normales en primoculture, dans les lignées cellulaires cancéreuses MCF-7, T47D et MDA-MB-231 et dans la lignée immortalisée HBL-100 (Bansal et al, 1995; Renaud et al, 1996). Par contre, aucun d'ARNm de FGF-3 et FGF-4 n'a pu être détecté par PCR dans ces lignées cellulaires cancéreuses et seules les cellules MDA-MB-231 expriment le FGF-5. Quant aux FGF-6, FGF-7 et FGF-9, ils ne sont exprimés dans aucunes de ces lignées de cellules épithéliales cancéreuses précédemment décrites, soulignant et confirmant dans le cas du FGF-7, une expression restreinte aux cellules stromales (Penault-Llorca et al, 1995). Enfin, un niveau très faible des ARNm du FGF-8 a été décrit dans les cellules épithéliales normales et cancéreuses MCF-7 et T47D, contrairement aux cellules HBL-100 et MDA-MB-231 qui en expriment beaucoup plus (Marsh et al, 1999). Dans le tableau 4 est reportée l'expression des FGF-1 à FGF-9 dans les principales lignées cellulaires mammaires cancéreuses ou immortalisée (MCF-7, T47D, MDA-MB-231, HBL-100) et dans les CEMN en primoculture.

II.2/ Les récepteurs des FGFs

II.2.1/ Les récepteurs de basse affinité

Peu de données sont disponibles sur les sites de fixation de basse affinité des FGFs, les HSPG dans le sein. Chez l'homme comme chez le rat, il a été montré par des mesures de fixation du ¹²⁵I-FGF-2 à la surface cellulaire, que la présence des récepteurs de basse affinité est restreinte aux cellules myoépithéliales (Fernig et al, 1990; Ke et al, 1993). De plus, chez le rat, leur présence n'est pas corrélée à un phénotype malin des cellules mammaires épithéliales, contrairement à celle des FGFRs (Fernig et al, 1993). Peu de travaux ont examiné l'expression individuelle dans le cancer du sein de chacun de trois types d'HSPG reconnus pour fixer le FGF-2 (les syndecans,

glypicans et perlecan). Stanley *et al.* (1999) ont noté une accumulation de syndecan-1 dans le stroma tumoral pouvant expliquer une angiogenèse accrue notamment en facilitant l'action du FGF-2, et une prolifération des cellules du stroma caractéristique des carcinomes mammaires infiltrants. Mais dans les cellules épithéliales de tumeurs mammaires, la diminution d'expression du syndecan-1 observée peut être corrélée à l'augmentation de la malignité et au caractère transformant des cellules, en accord avec la participation du syndecan-1 dans la maintenance de la morphologie épithéliale des cellules (Stanley et al, 1999). Cette perte d'expression semble participer à la réduction de l'adhésion cellulaire et par conséquent, à l'augmentation du potentiel invasif des cellules (revue dans Inki et Jalkanen, 1996). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des tumeurs d'origines différentes comme le colon (Jayson et al, 1999) et les mésothéliomes (Kumar-Singh et al, 1998) et avec une étude *in vitro* montrant que la transformation de cellules épithéliales mammaires de souris par l'oncogène *Ha-ras* est associée également à une forte réduction de l'expression du syndecan-1 (Kirjavainen et al, 1993).

II.2.2/ Les récepteurs de haute affinité

II.2.2.1/ Dans la glande mammaire normale

Dans le sein normal humain, les FGFRs sont exprimés dans les cellules épithéliales et à un moindre niveau dans les cellules myoépithéliales (Coope et al, 1997; Blanckaert et al, 1998). Au contraire, chez le rat, les récepteurs sont plus nombreux dans les cellules fibroblastiques et myoépithéliales (Fernig et al, 1990). De plus, une augmentation des récepteurs de haute affinité a été observée au cours de l'évolution de cellules épithéliales de rat vers un phénotype malin (Fernig et al, 1993). Par ailleurs, l'utilisation d'un dominant kinasique négatif des FGFR1 ou R2 exprimés dans l'épithélium mammaire de souris transgéniques montre que la signalisation du FGF est requise pour le développement lobuloalvéolaire de la glande mammaire durant la grossesse (Jackson et al, 1997).

II.2.2.2/ Dans les tumeurs mammaires

Les gènes codant pour les FGFR1, R2 et R4 sont amplifiés dans environ 10% des cancers du sein (Adnane et al, 1991; Theillet et al, 1993; Jaakola et al, 1993; Jacquemier et al, 1994). Par ailleurs, une co-amplification des régions 8p12 portant le gène *flg*/FGFR1 et 11q13 portant les gènes *int2*/FGF-3 et *hst1*/FGF-4, a été trouvée dans plus de 30% des tumeurs (Adnane et al, 1991; Theillet et al, 1993). Globalement, il semble que les transcrits des FGFR1 et R4 prédominent et sont surexprimés dans environ 10% des cancers mammaires. Par contre, le FGFR2 est présent en faible quantité et le FGFR3 n'est pas détecté (Luqmani et al, 1992; Penault-Llorca et al, 1995). D'autres études relatent une expression des FGFR1, R2 et R4 comparable dans les tissus normaux et cancéreux (Theillet et al, 1993, Coope et al, 1997; Bansal et al, 1997; Marsh et al, 1999). En ce qui concerne le FGFR1, l'expression de l'isoforme β à deux boucles Ig est plus importante dans les biopsies tumorales que celle à trois boucles Ig (FGFR1 α) (Penault-Llorca et al, 1995). D'autres différences dans les isoformes du FGFR1 ont été détectées. En effet, Yiangou *et al.* (1997b) ont montré par western-blot l'existence de deux formes du FGFR1 : une forme complète de 115 kDa, et une forme de 106 kDa tronquée en C-terminal à laquelle il manque le site de tyrosine phosphorylation en position 766. Alors que les cellules épithéliales normales possèdent les 2 formes, seule la forme de 115 kDa est détectée dans les cellules épithéliales malignes, suggérant un lien entre la perte du FGFR1 de 106 kDa et la progression vers un phénotype malin. Ainsi, des altérations structurales et des variations dans l'épissage alternatif des exons semblent jouer un rôle important dans la tumorigenèse mammaire, même si leur rôle exact doit être encore défini.

Des études sur l'impact de la valeur pronostique du FGFR1 ont été réalisées. Elles ont montré que l'amplification et la surexpression des transcrits et de la protéine du FGFR1 sont corrélées positivement avec les niveaux de récepteurs hormonaux et à une tendance positive pour les tumeurs de petite taille et d'un grade peu avancé. De plus, une surexpression de la protéine est associée à une survie globale ou sans rechute plus longue (Luqmani et al, 1992; Theillet et al, 1993; Blanckaert et al, 1998). Au vu des résultats précédents, il peut paraître contradictoire que les tumeurs les moins agressives aient plus de récepteurs de haute affinité. On peut toutefois supposer que des cellules tumorales qui expriment suffisamment de FGFR sont encore capables de contrôler la croissance induite par un faible niveau de FGF-2. Ainsi, un haut niveau de FGFR1 et

	MCF-7	T47D	MDA-MB-231	HBL-100
FGFR1	+/-	++	+++	+++
FGFR2	++	++	+/-	-
FGFR3	+	+	+/-	-/+++*
FGFR4	+	++	++	+

* FGFR3 IIIb versus IIIc (Jonhson et al, 1998)

Tableau 5 : Expression des FGFR1, R2, R3 et R4 dans trois lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7, T47D, et MDA-MB-231) et une lignée de cellules mammaires immortalisées (HBL-100).

un faible niveau de FGF-2 dans les tumeurs mammaires humaines sont clairement associés à un meilleur pronostic, ce qui souligne un rôle précoce pour le FGF-2 et ses récepteurs dans la cancérisation des cellules épithéliales du sein.

II.2.2.3/ Dans les lignées cellulaires mammaires

Le tableau 5 résume l'expression des quatre FGFRs dans les principales lignées cellulaires mammaires utilisées. Il a été montré par RT-PCR ou par protection à la RNase que le FGFR1 est plus exprimé dans les cellules T47D, MDA-MB-231 et HBL-100 que dans les MCF-7. De plus, toutes ces lignées expriment davantage la forme β du FGFR1 que la forme α (Luqmani et al, 1992; McLeskey et al, 1994). Les cellules MCF-7 et T47D expriment fortement le FGFR2, alors qu'il n'est pas ou très peu détecté dans les MDA-MB-231 et HBL-100 (Luqmani et al, 1992; McLeskey et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995). Quant au FGFR3, il est exprimé à un haut niveau dans les HBL-100 et dans les T47D, mais sa présence dans les autres lignées cancéreuses est très faible, voire indétectable (McLeskey et al, 1994; Johnson et al, 1999; Chandler et al, 1999). Enfin, l'expression du FGFR4 est plus importante dans les lignées MDA-MB-231 et T47D que dans les MCF-7 et les HBL-100 (McLeskey et al, 1994; Penault-Llorca et al, 1995; Johnston et al, 1995). L'analyse de l'expression des récepteurs dans la lignée cancéreuse MDA-MB-134, qui possède les récepteurs aux oestrogènes, indique une amplification du gène FGFR1 et une surexpression de ce récepteur, alors que le FGFR4 est lui aussi très abondant mais sans amplification génique. Les mêmes auteurs ont montré une inhibition de la prolifération de ces cellules par le FGF-2 et ont suggéré que la surexpression du FGFR1 est responsable de cette inhibition (McLeskey et al, 1994).

En conclusion, aucune corrélation ne peut clairement être établie entre le niveau d'expression des récepteurs et la réponse au FGF-2, bien que les lignées cellulaires étudiées expriment les quatre FGFRs à des niveaux variables. Cependant, l'ensemble de ces résultats souligne un rôle potentiel important des récepteurs de haute affinité dans l'action paracrine et autocrine du FGF-2 et des autres membres de la famille des FGFs sur les cellules épithéliales de cancer du sein.

CHAPITRE 3

L'ANALYSE PROTEOMIQUE

I- POURQUOI L'ANALYSE PROTEOMIQUE ?

La génomique structurale qui consiste à séquencer systématiquement le génome d'un organisme donné a pris une importance capitale ces dernières années et engendre une somme croissante d'informations sur les séquences codantes, auxquelles s'ajoutent les données quantitatives portant sur l'expression des ARN messagers (ARNm) encore appelée transcriptomique. Le séquençage du génome humain est en passe de devenir complet d'ici 2003 et l'exploitation de cette mine d'or de connaissances, tant pour la compréhension de maladies que pour leur traitement, fait l'objet de nombreuses discussions à l'échelle mondiale, notamment sur la question de la brevetabilité du génome humain, c'est-à-dire de la vie humaine. Cependant, aussi puissantes soient les données issues de la recherche en génomique, *“la réalité cellulaire est plus élaborée que les rêves du noyau lui-même”* (Anderson et Anderson, 1998). En effet, l'étude du génome comporte des limites. Elle ne permet pas à elle seule de saisir toute la complexité du fonctionnement cellulaire car plusieurs informations fondamentales pour la compréhension des systèmes biologiques échappent totalement à son champ d'investigation. Nous avancerons trois points principaux :

- Un même génome peut conduire à l'expression de différents ensembles de protéines, en fonction des étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation, des réponses à des signaux biologiques ou physiques, ou encore, de l'état physiopathologique de la cellule. L'étude de l'ensemble des protéines permet de répercuter ces évènements cellulaires tant au niveau traductionnel que post-traductionnel.
- Le niveau d'expression des ARNm ne reflète pas forcément le niveau d'expression des protéines, c'est-à-dire des molécules fonctionnelles. Une protéine ne peut être synthétisée sans que son ARNm ne soit présent, mais on peut trouver une protéine dans une cellule alors que son ARNm

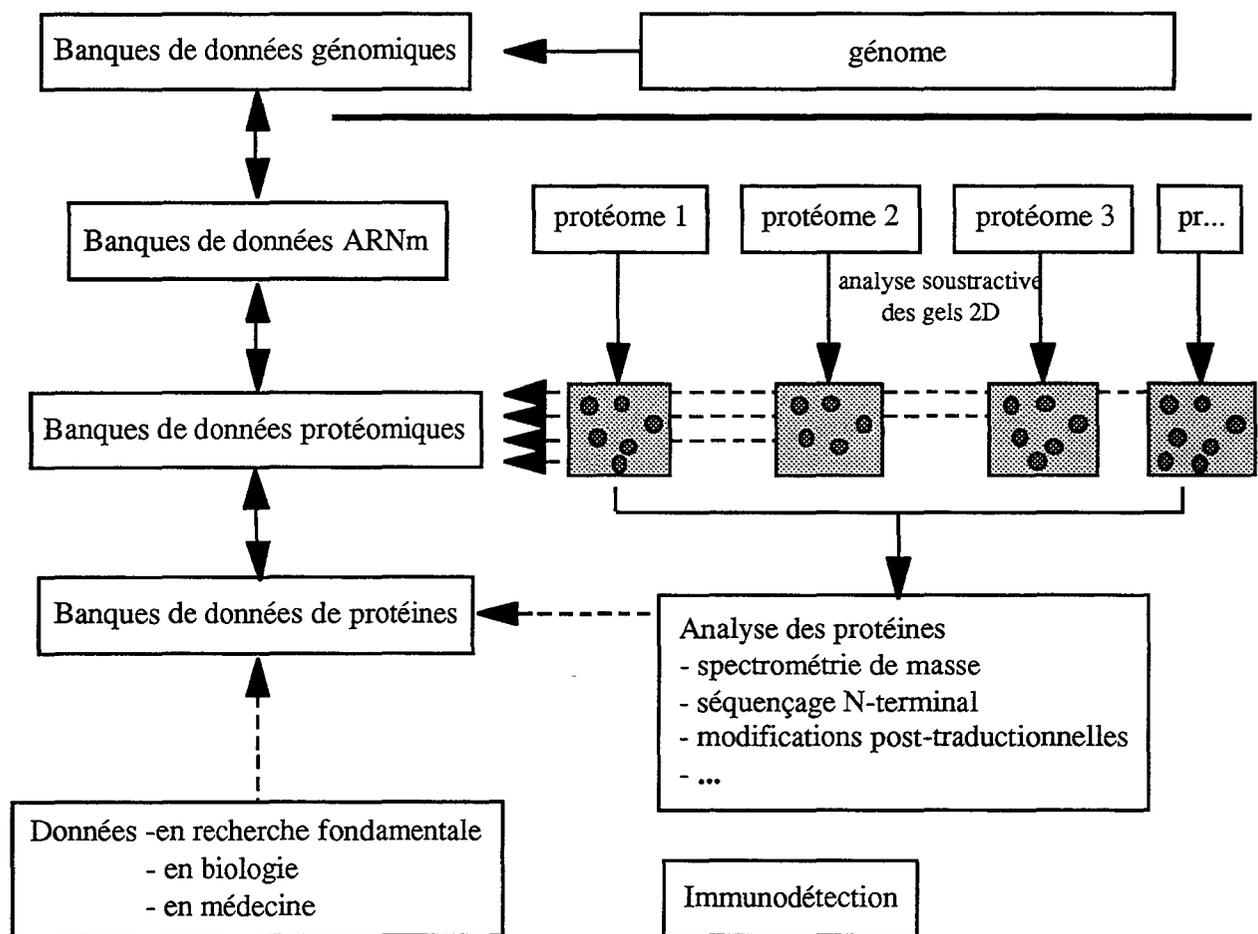


Figure 14 : Positionnement de l'analyse protéomique dans le contexte de la génomique et de la transcriptomique. (D'après Lottspeich, 1999)

n'est plus présent, et inversement, une grande quantité d'ARNm peut être transcrite sans que la protéine ne soit pour autant traduite. Il existe aussi des ARNm muets qui eux, ne sont pas traduits.

- Les protéines peuvent subir de nombreuses modifications qui ne sont pas nécessairement identifiables à partir de la seule séquence de leur gène. Beaucoup de ces molécules ne parviennent à leur forme biologiquement active qu'au terme de différentes étapes de maturation co- et post-traductionnelles, telles que la protéolyse, la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation, l'isoprénylation,... L'état de modifications de l'ensemble des protéines constitue en lui-même une source essentielle d'informations sur l'état d'un système biologique donné. En outre, seule l'étude directe des protéines permet d'étudier ces modifications, l'ajout ou l'élimination de groupements chimiques sur la chaîne polypeptidique constituant par exemple, un signal de localisation dans un compartiment cellulaire précis.

Il apparaît donc clairement que la compréhension globale de systèmes biologiques nécessite deux approches qui sont indispensables et complémentaires (Figure 14) : l'étude du génome et du protéome. Le terme "protéome", proposé en 1995, désigne l'ensemble des produits fonctionnels exprimés par le génome d'une cellule, d'un tissu, ou d'un organe donné, à un moment donné. Il a permis l'émergence d'un nouveau concept dynamique et ambitieux, l'analyse protéomique. Anderson et Anderson ont défini l'analyse protéomique comme "*l'utilisation de la quantification au niveau protéique comme mesure objective de l'expression génique caractérisant un processus biologique donné et comme moyen de décodage des mécanismes contrôlant cette expression*" (1998). Autrement dit, un organisme n'a qu'un génome, alors qu'il possède plusieurs protéomes. L'analyse protéomique constitue donc une description dynamique de la régulation des gènes, et trouve deux champs d'applications larges : d'une part, l'exploration et la cartographie de la machinerie cellulaire, c'est-à-dire l'inventaire des protéines, la détermination de leur localisation intracellulaire et des interactions protéine-protéine (Blackstock et Weir, 1999); et d'autre part, la connaissance des niveaux d'expression des protéines et de l'impact d'évènements perturbateurs tels que la maladie, un traitement médicamenteux ou l'environnement.

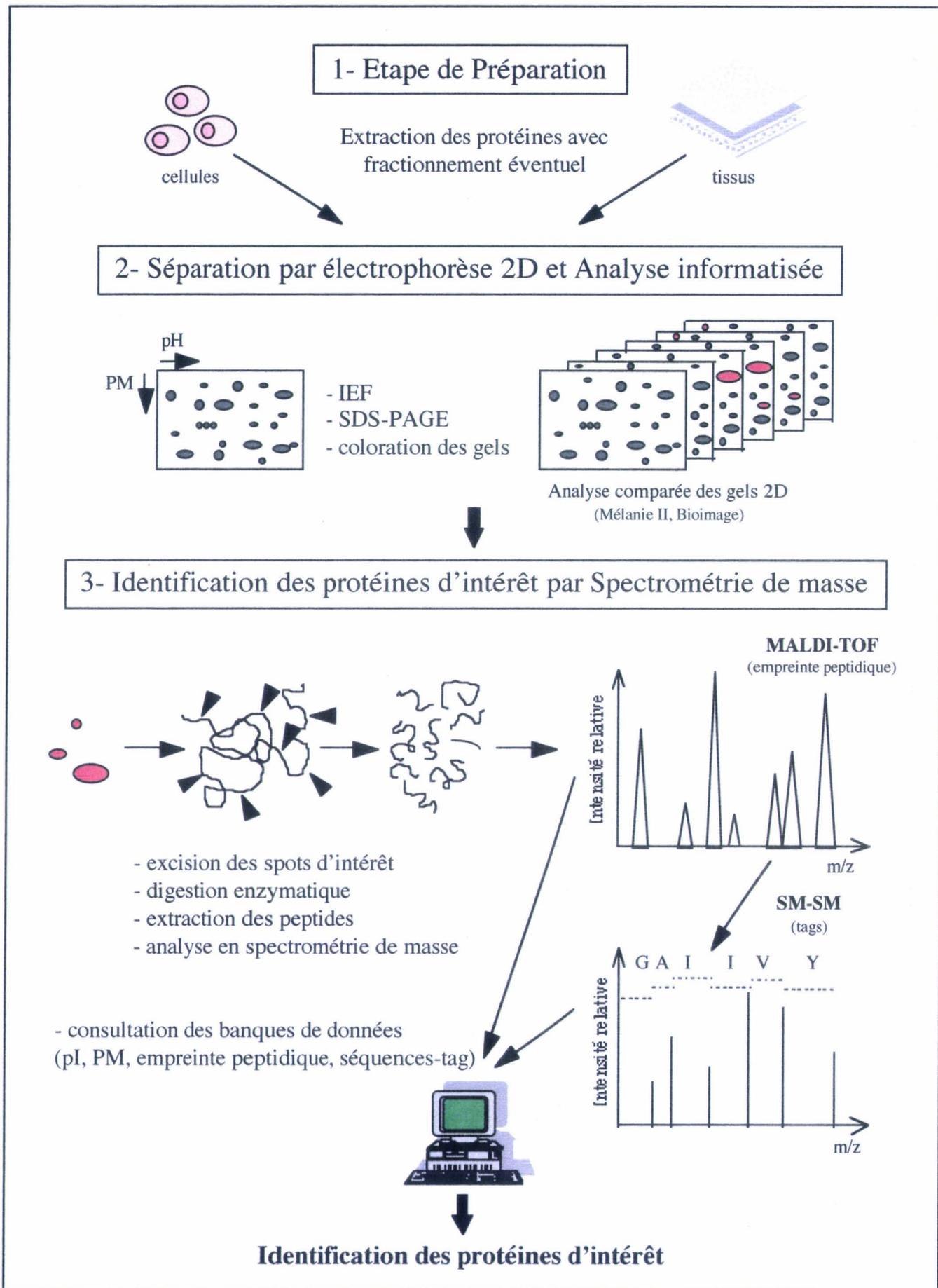


Figure 15 : Principe de l'analyse protéomique

II- PRINCIPE

Les applications de l'analyse protéomique reposent sur une méthodologie résumée dans la figure 15, couplant l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) hautement résolutive et l'analyse en spectrométrie de masse. Une première étape de séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D) associée à l'analyse informatisée des gels permet de visualiser et de quantifier des variations de l'expression de protéines entre différents échantillons. L'identification des protéines d'intérêt comprend l'analyse en spectrométrie de masse (MS) des peptides issus de la digestion enzymatique des protéines à identifier, suivie de la comparaison de l'ensemble des masses des peptides obtenues ("empreinte peptidique") sur le spectre de masse avec les informations contenues dans les banques de données protéiques ou génomiques.

Dans ce premier paragraphe, nous allons décrire les technologies utilisées lors de l'analyse protéomique : l'électrophorèse bidimensionnelle, l'analyse informatisée des gels et la spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight) et en tandem (MS-MS) en mode électrospray.

II.1/ Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

II.1.1/ Isoélectrofocalisation (IEF)

L'électrophorèse bidimensionnelle est réellement la méthode de choix pour séparer les protéines puisqu'elle est capable de séparer simultanément plusieurs milliers de polypeptides d'un mélange complexe en fonction de deux propriétés distinctes de ces molécules : leur charge et leur masse moléculaire (revue dans Damerval et al, 1993). Dans un premier temps, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel présentant un gradient de pH continu. Au cours de cette étape appelée isoélectrofocalisation (IEF), les protéines migrent dans le gel jusqu'à une position où la valeur du pH est égale à celle de leur point isoélectrique (pI) auquel la charge globale de la protéine est nulle. Cette première séparation est délicate et dépend beaucoup de la préparation des échantillons biologiques. Cette dernière doit permettre la solubilisation maximale des protéines et empêcher leur agrégation tout en évitant leur dégradation. Elle fait l'objet de travaux de recherche constants, notamment par l'équipe de T. Rabilloud du CEA de Grenoble (Rabilloud et al, 1997; Chevallet et al, 1998). Les techniques d'IEF ont été considérablement améliorées ces dernières

années en vue d'une meilleure reproductibilité et d'un meilleur recouvrement de l'échelle des pH. En particulier, la technique de l'électrophorèse en gradient de pH immobilisé pour la première dimension, ou IPG présente de nombreux atouts comme une capacité de chargement en protéines 10 fois plus importante qu'une IEF classique et la possibilité de réaliser des gradients de pH étalés sur seulement 1 à 2 unités de pH (revue dans Görg et al, 2000).

II.1.2/ SDS-PAGE

La deuxième dimension ou SDS-PAGE (Sodium-Dodécyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) est réalisée dans un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un dénaturant, le Sodium-Dodécyl Sulfate (SDS). Ce dernier, chargé négativement, interagit avec les protéines, les déplie et leur confère une même densité de charge. La charge négative globale des protéines entourées de SDS devient alors proportionnelle à leur masse, indépendamment de leur propre charge initiale. Grâce à la réticulation plus ou moins importante du gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées en fonction de leur taille par tamisage moléculaire, leur vitesse de migration dans le gel étant inversement corrélée à leur taille. Comme pour l'IEF, plus le gel de deuxième dimension est grand, plus la résolution, et donc le nombre de spots séparés augmentent. Des gels de 20 x 20 cm, voire plus grands, sont aujourd'hui couramment utilisés, et l'utilisation de l'acrylamide chimiquement modifié par des résines permet d'augmenter la résistance des gels, facilitant ainsi leur manipulation.

II.1.3/ Détection des protéines par coloration des gels 2D

La dernière étape est la détection des tâches de protéines, ou spots, par coloration des gels. Plusieurs procédés de sensibilité différente existent et sont choisis en fonction de l'utilisation ultérieure des gels 2D :

- Le bleu de coomassie (R250) permet de détecter dès 100 ng de protéine par spot et présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines dans le spot.

- La coloration négative au Zinc-Imidazole présente une sensibilité au moins égale au bleu de coomassie et a l'avantage d'être réversible.
- La coloration au nitrate d'argent est jusqu'à 1000 fois plus sensible que le bleu de coomassie (dès 0,1 ng par spot) et permet la révélation du maximum de protéines sur un gel. Mais elle présente certains inconvénients : la stoechiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire et certaines protéines se colorent très mal, voire pas du tout avec cette méthode. De plus, la reproductibilité de la coloration est difficile à obtenir. Comme la quantité de protéine dans un spot coloré à l'argent est nettement moindre que dans un spot coloré au bleu de coomassie, une étape supplémentaire de réduction et d'alkylation est souvent réalisée avant la protéolyse par la trypsine. Ceci permet de dérouler davantage la protéine afin de présenter un plus grand nombre de sites de coupure à l'enzyme.
- La fluorescence est une méthode plus récente, dont la sensibilité est légèrement inférieure à celle de l'argent (1-2 ng par spot) et la linéarité de l'intensité de coloration équivalente, mais qui est plus reproductible, plus facile et plus rapide que la coloration au nitrate d'argent (revue dans Rabilloud et Charmont, 2000). Néanmoins son utilisation se révèle être très coûteuse. Différentes approches sont possibles. On peut marquer les protéines avant l'électrophorèse (dérivation pré-électrophorétique) avec une molécule fluorescente telle que le 2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H) furanone (MDPF). L'inconvénient de ce composé est qu'il réagit avec les groupes NH_2 des acides aminés basiques et de ce fait, il modifie la charge de la protéine et donc, sa migration. Pour pallier ce problème, on peut marquer les protéines avec le MDPF après l'IEF, avant la deuxième dimension. Une dernière possibilité consiste à révéler les gels 2D avec un composé fluorescent post-électrophorétique comme le SYPRO Orange, le SYPRO Red, ou le SYPRO Ruby (Steinberg et al, 1996). La coloration avec ses molécules se fait en une seule étape, et comme elle est basée sur des liaisons non-covalentes, elle est réversible et compatible avec un transfert des gels sur membrane ou une analyse ultérieure des spots par spectrométrie de masse.
- L'autoradiographie des gels après incorporation dans les protéines d'isotopes radioactifs comme le ^{35}S ou le $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ est extrêmement sensible. En effet, elle permet de visualiser des quantités très faibles de protéines (de l'ordre de 1 à 100 pg). Cependant, cette méthode de détection n'est pas ou peu compatible avec l'analyse en spectrométrie de masse. De plus, le marquage avec des composés radioactifs ne rend pas compte de la quantification réelle des protéines dans la cellule. En effet, il

existe des protéines qui ne contiennent pas (environ 14% des protéines totales) ou très peu de résidu Cystéine dans leur séquence, alors que d'autres en contiennent beaucoup, ce qui entraîne respectivement une sous- ou une sur-représentation de ces protéines.

II.2/ Analyse informatisée des gels 2D

Depuis les débuts de l'électrophorèse 2D, la méthode d'analyse des gels a évolué grâce aux progrès combinés de l'informatique et de l'analyse d'image. La première étape de l'analyse est la digitalisation des gels, c'est-à-dire, la transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par l'ordinateur. Plusieurs types d'appareils permettent de réaliser cette acquisition d'image : scanners, caméras, densitomètres lasers, phospho- ou fluoro-imageurs. Ces outils découpent l'image en pixels et déterminent la différence de tons entre chacun d'eux. Ils reproduisent l'intensité, le périmètre, l'aire et l'orientation des tâches protéiques. Dans un deuxième temps, les images obtenues sont analysées informatiquement. Pour cela, divers logiciels (Mélanie II, Bio-Image, PDQuest, ...) qui permettent d'éliminer le bruit de fond, les artefacts de migration et de comparer l'intensité des tâches résolues (ou spots) ont été développés. La détection des protéines présentes sur un gel n'a en elle-même que peu d'intérêt. Les informations pertinentes sont tirées de la comparaison des tâches provenant des gels de différentes situations expérimentales. Toute la difficulté repose donc sur la capacité de comparer les tâches de même origine d'un gel à l'autre. Durant ces dernières années, des progrès considérables apportés sur les logiciels d'analyse d'image combinés à une meilleure reproductibilité des gels 2D ont facilité ce processus de comparaison et l'ont rendu beaucoup plus fiable. En pratique, le traitement d'une série de gels provenant d'un même échantillon définit un gel de référence appelé "master gel". C'est à cette image obtenue que seront comparés les gels des autres échantillons. Le logiciel permet une analyse quantitative de l'expression des protéines. Pour pallier la difficulté de charger des quantités de protéines identiques d'une manipulation à une autre, l'intensité attribuée à chaque tâche protéique peut être exprimée en intensité relative (ppm, partie par milliers, ou pourcentage) de ce spot par rapport à l'ensemble des spots détectés sur le gel.

Ainsi, l'électrophorèse bidimensionnelle apparue dès le milieu des années 1970 (O'Farrell et al, 1975) a été et est encore aujourd'hui constamment améliorée, et ce, à différents niveaux (préparations des échantillons, méthodes de séparation et de détection des protéines, analyse d'images,...). Elle reste à ce jour la technologie de prédilection pour l'étude du protéome.

II.3/ Identification des protéines présentes dans les gels 2D : Analyse par spectrométrie de masse.

L'identification des protéines séparées sur les gels 2D a longtemps constitué un problème technique délicat. Si on recherchait une protéine connue, on pouvait jusqu'alors faire des expériences de comigration avec la protéine purifiée, ou encore réaliser des immunodétections après transfert des protéines sur membrane, cette méthode restant limitée par les difficultés à obtenir des anticorps spécifiques. Dans le cas d'une protéine inconnue, il est possible de la soumettre au séquençage N-terminal d'Edman, avec toutefois des inconvénients majeurs pour cette technique : Près de trois quart des protéines ont leur extrémité N-terminale bloquée, rendant impossible le séquençage N-terminal de la protéine. En outre, cette technique requière des quantités relativement importantes de la protéine à identifier (de l'ordre de 5-10 pmol) et la vitesse de séquençage est lente (un acide aminé séquencé toutes les 40 minutes environ).

L'avancée majeure en terme de possibilité d'identification des protéines date de 1993-1994 et correspond à l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des bases de données. En s'adaptant à la biologie structurale, la spectrométrie de masse a permis de réduire considérablement les quantités de protéines nécessaires à l'identification (revue dans Matsuo et Seyama, 2000). Cette technique permet de déterminer avec une sensibilité et une précision extrêmes la masse des molécules. Très succinctement, un spectromètre de masse se compose :

- d'une source où s'effectuent l'ionisation et la désorption des ions,
- d'un analyseur où les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z),
- et d'un détecteur permettant l'enregistrement et la quantification des ions.

Pour l'étude des composés peptidiques, deux modes d'ionisation sont principalement utilisés : la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électrospray. Nous

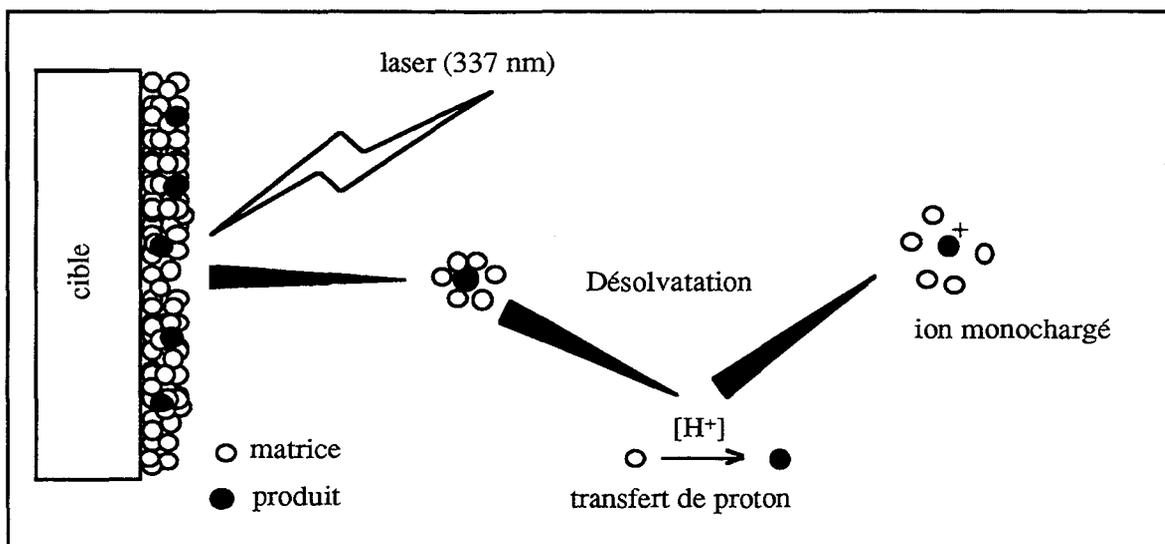


Figure 16 : Principe de l'ionisation en mode MALDI (Ionisation/Désorption de la Matrice Assistée par Laser) (D'après Karas et Hillenkamp, 1988).

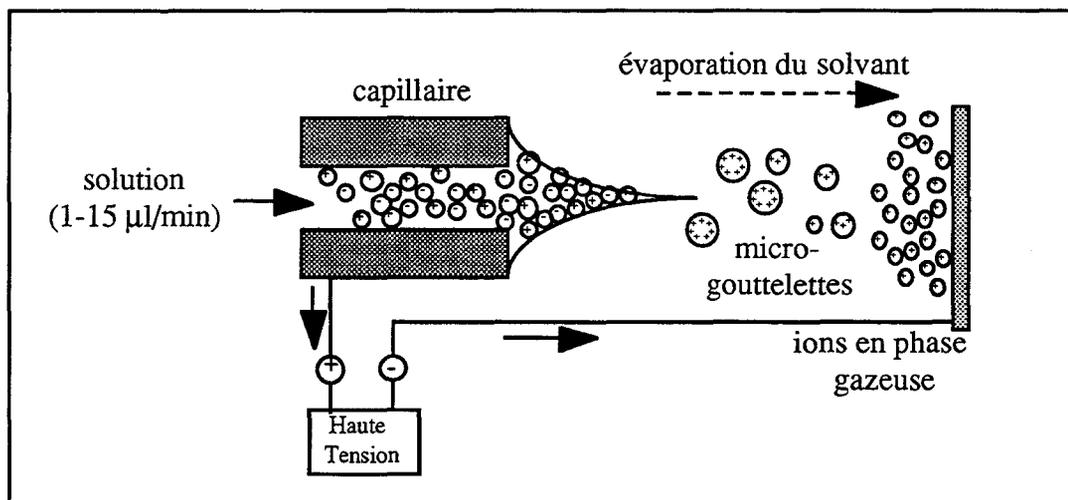


Figure 17 : Principe de l'ionisation en mode électrospray (D'après Kebarle et Tang, 1993).

allons dans la suite de ce paragraphe exposer brièvement les principes des techniques d'ionisation utilisées dans cette thèse (MALDI et ESI) et de la spectrométrie de masse en tandem.

II.3.1/ La spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le principe, schématisé dans la figure 16, est d'irradier par un faisceau laser (337 nm) les molécules d'un échantillon co-cristallisées dans une matrice à la surface d'une cible. L'énergie absorbée par le mélange va induire la désorption de cette phase solide en phase gazeuse, dans laquelle vont avoir lieu des transferts électroniques et protoniques, conduisant à la formation d'ions positifs et négatifs. Après accélération des ions sous une différence de potentiel (V), ils sont séparés en fonction de leur temps de vol ("time of flight") dans l'analyseur : à énergie cinétique constante, la vitesse des ions est inversement proportionnelle à leur masse, c'est-à-dire que les ions les plus légers seront accélérés davantage que les ions plus lourds, et seront par conséquent détectés les premiers. Cette méthode spectrométrique possède de nombreux avantages tels que sa facilité d'utilisation, sa rapidité d'acquisition des spectres, sa tolérance vis-à-vis des détergents et des sels, et surtout sa haute sensibilité (< 1pmol), qui en font une méthode de choix pour l'étude du protéome.

II.3.2/ L'ionisation en mode électrospray (ou nanospray)

Le phénomène d'électrospray est réalisé en appliquant un fort champ électrique (10^6 V/m) à un fin tube capillaire dans lequel s'écoule une solution (contenant le composé à analyser) à un faible débit (1-15 μ l/min). Comme le montre la figure 17, sous l'action du champ électrique très intense appliqué à la pointe du capillaire, le liquide est polarisé et il y a séparation des charges positives et négatives. L'accumulation de charges provoque une déstabilisation de la surface du liquide, qui prend alors la forme d'un cône. C'est à partir de celui-ci que les gouttelettes chargées sont émises. Au cours du trajet dans la source d'ionisation, sous l'influence du flux d'azote, le solvant contenu dans les gouttelettes va s'évaporer progressivement et va provoquer une diminution de la taille des gouttelettes, jusqu'à ce que les forces de répulsion provoquent leur explosion en microgouttelettes. Ce processus se déroule plusieurs fois, jusqu'à la formation d'ions

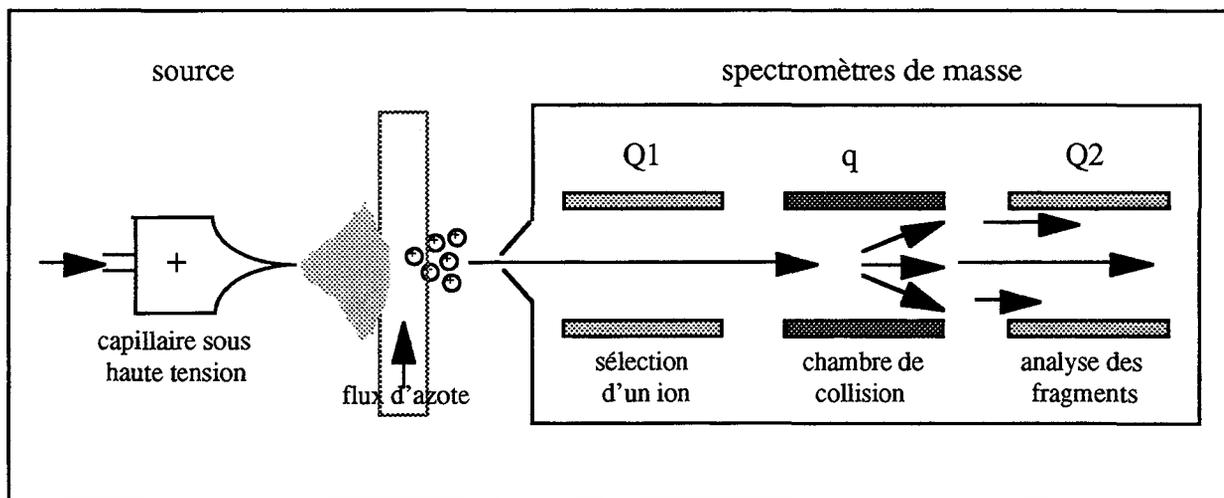


Figure 18 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem : Analyseur triple-quadripôle équipé une source d'ionisation en mode électrospray (Q, quadripôle).

désolvatés et multichargés, qui seront séparés et analysés dans le spectromètre de masse sous forme d'ions $M+H^{n+}$.

II.3.3/ La spectrométrie de masse en tandem (MS-MS)

La spectrométrie de masse en tandem a pour but d'étudier la structure d'une molécule à partir de l'analyse des fragments de celle-ci générés par collision avec des molécules de gaz neutre. Le principe résumé dans la figure 18 est le suivant : un ion de rapport m/z déterminé est sélectionné dans le premier spectromètre de masse (quadripôle Q1), puis il est fragmenté dans une chambre de collision (quadripôle q) par impact avec des molécules de gaz inerte, générant ainsi des ions fils analysés au niveau du dernier spectromètre de masse (quadripôle Q2). La lecture de la séquence peptidique issue du spectre MS-MS repose sur la différence de masse observée entre deux ions de même série, cette différence étant propre à chaque acide aminé. L'utilisation de la MS-MS permet ainsi de générer de courtes séquences peptidiques qui complètent les informations du spectre de masse MALDI et contribuent à l'identification sans ambiguïté des protéines analysées.

II.3.4/ Identification des protéines par spectrométrie de masse : l'empreinte peptidique

Cette technique a été décrite en 1993 par différents groupes de recherche (Henzel et al, 1993; James et al, 1993; Mann et al, 1993). Le principe de l'analyse protéomique est représenté dans la figure 15. Dans une première étape, les protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle sont digérées soit directement dans le gel soit après transfert sur une membrane, par une enzyme ou un composé chimique qui coupe spécifiquement après certains acides aminés. La trypsine, qui coupe en C-terminal d'un résidu lysine ou arginine, est la plus souvent utilisée. Les masses des peptides obtenus après digestion de la protéine sont mesurées par MALDI-TOF, et l'ensemble de ces masses constitue l'empreinte peptidique de la protéine. Ce terme est employé par analogie à l'empreinte digitale qui est unique et spécifique d'un seul individu. De même, chaque protéine possède une empreinte peptidique qui lui est propre du fait de l'enchaînement particulier des acides aminés qui lui confère, pour une méthode de digestion donnée, une combinaison unique

de masses peptidiques. Cette empreinte peptidique est comparée aux empreintes peptidiques contenues dans les banques de données et issues de la digestion enzymatique théorique des protéines ou des ADN complémentaires correspondants qui sont répertoriés respectivement dans les banques de données protéiques et génomiques. L'identification de la protéine est fondée sur la reconnaissance d'un nombre maximal de peptides issus de l'empreinte peptidique avec le candidat proposé. Lorsque plusieurs candidats sont proposés, les données du spectre MALDI-TOF sont alors enrichies par les paramètres physico-chimiques de la protéine recherchée (MM et pI) déterminés par l'électrophorèse bidimensionnelle, et éventuellement par la séquence peptidique déduite du spectre de masse MS-MS. Ce dernier élément devient cependant nécessaire lorsque la protéine à identifier n'est pas encore enregistrée dans les banques de données protéiques. La recherche d'un candidat dans les banques de données génomiques est alors basée sur les séquences d'ADN complémentaire déduites des séquences peptidiques obtenues par MS-MS. Ainsi, comme nous l'avons déjà souligné (figure 14), les avancées dans le décryptage du génome de différents organismes ont été fondamentales pour le développement et l'émergence de l'analyse protéomique en contribuant à la richesse des banques de données.

Le véritable défi de la spectrométrie de masse repose désormais en partie, sur l'élaboration de programmes bioinformatiques encore plus efficaces pour tirer au mieux parti des informations contenues dans les spectres de masse et permettre de leur corrélérer rapidement et avec la fiabilité statistique nécessaire, le contenu de diverses banques de données. De plus, le développement de la robotisation et de l'automatisation progressives des étapes concernant l'excision du spot et la protéolyse, jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse et la recherche dans les banques de données, permet de réduire les risques de contamination et les variations dues à la préparation manuelle des échantillons, et d'augmenter considérablement le nombre d'échantillons analysables par jour.

II.4/ Limites de l'analyse protéomique

Alors qu'on estime la taille du génome à plusieurs dizaines de milliers de gènes, il est difficile de prédire celle du protéome à cause des phénomènes d'épissages alternatifs et des

modifications post-traductionnelles qui font qu'un seul gène conduit à plusieurs protéines. Il est donc difficile de prétendre qu'un seul gel 2D puisse contenir le protéome entier du type cellulaire ou du tissu analysé. Une raison biologique est que les gènes ne sont jamais exprimés tous en même temps, à un instant donné. A cela, s'ajoutent des raisons techniques concernant en particulier les protéines membranaires et les protéines très basiques. Plusieurs travaux ont montré la difficulté d'extraction et de solubilisation des protéines membranaires qui sont relativement hydrophobes. Pour pallier ce problème, des combinaisons de nouveaux agents chaotropiques et détergents sont utilisés (revue dans Santoni et al, 2000). Quant aux protéines très basiques, telles que les histones et les protéines ribosomales, elles ne sont pas/peu visibles sur un gel 2D après une IEF classique, mais on peut les détecter après une NEPHGE (non-equilibrium pH gradient electrophoresis), technique de première dimension pendant laquelle la migration des protéines est arrêtée quelques heures avant que l'équilibre ne soit atteint. Mais cette technique est délicate, moins résolutive qu'une IEF classique et difficilement reproductible. La véritable révolution technologique vient des électrophorèses en gradient de pH immobilisé (IPG) dont le développement s'est accompagné de progrès considérables dans le domaine de la résolution des protéines basiques. En effet elle couvre la gamme de pH de 3,5 à 10 et permet de réaliser des gradients étalés sur seulement 1 à 2 unités de pH (revue dans Görg et al, 2000).

L'étude du protéome complet se heurte également aux protéines très faiblement exprimées, qui souvent, constituent des protéines d'intérêt en pharmacotoxicologie. L'analyse protéomique ne dispose pas de moyen d'amplification équivalent à la technique de PCR ("Polymerase Chain Reaction") pour l'analyse génomique, mais d'autres moyens peuvent venir à bout de ce problème majeur. Ainsi, des étapes de fractionnement cellulaire et/ou d'enrichissement sélectif (anticorps, colonne d'affinité) peuvent améliorer la sensibilité des protéines faiblement exprimées. De plus, là aussi l'IPG peut apporter une amélioration. En effet, les gels de première dimension détiennent une capacité de chargement en protéines dix fois plus importante qu'un gel d'IEF classique, permettant ainsi de détecter des protéines traduites en un très faible nombre de copies. Désormais, pour un même échantillon, en réalisant les "proteomic contigs", c'est-à-dire plusieurs gels 2D de gradients de pH restreints et chevauchants pour obtenir une gamme de pH maximale et éclatée (Görg et al, 1999), et de réticulations différentes pour balayer un maximum de masses moléculaires, on

augmente significativement la fraction visible du protéome étudié. Parallèlement à ces améliorations, les avancées considérables dans la sensibilité des spectromètres de masse (de l'ordre de la femtomole) permettent aussi de diminuer le niveau de détection pour les protéines faiblement exprimées.

III- APPLICATIONS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE

III.1/ En biologie

Les avancés de l'analyse protéomique ont porté dans un premier temps sur des organismes simples, principalement des procaryotes qui comportent un nombre restreint de protéines et de modifications post-traductionnelles. La connaissance des protéomes des virus (revue dans Thomas et al, 2000), des mycoplasmes (Wasinger et al, 2000), ou des bactéries comme *Escherichia coli* (Link et al, 1997; Tonella et al, 1998), *Bacillus subtilis* (Antelmann et al, 1997), *Haemophilus influenzae* (Langen et al, 2000) ou des mycobactéries (Jungblut et al, 1999) est maintenant bien avancée et permet la construction de banques de données de plus en plus complètes. Ces cartes protéomiques servent de base à des études biologiques portant sur les effets que peuvent entraîner l'environnement ou le stress sur le protéome de ces microorganismes. Chez les eucaryotes, les protéines sont très souvent modifiées par des clivages N- ou C-terminaux, et/ou par de nombreuses modifications post-traductionnelles. L'étude de leur protéome conduit donc à analyser un nombre beaucoup plus important de protéines qu'il y a de gènes dans leur génome. Parce que le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été le premier génome entièrement séquencé, cet organisme a fait l'objet de nombreuses études protéomiques (Shevchenko et al, 1996; Futcher et al, 1999). Ces dernières peuvent d'ailleurs servir à l'étude des protéomes humains, puisqu'il a été estimé qu'un cinquième des gènes reconnus comme responsables de maladies chez l'homme a un homologue chez la levure (Richards et al, 1997).

Les applications de l'analyse protéomique en biologie sont multiples et variées, mais nécessitent une étape préalable de mise au point. Des phénomènes biologiques complexes, tels que la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose, sont contrôlés par l'action concertée de plusieurs

protéines qui agissent en complexe multimérique fonctionnel qui évolue au cours du processus. Pour mieux comprendre les détails moléculaires de la machinerie cellulaire, il est donc important d'identifier ces protéines participant à la formation de ces divers complexes, identification possible par analyse protéomique (revue dans Link et al, 1999). Pour cela, l'immunoprécipitation d'une des protéines du complexe est réalisée sur le lysat cellulaire total dans des conditions non dénaturantes. Les sous-unités du complexe sont ensuite séparées par électrophorèse 2D et identifiées par spectrométrie de masse (Shevchenko et al, 1996). Cette technique a déjà permis de caractériser des protéines peu abondantes dans le complexe mais fonctionnellement importantes. Par exemple, le spliceosome, complexe multi-protéique responsable de l'excision des introns sur les ARNm est composé chez la levure d'au moins vingt protéines dont la plupart ont été identifiées grâce aux séquences peptidiques obtenues par séquençage en MS-MS en mode électrospray (Neubauer et al, 1997). L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem a également permis d'identifier chez la levure cinq nouvelles protéines purifiées en quantité inférieure au nanogramme, et qui font partie du complexe promoteur de l'anaphase (APC, Anaphase-Promoting Complex) responsable de la transition métaphase-anaphase chez la levure (Zachariae et al, 1998).

Outre la caractérisation d'un complexe multimérique, le couplage 2DE/SM trouve d'autres applications en biologie cellulaire. Il peut permettre de localiser précisément des sites de phosphorylation, comme cela a été réalisé pour la β -caséine (Neubauer et Mann, 1999) ou pour le domaine catalytique de la protéine kinase Src de poulet (Weijland et al, 1996). Une autre étude plus récente utilisant la spectrométrie de masse nanospray a montré que la protéine tau qui devient hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer, possède plusieurs sites de phosphorylation qui sont reconnus distinctement par différents membres de la famille des MAPK (Reynolds et al, 2000). Par ailleurs, l'analyse protéomique se révèle être une méthode puissante pour l'étude des voies de signalisation. Ainsi, de nouvelles protéines impliquées dans l'activation de NF-kappaB (Mercurio et al, 1997) ou dans l'apoptose induite par Fas (Muzio et al, 1996), ont pu être caractérisées après analyse par spectrométrie de masse. En outre, dès le début des années 1990, certains auteurs avaient déjà utilisé l'électrophorèse 2D comme technologie centrale pour l'étude de l'action de facteurs stimulant la croissance cellulaire, comme l'insuline, l'EGF, le FGF-1, le FGF-2 et le NGF, et notamment pour leurs effets sur la synthèse (Loret et al, 1989; Hondermarck et al, 1994) ou la phosphorylation des protéines (Schwartz, 1993). Néanmoins, l'identité de la majorité

de ces protéines modifiées restait hypothétique. C'est grâce au développement de l'analyse protéomique que l'identification des protéines régulées par des facteurs de croissance ou des cytokines est désormais possible. Ainsi, trois protéines dont l'expression est supprimée par l'action simultanée de l'interféron gamma et du Tumor Necrosis Factor (TNF) ont été caractérisées dans les cellules de carcinome cervical (Matsui et al, 1997), et dans le cadre de la modulation de la réponse immunitaire par l'interféron alpha dans les lymphocytes T, une nouvelle famille de protéines apparentées à l'ubiquitine a été identifiée (Nyman et al, 2000). D'autre part, en combinant l'immunodétection des protéines phosphorylées séparées par électrophorèse bidimensionnelle et l'identification par spectrométrie de masse, près de 20 protéines phosphorylées sur des résidus sérine ou tyrosine par le PDGF (Soskic et al, 1999) et 21 protéines tyrosine-phosphorylées par le TNF-alpha après stimulation de fibroblastes murins (Yanagida et al, 2000) ont été identifiées. De la même manière, en utilisant la spectrométrie de masse après séparation par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par un anticorps anti-phosphotyrosine, Pandey *et al.* (2000) ont identifié 9 protéines de signalisation activées par l'EGF dans les fibroblastes NIH 3T3, dont vav-2, un nouveau facteur d'échange de nucléotide guanosine.

Comme le montrent ces exemples, l'utilisation de l'électrophorèse 2D couplée à la spectrométrie de masse après digestion enzymatique est promue à un bel avenir dans le domaine de la recherche fondamentale en biologie.

III.2/ En biomédecine

Les attentes principales de la médecine, qui de tout temps ont été améliorées, sont au nombre de trois :

- le diagnostic du patient, c'est-à-dire la possibilité de pouvoir le classer dans une catégorie précise;
- le pronostic de la maladie, permettant de prédire en particulier l'évolution de la maladie ou la réponse à un traitement donné ;
- fournir au patient un traitement qui sera adapté et sélectif à sa maladie.

Or, sur l'ensemble des maladies connues, seules 2% sont monogéniques, le reste résultant d'altérations multigéniques, notamment dans le développement d'un cancer, et dans tous les cas, le phénotype final pouvant être modulé par de nombreux autres facteurs. Du fait de la complexité des

Tissu	Marqueurs potentiels	(1)	Références
colon	calgranuline B	+	Ji H et al, 1997 Stulik et al, 1997
foie	protéine apparentée à l'aldose réductase	+	Cao et al, 1998
neuroblastome			Wimmer et al 1996
poumon			Hirano T et al, 1995
maladie cardiovasculaire			Patel VB et al, 1997 Arnott et al, 1998
Maladies neuropsychiatriques	GFAPs (Glial Fibrillary Acidic Protein), ubiquinone cytochrome c reductase, carbonic anhydrase I, fructose biphosphate aldolase, dihydropyriminase related protein-2 (DRP-2).	+/-	Johnston-Wilson et al, 2000 revue dans Rohlff, 2000
Syndrome de Down, Alzheimer	facteur B du complément	+	Unlu et al, 2000
	DRP-2 (dérégulation de l'expression des différentes isoformes)		Lubec et al, 1999
Maladies urologiques :			revue dans Unwin et al, 1999
rein	cytochrome c réductase, NADH-ubiquinone oxydo-réductase	-	Sarto et al, 1997
prostate	NDKA/nm23 gène suppresseur de métastases	-	Nelson et al, 2000
vessie	adipocyte-type fatty acid binding protein	-	Celis et al, 1996

Tableau 6 : Caractérisation de nouveaux marqueurs potentiels dans diverses pathologies par analyse protéomique. (1) régulation dans la progression de la maladie.

interactions entre l'environnement, les gènes et leurs produits, une approche complémentaire à l'analyse génétique est devenue nécessaire en recherche clinique afin de mieux comprendre les régulations ou les dérégulations responsables des maladies : l'analyse des éléments fonctionnels dans la cellule, c'est-à-dire le protéome.

Les applications cliniques de l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse sont liées à la possibilité de faire une analyse comparée des gels 2D entre une situation contrôle et une situation particulière (maladie, traitement par un composé,...), permettant de mettre en évidence des différences dans le profil protéique (variations d'intensité, spots supplémentaires, spots manquants) (figure 15). Ces protéines exprimées de manière différentielle peuvent être ensuite identifiées par spectrométrie de masse, puis dans une étape ultérieure, une analyse fonctionnelle de ces protéines pourra être réalisée à l'aide de diverses méthodes biochimiques et moléculaires. Ces différences observées entre plusieurs situations ont un intérêt médical majeur, puisqu'elles peuvent aboutir à l'identification de nouveaux marqueurs de cancérisation, de maladies métaboliques, ou encore de processus liés au vieillissement ou à la différenciation cellulaire.

Parmi les matériels biologiques étudiés, on trouve les fluides biologiques, tels que le plasma dont la composition protéique varie au cours de différentes pathologies comme les maladies auto-immunes ou dans diverses infections. Voici quelques exemples marquants sur l'application de l'analyse protéomique pour les maladies atteignant le cerveau (démence, neurodégénération). Des travaux sur le liquide spinal de patients atteints de démence ont montré qu'il contient deux protéines non détectées chez les sujets sains qui ont été identifiées comme la chaîne gamma de la protéine Tau, qui s'est révélée être un marqueur de la maladie de Creutzfeldt-Jacob (Lee et Harrington, 1997). Ce cas illustre bien les bénéfices de l'approche protéomique pour la découverte de nouveaux marqueurs, car il n'existait pas de test pour le diagnostic de cette maladie jusqu'à ce qu'il soit découvert que la protéine Tau localisée normalement dans le cerveau se disperse dans le liquide spinal dans la maladie de Creutzfeldt-Jacob. En utilisant le même matériel biologique (fluide cérebrospinal) de patients atteints d'une maladie neurodégénérative (syndrome de Down ou maladie d'Alzheimer), une équipe autrichienne a observé par analyse protéomique une dérégulation du niveau des isoformes de la dihydropyriminase related protein-2 (DRP-2) qui pourrait expliquer

les anomalies de fonctionnement du cerveau des patients atteints de l'une ou l'autre de ces deux maladies (Lubec et al, 1999). Cette même protéine a d'ailleurs été récemment identifiée par analyse protéomique comme un des marqueurs qui décroît dans les maladies neuropsychiatriques (schizophrénie, dépression sévère,...) par rapport aux individus sains (Johnston-Wilson et al, 2000). Ces exemples sur les désordres du système nerveux démontrent la puissance de l'approche protéomique pour identifier de nouveaux marqueurs spécifiques (revue dans Rohiff, 2000).

Outre les liquides biologiques, de nombreuses recherches sont effectuées sur des échantillons solides, provenant de tumeurs de tissus d'origine variée ou de tissus malades (maladies cardiovasculaires,...) (revue dans Alaiya et al, 2000). Ces études, comme le montrent les exemples répertoriés dans le tableau 6 (liste non exhaustive), semblent très prometteuses. En effet, des protéines spécifiques d'un stade de la tumorigenèse ou de la maladie ont été identifiées grâce au couplage électrophorèse 2D/spectrométrie de masse. Néanmoins, une investigation plus poussée est maintenant nécessaire pour vérifier le caractère potentiel de ces protéines comme marqueur spécifique de la pathologie.

Parallèlement aux travaux effectués sur des tumeurs, des études du protéome de lignées cellulaires de différents types de cancers sont en cours. Cette approche *in vitro* permet d'étudier plus facilement les variations de protéines sur plusieurs lignées de même origine, mais avec par exemple, un potentiel métastatique différent (Osada et al, 1996); cela permet également de tester leur réponse à divers composés pharmacologiques chimiques ou naturels (Myers et al, 1997). L'utilisation des lignées cellulaires permet donc de mettre en évidence des protéines corrélées au potentiel métastatique des cellules cancéreuses, à l'effet et/ou à l'efficacité d'un traitement. Bien évidemment, le but de l'analyse protéomique n'est pas de remplacer des méthodes de dosages quantitatifs existants, mais d'identifier des marqueurs cliniques potentiels qui pourront être alors dosés par des techniques plus sensibles, plus quantitatives et permettant un débit élevé et rapide, telles que le dosage ELISA.

Pour le cancer du sein, on notera que les premières études sur des tissus mammaires cancéreux en utilisant l'électrophorèse 2D datent de 1984 (Stastny et al, 1984; Motte et al, 1984). Le nombre de spots détectés était alors de l'ordre de quelques centaines de spots par gel. Que de

progrès entrepris depuis, puisqu'aujourd'hui, ce nombre dépasse largement les 2000 protéines! Mais déjà, le potentiel important de l'analyse comparée des gels 2D était utilisé. Cinq ans plus tard, deux équipes détectent une vingtaine de différences significatives d'expression des protéines entre les tissus mammaires normaux et cancéreux (Wirth, 1989; Maloney et al, 1989). En outre, Wirth *et al.* (1989) ont aussi trouvé une corrélation entre l'expression des récepteurs aux oestrogènes et d'une protéine de 24 kDa, qui se révélera être plus tard l'HSP27. Par la suite, des études concernant la distribution de protéines spécifiques comme les protéines du cytosquelette ou de la matrice nucléaire ont été réalisées par électrophorèse 2D. Les auteurs ont observé des anomalies d'expression de certaines cytokératines, comme la kératine 5 (Trask et al, 1990) et des tropomyosines, comme la tropomyosine 1 (Bhattacharya et al, 1990), dont l'expression est diminuée dans les cellules épithéliales cancéreuses par rapport aux cellules épithéliales normales, soulignant leur implication probable dans la progression tumorale. L'étude des protéines de la matrice nucléaire a également révélée des différences entre les échantillons de tissus mammaires normaux et cancéreux, et entre des lignées cellulaires de cancer du sein plus ou moins différenciées (Khanuja et al, 1993, Samuel et al, 1997). Mais ces protéines nucléaires qui peuvent avoir un intérêt potentiel comme facteurs pronostiques, restent à identifier. L'analyse systématique par électrophorèse 2D de l'expression des protéines de cellules mammaires provenant de tumeurs, de réductions mammoplastiques ou de lignées établies, s'est considérablement accélérée dans la moitié des années 1990, permettant la mise en place de profils protéiques des cellules mammaires disponibles sur le réseau internet, avec la position et les caractéristiques de nombreuses protéines identifiées par des expériences de co-migration, d'immunodétection, de séquençage N-terminal, ou de comparaison dans les banques de données (Franzen, et al, 1996a, 1996b, 1997; Giometti et al, 1997; Bini et al, 1997; Williams et al, 1998). Néanmoins ce n'est que récemment que le couplage de l'électrophorèse 2D et de la spectrométrie de masse a été utilisé pour l'identification des protéines de cellules mammaires. Page *et al.* (1999a) ont ainsi caractérisé plus de 300 protéines, dont plus de la moitié sont spécifiques aux cellules épithéliales luminales ou aux cellules myoépithéliales purifiées à partir de réductions mammoplastiques. Bergman *et al.* (2000) ont eux identifié quatre protéines qui n'avaient pas encore été reportées jusqu'à présent dans les carcinomes de sein : le cytochrome B5, deux protéines ribonucléiques nucléaires et un produit d'oncogène, la protéine DJ-1. Une méthode alternative à l'électrophorèse 2D est la séparation des protéines par

chromatographie liquide à haute performance. Chong *et al.* (1999) ont couplé cette technique à la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour séparer et identifier les protéines différentes entre les cellules mammaires immortalisées non transformées, les MCF-10A et les cellules mammaires malignes et métastatiques, les MCF-10 Cala. Ils ont ainsi caractérisé huit oncoprotéines dont p21/Ras, la protéine-kinase Src, C-myc, et le suppresseur de tumeur p53.

Ainsi, au travers de ces différents travaux, on peut mesurer l'évolution importante qu'il y a eu pour identifier des protéines séparées par électrophorèse 2D, qui elle, est utilisée depuis plus de 15 ans. Il est clair que l'apport de la spectrométrie de masse est essentiel, en facilitant l'identification des protéines et en permettant un haut débit d'analyses. L'utilisation combinée de la génomique et de la protéomique ouvre de nouvelles perspectives sur la compréhension des mécanismes fondamentaux des maladies chez l'homme.

III.3/ En pharmacologie

L'analyse protéomique permet l'évaluation de l'utilité potentielle de nouveaux médicaments en comparant les profils protéiques d'un état normal ou malade, avec et sans traitement par la molécule à tester. Les principales applications directes en pharmacologie sont au nombre de trois :

- identifier les cibles moléculaires liées au mode d'action de la substance,
- évaluer les relations structure/activité des analogues de médicaments connus,
- donner une indication sur l'activité toxique du composé.

Pour le premier point, un exemple ancien est l'identification des cibles intracellulaires de la lovastatine, une molécule qui réduit le cholestérol, comme étant des protéines impliquées dans le métabolisme de celui-ci (Anderson et al, 1991). Un autre exemple est l'étude de l'efficacité de OGT719, un dérivé d'un composé cytotoxique, le 5-fluorouracile (5-FU) actuellement testé pour le traitement des métastases dans le foie de carcinomes hépatocellulaires et colorectaux. L'avantage du dérivé est que son action est ciblée, car il est reconnu par un récepteur spécifique (de l'asialoglycoprotéine, ASGP-r), exprimé uniquement dans les hépatocytes, les cellules d'hépatome et les tumeurs colorectales. Le but de l'étude était de vérifier que l'inhibition observée par un

traitement avec l'OGT719 était bien dû à sa conversion en 5-FU, molécule active. Pour cela, les profils protéomiques de cellules humaines d'hépatome inhibées par l'un ou l'autre des deux composés, ont été comparés après exposition à chacune des drogues. L'analyse différentielle de ces profils a mis en évidence 19 protéines modifiées dans les deux cas, et a montré une similitude du mode d'action de ces deux composés. En effet, l'OGT719 et le 5-FU agissent tous les deux en particulier sur une protéine ribosomale nucléaire qui intervient dans les mécanismes biochimiques du cycle cellulaire et de la croissance (Page et al, 1999b). Cet exemple illustre également le deuxième point, à savoir la connaissance de l'activité d'un analogue structural d'un médicament. Par ailleurs, l'étude de l'effet d'une molécule par analyse protéomique peut se faire sur des modèles animaux. Une équipe suédoise a utilisé des souris obèses et diabétiques *ob/ob* qui présentent un modèle de maladie avec résistance à l'insuline. Ils ont testé sur ces souris les effets d'un médicament utilisé pour traiter des problèmes de métabolisme lipidique chez l'homme, la molécule WY14,643. L'analyse protéomique du foie de souris traitées par cette molécule a mis en évidence la surexpression de 16 protéines, dont 14 d'entre elles ont été identifiées comme des composants du métabolisme peroxisomal des acides gras. L'implication de ces protéines dans le mode d'action du composé WY14,643 peut expliquer les effets thérapeutiques positifs de cette substance sur ces souris *ob/ob* (Edvardsson et al, 1999).

Pour le dernier point, c'est-à-dire l'évaluation de la toxicité d'un médicament, un excellent exemple de l'utilisation de l'analyse protéomique en toxicologie est donné par l'étude de l'activité toxique de la cyclosporine A (CsA) sur le rein (Aicher et al, 1998). Dans une première étude, les auteurs ont comparé les profils 2D de rein de rats traités ou non par la CsA. Une des protéines dont l'expression est inhibée par ce traitement a été identifiée comme la calbindine, protéine impliquée dans la fixation et le transport du calcium. Ces résultats ont permis de relier l'effet toxique de la CsA, qui entraîne une calcification rénale intratubulaire, avec la diminution de la calbindine (Steiner et al, 1996). Dans une deuxième étude, les auteurs ont investigé l'effet de la CsA sur des chiens et des singes qui ne présentent habituellement pas de néphrotoxicité liée à la CsA. L'analyse protéomique du tissu rénal n'a révélé aucune diminution de la calbindine, contrairement au rein humain dans lequel la CsA est toxique du fait de la forte diminution de la calbindine. Ces résultats mettent donc en évidence la calbindine comme marqueur de la toxicité rénale de la CsA (Aicher et

al, 1998). D'autre part, cette approche permet également de connaître des effets non-spécifiques de molécules qui, à long terme, peuvent éventuellement conduire à une toxicité. Par exemple, le traitement de cellules de sarcome de rat par l'OGT719 induit des variations de l'expression de plusieurs protéines, alors que la croissance de ces cellules n'est pas affectée par ce composé. L'identification de ces protéines et la connaissance de leur fonction biologique permettra de prédire la probabilité d'un éventuel effet toxique de l'OGT719 à plus ou moins long terme (Page et al, 1999b). Un dernier exemple porte sur l'analyse protéomique différentielle d'hépatocytes de rat traités soit par l'EGF, soit par une substance carcinogénique, la nafénopine, les deux molécules entraînant la prolifération et la suppression de l'apoptose dans ces cellules. Grâce au couplage électrophorèse 2D/SM, les auteurs ont identifié 32 protéines dont l'expression varie spécifiquement après traitement par la nafénopine, qui est connue pour agir via le peroxysome. L'intérêt majeur de ce travail est d'avoir caractérisé de nouvelles protéines non-peroxysomales, qui peuvent constituer des marqueurs toxicologiques potentiels pouvant faciliter la reconnaissance précoce de carcinogènes non-génotoxiques (Chevalier et al, 2000). En plus des études directes sur des organes et des tissus, on notera que le sérum, qui peut collecter de nombreux marqueurs de toxicité relargués de n'importe quel organe et tissu touchés, peut être utilisé pour évaluer la toxicité d'un médicament.

Ces exemples montrent que l'analyse protéomique fournit des informations essentielles sur le mécanisme d'action d'une substance médicamenteuse (agents anti-cancéreux, antibiotiques,...) mais aussi sur ses éventuels effets toxiques. La "pharmacoprotéomique" est en passe de devenir un outil indispensable pour les tests précliniques de médicaments, en accélérant l'identification et l'optimisation de nouveaux candidats pour les essais cliniques (revues dans Loo et al, 1999; Steiner et Anderson, 2000).

Au cours de cette thèse, nous avons développé l'approche protéomique ce qui nous a permis d'établir une cartographie différentielle des cellules mammaires normales épithéliales et de deux lignées cellulaires de cancer du sein, les MCF-7 et les MDA-MB-231. De plus, son utilisation a permis d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire du FGF-2 sur les cellules MCF-7.

MATERIELS
&
METHODES

I- CULTURE CELLULAIRE

I.1/ Les lignées cellulaires

Les cellules MCF-7 utilisées sont issues de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elles correspondent à une lignée hormono-sensible provenant d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain et possèdent les récepteurs aux oestrogènes en quantité significative. Elles ont une morphologie de cellules épithéliales et ont conservées plusieurs caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié.

La lignée cellulaire MDA-MB-231 provient de l'ATCC. Elle est établie à partir d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain mais très faiblement différencié. Ces cellules épithéliales sont hormono-indépendantes et sont tumorigéniques car elles forment des adénocarcinomes peu différenciés de grade III lorsqu'elles sont injectées dans des souris *nude*.

I.2/ Entretien des cultures de cellules mammaires épithéliales

La culture des cellules est réalisée dans du milieu MEM (Milieu Essentiel Minimum), avec des sels de Eagle (Gibco BRL) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté par chauffage (56°C, 30 minutes) (Eurobio), 1% d'acides aminés non essentiels (Eurobio), 2 mM de glutamine (Eurobio), 5 µg/ml d'insuline (Endopancreine), des antibiotiques (pénicilline-streptomycine: 100U/ml, gentamycine: 50 µg/ml) (Eurobio), 20 mM de tampon Hepes (Eurobio) et 7,5% de bicarbonate de sodium (Eurobio). Elles sont maintenues à une température de 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (5%) et saturée en humidité. Les cellules sont réensemencées toutes les semaines: elles sont décollées dans 1 ml d'une solution contenant 0,1% trypsine - 0,25% EDTA à 37°C pendant quelques minutes. Puis l'action de la trypsine est inhibée par addition de 5 ml de milieu complet. Les cellules sont dissociées par pipetages répétés; 0,5 ml de cette suspension cellulaire est dilué dans 10 ml de milieu et placé dans une nouvelle boîte de 75 cm² (Nunc). Le milieu de culture est changé tous les 3 jours environ.

NOM	ORIGINE	CIBLE	CONCENTRATION
Cycloheximide	Sigma	synthèse protéique	0,5 µg /ml (17,8 µM)
Génistéine	Sigma	tyrosine kinase	1-100 µM
Herbimycine A	Calbiochem	Src	25-100 nM
PP2	Calbiochem	Src	1-50 nM
PD98059	Calbiochem	MEK	1-100 µM
K-252a	Calbiochem	Trk A	5 nM
Wortmannin	Calbiochem	PI3-kinase	1-10 nM
Geldanamycine	Sigma	HSP90	2-50 nM

Tableau 7 : Liste des inhibiteurs utilisés. Leur provenance, leur cible, ainsi que les concentrations testées sur la prolifération cellulaire sont indiqués.

I.3/ Etude de la prolifération par comptage cellulaire

Chaque condition de culture est effectuée en triplicate. Les cellules sontensemencées dans 2 ml de milieu MEM avec 10% de SVF dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Greiner) à raison de 120000 cellules/boîte. Après 24 heures, les cellules sont rincées 2 heures dans du milieu de rinçage (même composition que le milieu de sevrage mais sans fibronectine ni transferrine), puis sevrées pendant 24 heures (milieu de sevrage: même composition de base que le milieu SVF, le SVF et l'insuline étant supprimés, et la transferrine (30 µg/ml, Sigma) et la fibronectine (2 µg/ml, Sigma) rajoutées). Elles sont alors traitées pendant 48 heures par les différents inhibiteurs répertoriés dans le tableau 7, en présence ou non du FGF-2 à 10 ng/ml (Amersham, France). Le nombre de cellules est déterminé par comptage sur la cellule de Malassez. Pour cela, les cellules sont rincées avec du PBS 1X (phosphate Buffer Saline) puis trypsinisées dans 500 µl de trypsine, mises quelques minutes à 37°C pour permettre le décollement, et 150 µl sont déposés sur une cellule de Malassez double. La survie des cellules a été appréciée d'une part par observation au microscope inversé à contraste de phase et d'autre part en utilisant le bleu trypan. Dans ce dernier cas, après avoir aspiré le milieu, les cellules sont traitées dans 100 µl de trypsine pendant 5 minutes puis 100 µl de bleu trypan (0,4%) sont alors ajoutés. Après 15 minutes à température ambiante, le comptage cellulaire est effectué à la cellule de Malassez et le pourcentage de viabilité des cellules est déterminé.

I.4/ Incorporation de ³H-thymidine

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de 24 puits (Nunc) à raison de 6000 cellules/puits dans 2 ml de milieu complet. Après trois jours de culture, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées et placées dans du milieu de sevrage. Après 24 heures de sevrage, les substances à tester sont ajoutées dans du milieu de sevrage contenant 10 ng/ml de FGF-2. Les cellules sont traitées pendant 24 heures. Dans les 4 dernières heures du traitement, 1 µCi de thymidine tritiée (activité spécifique: 4 Ci/mmol ; ICN) est ajouté dans chaque puits. Après ces 24 heures de traitement, le milieu est éliminé, les macromolécules sont précipitées par 500 µl d'acide trichloroacétique 5% (ATCA) pendant 30 minutes à 4°C. Après deux rinçages à l'eau, les cellules sont

solubilisées dans 500 µl de NaOH 0,1 N. Après une nuit à 4°C ou 2 heures à 37°C, 3 ml de liquide à scintillation (Beckman) sont ajoutés à chaque échantillon. Le comptage de la radioactivité est effectué à l'aide d'un compteur β (Beckman).

II- ETUDE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU FGF-2

II.1/ Préparation et extraction des protéines

II.1.1/ Protéines non marquées

Les cellules sontensemencées à 500.000 cellules/boîte, dans des boîtes de 100 mm de diamètre (Greiner) contenant 10 ml de milieu complet (MEM-SVF 10%). Après 48 heures, les cellules sont sevrées pendant 24 heures. Lorsque l'effet d'un inhibiteur doit être étudié, celui-ci est ajouté dans le milieu à une concentration déterminée (effet sur la prolifération déterminée par comptage cellulaire) 1 heure avant la stimulation par le FGF-2. Les cellules sont traitées au pervanadate 100 µM 10 minutes avant l'ajout du FGF-2. Le pervanadate, qui est un dérivé plus actif de l'orthovanadate, est préparé selon Trudel *et al.* (1991). Il est préparé au dernier moment en ajoutant 11,33 µl d'H₂O₂ dans 1 ml d'orthovanadate 10 mM (Sigma) dans du PBS. Le pervanadate 10 mM est agité pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et il est stable jusqu'à 2 heures après sa préparation. Après l'ajout du pervanadate dans le milieu de culture, les cellules sont mises en présence de FGF-2 pendant 10 minutes, puis lysées dans 150 µl de tampon de lyse IP (150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,1% SDS; 50 mM Tris pH 7,5) contenant un cocktail d'inhibiteurs (Phényl Méthyl SulfoFluoride, PMSF, orthovanadate et Na₂P₂O₇ (pyrophosphate de sodium) à 1 mM, leupeptine et aprotinine à 10 µg/ml, et pepstatine A à 1 µg/ml; Sigma). Après 15 minutes sur la glace, le lysat est récupéré et centrifugé (10.000 g, 3 minutes). Le surnageant est conservé à -20°C ou -80°C. La concentration en protéine de l'échantillon est déterminée en utilisant le dosage Biorad (Bio-Rad Protein Assay) et l'albumine bovine sérique (fraction V, Sigma) comme standard de la gamme-étalon.

Anticorps primaires	Source	Dilution pour le IB	volume / μg proteines pour l'IP	Origine
P-Tyr (PY99)	souris (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/2000	25 μl / 1 mg	Santa Cruz
FGFR	lapin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/2000	10 μl / 200 μg	UBI
Src	lapin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/2000	- (pour IB seulement)	Santa Cruz
ERK1/2	souris (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/2000	10 μl / 200 μg	Transd. Lab.
FRS2 (M-20)	chèvre (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/200	15 μl / 1 mg	Santa Cruz
cycline D2 (M-20)	lapin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1/1000	25 μl / 150 μg	Santa Cruz
HSP90 (SPA-830)	souris (0,9 mg/ml)	1/1000 PBST	10 μl / 1 mg	Stress Gen

Tableau 8 : Résumé des différents anticorps primaires utilisés. leur source, le fournisseur (origine), la dilution utilisée pour les immunodétections (IB) et le volume d'anticorps utilisé pour une quantité de protéine donnée (μg) pour réaliser l'immunoprécipitation (IP) sont indiqués. Transd. Lab, Transduction Laboratories.

	5%	7,5%	10%	12,5%	15%	4,5%
eau	10 ml	9 ml	7,5 ml	6 ml	4,5 ml	3,6 ml
A	3 ml	4,5 ml	6 ml	7,5 ml	9 ml	0,9 ml
B	4,5 ml	0				
C	0	0	0	0	0	1,5 ml
APS	70 μl	18 μl				
TEMED	10 μl					

Tableau 9 : Volumes des différentes solutions pour les gels SDS-PAGE de différentes réticulations. Solution A: 30% d'acrylamide; solution B: 1,5 M Tris pH 8,8 et 0,4% SDS; solution C: 0,5 M Tris pH 6,8 et 0,4% SDS.

II.1.2/ Protéines marquées au ³⁵Soufre

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre à raison de 500.000 cellules/boîte. Après 48 heures dans ce milieu, elles sont sevrées dans un milieu de sevrage ne contenant ni méthionine, ni cystéine (ICN) pendant 24 heures. La radioactivité ³⁵S (Trans ³⁵S-Label, 50 µCi/ml; activité spécifique: 1077 Ci/mmol; ICN) est ajoutée dans les six dernières heures du sevrage puis les cellules sont stimulées 10 minutes par le FGF-2. Après le traitement, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées une fois avec du PBS froid, et lysées par 150 µl de tampon de lyse IP. Après 15 minutes sur la glace, le lysat est récupéré, chauffé à 100°C pendant 10 minutes et 30 µl sont conservés pour les dosages de protéines et de la radioactivité. Le reste de l'échantillon est conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

II.2/ Immunoprécipitation

Une quantité comprise entre 250 µg et 1 mg de protéines est d'abord incubée avec 20 µl d'une solution de protéine A-agarose 10% (Sigma). Après agitation 1 heure à 4°C et centrifugation (10.000 g, 3 minutes), le surnageant est incubé avec l'anticorps spécifique, pendant une heure à 4°C (voir tableau 8 pour les volumes); 50 µl (pour 1 mg de protéines) de la solution protéine A-agarose 10% sont ensuite ajoutés et l'ensemble est incubé pendant une heure à 4°C. Les échantillons sont alors centrifugés (10.000 g, 3 minutes). Le culot de protéines est rincé trois fois dans 400 µl de tampon de lyse puis chauffé à 100°C dans 100 µl de tampon de Laemmli (10 mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 1% β-mercaptoéthanol et 20% glycérol) pendant 5 minutes. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à la SDS-PAGE.

II.3/ Séparation des protéines par SDS-PAGE et transfert sur membrane

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été réalisée dans les conditions dénaturantes de Laemmli. Les gels de séparation sont des gels de 10% ou 12,5% d'acrylamide, selon les expériences. Le gel de concentration est un gel de 4,5% d'acrylamide. Après dégazage du mélange des solutions A (30% d'acrylamide), B (1,5 M Tris pH 8,8 + 0,4% SDS) ou C (0,5 M Tris pH

Anticorps secondaires	Dilution	Origine
anti-Ig souris conjuguées à la peroxidase (HRP-anti mouse)	1/1000 au 1/5000	Trans. Lab.
anti-Ig lapin conjuguées à la biotine	1/1000 au 1/5000	Sigma
anti-Ig chèvre conjuguées à la biotine	1/1000 au 1/5000	Sigma
complexe extravidine-peroxidase	1/1000 au 1/5000	Sigma

Tableau 10 : Résumé des différents anticorps secondaires utilisés. La concentration au 1/5000^e est utilisée après les anticorps primaires PY99, anti-FGFR et anti-ERK1/2. La concentration au 1/1000^e est utilisée après les anticorps anti-FRS2, anti-cycline D2, et anti-HSP90. La concentration du complexe extravidine-peroxydase est la même que celle utilisée pour l'anticorps secondaire proprement dit. (Ig, immunoglobuline; Transd. Lab., Transduction Laboratories).

6,8 + 0,4% SDS) avec l'eau ultra-pure, selon les volumes indiqués dans le tableau 9, l'ammonium persulfate à 10% (APS) et le N, N, N', N'-tetraméthyl-éthylènediamine (TEMED) sont rajoutés et les gels sont coulés. Une fois les échantillons déposés dans les puits, la migration se fait à 200 V pour le mini-système Biorad (gels de 8 x 5 cm), et en ampérage constant (5 à 15 mA par gel) pour le système des gels 10 x 12 cm (Touzart & Matignon).

Après la migration des protéines en gel d'électrophorèse, leur transfert sur membrane est réalisé en conditions semi-sèches à l'aide d'un appareil Millipore (Graphite Electrobloetter System). Le gel et la membrane sont équilibrés pendant 5 minutes dans le tampon cathode (0,3 M Tris, 10% méthanol) et le tampon anode (40 mM acide 6-amino-n-hexanoïque, 10% méthanol) respectivement. La membrane est alors déposée sur trois feuilles de papier Whatman n°3 imbibées dans le tampon anode, puis le gel et trois autres feuilles de papier Whatman n°3 imbibées dans le tampon cathode sont posés au-dessus. Le transfert est réalisé pendant 45 min. à 1 heure à 200 mA.

II.4/ Immunodétection des protéines

La saturation des sites non spécifiques est effectuée dans du TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM) contenant 0,1% de Tween 20 (TBST) et 3% de BSA (fraction V, Sigma) pour l'anti-phosphotyrosine PY99 ou 5% de lait écrémé en poudre pour tous les autres anticorps, pendant 1 à 2 heures à température ambiante. La membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage (cf tableau 8 pour les dilutions). La membrane est ensuite lavée six fois pendant 5 minutes dans du TBST puis elle est incubée pendant 1h30 heure à température ambiante avec le second anticorps approprié dilué dans le TBST au 1/5000^e (cf tableau 10). La membrane est rincée 5 fois 10 minutes, avant d'être soumise à la chimioluminescence (Amersham) en optimisant le temps d'exposition afin de ne pas saturer le film (Kodak X-Omat AR, Sigma). Pour l'anticorps HSP-90, le TBST est remplacé par du PBST.

II.5/ Dosage de l'activité kinasique de Src

Les protéines des cellules MCF-7 stimulées ou non par le FGF-2 (10 ng/ml) et lysées comme décrit dans le paragraphe II-1.1 sont immunoprécipitées dans le tampon de lyse IP avec

l'anticorps monoclonal anti-Src 327 (LaVallee et al, 1998). Les complexes Src/anticorps sont lavés trois fois dans le tampon de lyse IP et une fois avec le tampon "kinase" (30 mM Tris pH 7,4; 10 mM MnCl₂), puis sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante dans 50 µl de tampon kinase contenant 10 µCi de (γ-³²P-)ATP (activité spécifique: 3000Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Angleterre) et 2 µg du substrat, l'énolase acide dénaturée (Sigma). La réaction est arrêtée par l'ajout de tampon Laemmli, et après 5 minutes à 95°C, les protéines phosphorylées sont séparées par SDS-PAGE (gel de 7,5%), transférées sur membrane de nitrocellulose, et visualisées par autoradiographie. L'immunodétection de Src est aussi réalisée comme décrit ci-dessus avec l'anticorps anti-Src indiqué dans le tableau 8.

III-ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

III.1/ Préparation des échantillons

III.1.1/ Protéines non marquées

Les cellules sontensemencées à 500.000 cellules/boîte, dans des boîtes de 100 mm de diamètre (Greiner) contenant 10 ml de milieu complet (MEM-SVF 10%). Après 48 heures, les cellules sont sevrées pendant 24 heures. Pour lyser les cellules, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées 2 fois par du PBS froid, puis 150 à 200 µl de tampon de lyse 2D (0,3% SDS et 1% 2-β mercaptoéthanol) sont répartis dans la boîte. Après 15 minutes sur la glace, le lysat est récupéré, chauffé 5 minutes à 100°C puis centrifugé (10.000 g, 3 minutes). Le surnageant est conservé à -20°C ou -80°C. La concentration protéique de l'échantillon est déterminée en utilisant le dosage Biorad (Bio-Rad Protein Assay) et l'albumine bovine sérique (BSA, fraction V, Sigma) comme standard de la gamme-étalon.

III.1.2/ Protéines marquées au ³⁵Soufre

Les cellules sontensemencées dans du milieu complet à 150.000 cellules par boîte dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Après 24 heures dans ce milieu, elles sont sevrées dans un

milieu de sevrage ne contenant ni méthionine, ni cystéine (ICN) pendant 24 heures. Le milieu est alors changé, et le FGF-2 (10 ng/ml) et la radioactivité (50 μ Ci/ml 35 S-Translabelé; activité spécifique: 1077 Ci/mmol ; ICN) sont ajoutés simultanément. Après 12 heures, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées une fois avec du PBS froid, et lysées par 100 μ l de tampon de lyse 2D. Après 15 minutes sur la glace, le lysat est récupéré, chauffé à 100°C pendant 5 minutes et 30 μ l sont conservés pour les dosages des protéines et de la radioactivité. Le reste de l'échantillon est conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

III.1.3/ Dosage de la radioactivité d'un échantillon protéique

Pour le dosage à l'acide trichloro-acétique (ATCA), 50 μ l de BSA à 1 mg/ml sont déposés au fond d'un tube en verre de 10 ml froid auxquels sont ajoutés 5 μ l de l'échantillon radioactif. Le mélange est vortexé, puis 5 ml d'ATCA 10% froid sont ajoutés. Après avoir été mis 30 minutes dans la glace, les tubes sont chauffés à 100°C pendant 30 minutes. La radioactivité précipitable est ensuite filtrée sur fibre de verre. Le filtre est rincé 3 fois par de l'ATCA 5% puis récupéré et placé dans un tube avec 3 ml de liquide à scintillation. Après avoir laissé reposer pendant 15 à 30 minutes, la radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur β .

III.2/ Electrophorèse bidimensionnelle analytique

Les électrophorèses bidimensionnelles ont été réalisées à l'aide du système "Investigator" de Millipore. L'ensemble des réactifs utilisés provient de la société Genomics Solution. Les poids moléculaires et points isoélectriques ont été déterminés par emploi de standards pour électrophorèse bidimensionnelle (Biorad). Avant la première dimension, les lysats protéiques radioactifs ou non, préparés comme indiqué ci-dessus, sont dilués de moitié dans le tampon d'isoélectrofocalisation (IEF) contenant 9,5 M urée; 0,8% Nonidet P40 (NP40); 10% β -mercapto-éthanol; 2% d'ampholytes pH 4-8 et 3-10; bleu de bromophénol.

III.2.1/ Première dimension: Isoélectrofocalisation (IEF)

Un aliquot de 5,6 ml de gel d'IEF (urée 9,5 M, acrylamide 3%, N,N' méthylène-bis-acrylamide 0,22%, NP40 4%) est décongelé à 30°C. 200 µl de chaque ampholyte (4-8 et 3-10) sont ajoutés et le mélange est dégazé pendant 3 à 4 minutes. 40 µl d'APS 10% préparé le jour même sont ajoutés, puis les six tubes capillaires (de 20 cm de long et 1 mm de diamètre) sont plongés dans la solution de gel IEF. En plongeant l'ensemble dans l'eau, le gel monte par capillarité jusqu'à environ 4 cm du haut du tube IEF. Après 2 heures de polymérisation, les tubes IEF sont séparés les uns des autres et placés dans la cuve de migration de la première dimension. La partie inférieure de la cuve contient le tampon anode (1,4 ml d'H₃PO₄ 85% dans 2 litres d'eau ultrapure) et la partie supérieure le tampon cathode (7 ml NaOH 10N dans 693 ml d'eau ultrapure) préalablement dégazé pendant 10 minutes. La préfocalisation est lancée avec les paramètres suivants (pour 6 gels): 1500 Volts, 110 µA, pendant 2 heures.

Pour l'isoélectrofocalisation, un volume maximal de 50 µl, ou un volume d'échantillon correspondant à 10⁶ cpm (coups par minute) de ³⁵S pour les échantillons radioactifs est déposé à la surface de chaque gel d'IEF. La migration se fait à 2000 V pendant 17 h 30, à 110 µA et 20000 Volt-Heure. Une fois l'isoélectrofocalisation terminée, les gels sont posés pendant 1 heure sur un lit de glace, puis chaque gel est sorti du tube par pression d'eau à l'aide d'une seringue, et placé dans 10 ml de tampon d'équilibration (0,3 M Tris base; 0,075 M Tris HCl; 3% SDS; 50mM DiThioThréitol ou DTT; 0,01% bleu de bromophénol) pendant deux fois 2 minutes à température ambiante avant dépôt sur le gel SDS-PAGE.

III.2.2/ Deuxième dimension : SDS-PAGE

Des gels (25 x 25 cm) à 10% d'acrylamide sont coulés: 165,2 ml de Duracryl (30% acrylamide et 0,8% Bis-acrylamide), 122,8 ml de tampon Tris (1,5 M Tris pH 8,8) sont mélangés avec 204 ml d'eau ultra pure. Après dégazage du mélange pendant quelques minutes, 5 ml de SDS 10%, puis 1,24 ml d'APS 10% et 210 µl de TEMED sont ajoutés pour initier la polymérisation. Le gel est coulé entre les plaques et le haut de chaque gel est recouvert d'isobutanol saturé en eau afin d'éviter le séchage de la surface des gels. Après 2 heures de polymérisation, le gel

d'isoélectrofocalisation préalablement équilibré est placé à la surface du gel de deuxième dimension. Le système est placé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration (25 mM Tris base; 192 mM glycine; 0,1% SDS). La partie supérieure de la cuve contient du tampon de migration 2X. La migration se fait à 500 V pendant 5 heures, avec une température contrôlée de 17-20°C. A l'issue de l'électrophorèse, les gels sont colorés au nitrate d'argent.

III.2.3/ Coloration au nitrate d'argent

Les gels sont laissés toute la nuit dans le bain de fixation (50% méthanol, 10% acide acétique, 40% eau ultrapure). Ils sont ensuite lavés trois fois 30 minutes dans de l'eau ultrapure, placés de nouveau 30 minutes dans une solution de DTT (2,5 mg/litre) puis laissés au moins 1h30 dans une solution de nitrate d'argent (3 g/litre). Après ce bain, deux rinçages rapides dans l'eau ultrapure de 2 minutes sont faits, et la coloration des gels se développe dans la solution de carbonate de sodium (34,72 g de carbonate de sodium/litre et 2,25 ml formaldéhyde/litre) : un rinçage de quelques secondes est fait dans cette solution afin d'éliminer l'excès de nitrate d'argent, puis les gels sont laissés quelques minutes dans ce bain. La coloration apparaît progressivement, et est arrêtée par une solution d'acide acétique à 3% (v/v). Après avoir été rincés dans l'eau, les gels sont conservés sous plastique, ou sont séchés et soumis à l'autoradiographie s'il s'agit de gels radioactifs marqués à la ³⁵S-méthionine.(films Kodak, X-OMAT AR).

III.2.4/ Analyse informatisée

Elle est réalisée après digitalisation (scanner SM3, Pharmacia) des autoradiogrammes ou des gels pilotée par le programme "Diversity One" (Pharmacia) installé sur station SUN (Sparc Classic). Les images obtenues sont ensuite analysées, sur la même station, avec le programme "Mélanie II" (Biorad). L'intensité des tâches détectées est exprimée (densité optique par unité de surface et peut être convertie en pourcentage de l'intensité totale correspondant à l'ensemble des tâches. L'analyse simultanée de plusieurs gels par situation expérimentale permet de comparer les différences entre les deux situations étudiées (stimulation ou non par le FGF-2).

III.3/ Electrophorèse bidimensionnelle préparative

III.3.1/ Première dimension: Isoélectrofocalisation (IEF)

Un aliquot de 22,2 ml de gel d'IEF (8M urée, 4,4% duracryl, 5mM 3-((3-cholamidopropyl)diméthylammonio)-1-propane-sulfonate ou CHAPS, 2% Nonidet P40) est décongelé à 30°C. Un volume de 1,4 ml de chaque ampholyte (4-8 et 3-10) est ajouté et le mélange est dégazé pendant 3 à 4 minutes. 37 µl de TEMED et 78 µl d'APS 10% préparé le jour même sont ajoutés, puis les huit tubes IEF (de 20 cm de long et 5 mm de diamètre) sont plongés dans la solution de gel IEF. En plongeant l'ensemble dans l'eau, le gel monte par capillarité jusqu'à environ 4 cm du haut du tube IEF. Après trois heures de polymérisation, les tubes IEF sont séparés les uns des autres et placés dans la cuve de migration de la première dimension. La composition des tampons est la même que pour la 2D analytique. La préfocalisation est lancée avec les paramètres suivants (pour 8 gels): 1000 Volts, 500 µA, pendant 5 heures.

Pour l'isoélectrofocalisation, un volume maximal de 500 µl (500 µg à 1 mg de protéines) est déposé à la surface des gels IEF. Le tampon de cathode est remplacé par du tampon frais et l'IEF est lancée avec les paramètres suivants: 1500 V, 17 h 30, 500 µA, 20000 V-H. Lorsqu'elle est terminée, les tubes d'IEF sont déposés sur la glace pendant une heure, démoulés et équilibrés deux fois 15 minutes dans 10 ml de tampon d'équilibration (même composition que pour l'IEF analytique).

III.3.2/ Deuxième dimension : SDS-PAGE

Pour l'électrophorèse préparative, un gel de concentration est nécessaire pour une meilleure résolution. En premier lieu, le gel de séparation de 10% est coulé entre les plaques, jusqu'à environ 4 cm du haut des plaques. Sa composition est identique à celle utilisée pour l'électrophorèse analytique. La préparation des gels de concentration de 4% est la suivante: 61 ml d'eau ultrapure, 13,3 ml de solution d'acrylamide (30% BIS; 0,8% T) et 25 ml de tampon "Tris stacking gel" (Tris-HCl 0,48 M, Tris-Base 14 mM) sont mélangés et dégazés pendant 10 minutes. Puis 1 ml de SDS 10%, 100 µl de TEMED et 500 µl d'APS 10% sont ajoutés à cette solution qui est ensuite déposée à la surface des gels de séparation et recouverte d'un peu d'eau afin d'éviter le

déssèchement pendant la polymérisation. Les gels polymérisés sont placés dans la cuve d'électrophorèse, la partie inférieure contenant le tampon de migration 1X. Pour le dépôt des gels d'IEF, 10 ml d'agarose 1% sont préalablement versés à la surface du gel SDS-PAGE puis le gel IEF équilibré est délicatement déposé à la surface du gel SDS-PAGE. De l'agarose 1% est remis au dessus du gel de première dimension de manière à le recouvrir. Une fois l'agarose durci, le tampon de migration 2X est versé dans la cuve supérieure et le programme de la deuxième dimension est lancé: 500 V, 20000 V-H pendant environ 5 heures.

III.3.3/ Coloration au bleu de coomassie

Après la migration, les gels sont placés de deux heures à toute la nuit dans la solution de coloration (0,25% bleu de coomassie R-250, 50% méthanol et 10% acide acétique dans de l'eau ultrapure), puis ils sont décolorés dans des bains successifs de la solution de décoloration (25% méthanol, 7% acide acétique) jusqu'à obtenir le fond du gel le plus clair possible.

IV- CARACTERISATION DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Les gels contenant les protéines d'intérêt séparées par électrophorèse mono- (bande) ou bi-dimensionnelle (spot) sont d'abord découpés, rincés de nombreuses fois dans de l'eau ultrapure et soumis à la digestion trypsique. Le mélange peptidique ainsi obtenu est analysé en spectrométrie de masse. Les réactifs utilisés sont tous ultra purs (grade Sigma Ultra).

IV.1/ Réduction et alkylolation

Cette étape est réalisée au préalable pour les protéines colorées au nitrate d'argent. En réduisant et alkylant les résidus cystéine de la protéine, elle permet de "dérouler" davantage la protéine, afin d'augmenter les chances de coupure au niveau des résidus lysine (K) et arginine (R) par la trypsine. Ce protocole a été établi par Shevchenko et al (1996).

Les spots découpés sont déshydratés par deux bains de 20 minutes dans une solution de 50% acétonitrile (ACN) / 50% H₂O, puis un bain dans 100% ACN. Ils sont ensuite complètement séchés dans un speed-vac (SAVANT). Pour l'étape de réduction, les spots sont recouverts par une solution de 10 mM DTT (Sigma) dans 100 mM NH₄HCO₃ et chauffés à 56°C pendant 1 heure. Une fois refroidie, la solution est remplacée par une solution de 55 mM d'iodoacétamide (Sigma) dans 100 mM NH₄HCO₃. Cette étape d'alkylation est réalisée dans l'obscurité et à température ambiante pendant 45 minutes. Les spots sont ensuite lavés par des bains successifs dans 100 mM NH₄HCO₃ puis 100% ACN, deux fois pendant 10 minutes. Pour terminer, ils sont séchés au speed-vac.

IV.2/ Digestion enzymatique

Les spots colorés au bleu de coomassie sont préalablement déshydratés et décolorés par trois bains de 20 minutes chacun, réalisés à température ambiante et sous agitation dans une solution contenant 50 % ACN / 50% 100 mM NH₄HCO₃ puis séchés au speed-vac. Comme les spots colorés à l'argent et séchés, ils sont ensuite disposés sur un parafilm. Une solution de trypsine à 0,1 µg/µl (*sequencing grade modified trypsin*, Promega) est préparée. Sur chaque spot sont déposés successivement les solutions de NH₄HCO₃ (100 mM), de tampon de trypsine fourni avec la trypsine, puis environ 0,5 µg de trypsine. Le gel regonflé est remis dans un tube Eppendorf, recouvert complètement par de l'eau, et incubé à 37°C toute la nuit.

L'extraction des peptides issus de la digestion trypsique "in gel" se fait de la manière suivante. La solution qui recouvre le gel est récupérée dans un petit tube Eppendorf et le gel est recouvert par le mélange 45% ACN/45% H₂O/10% acide formique, sous agitation pendant 20 minutes. Cette fraction est collectée et rassemblée avec la précédente dans le tube Eppendorf. Cette extraction est répétée une fois dans le même tampon, puis une seconde fois dans une solution contenant 95% ACN/5% acide formique pour extraire les peptides les plus hydrophobes. Le pool de peptides provenant de ces extractions est séché au speed-vac, puis conservé à -20°C jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse.

IV.3/ Micropurifications des hydrolysats tryptiques

Ce protocole a été établi par Kussman *et al.* (1997) et optimisé par X. Czeszak au cours de son DEA. Il procède par dessalage de l'échantillon peptidique sur une colonne chromatographique de phase inverse. En effet, les contaminants salins qui empêchent la bonne cristallisation de l'échantillon peptidique avec la matrice, ne se fixent pas sur les microbilles, contrairement aux peptides qui sont plus hydrophobes.

L'étirement d'un cône "gel loader tip" (Eppendorf) est réalisé à l'aide d'une pince plate pour obtenir un diamètre de sortie inférieur à 50 µm. Un volume de 50 µl de méthanol est déposé dans le cône avant le dépôt de 2 à 3 µl de phase Poros 50 R2 (Self Pack, Boeringher Mannheim) en suspension dans du méthanol. Le montage de la colonne chromatographique s'effectue alors soit sur une seringue combitip (Eppendorf) de 1,25 ml par pression sur le piston de la seringue, soit sous flux d'azote. La colonne est équilibrée par passage d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% dans l'eau. On peut alors y déposer les peptides, issus de la digestion tryptique, remis en solution dans de l'acide formique à 1% dans l'eau. Un passage très lent de cette solution peptidique assure une fixation optimale des peptides sur la colonne. Le dessalage se fait par 4-5 passages d'acide formique à 1% dans l'eau, et enfin, l'élution des peptides est réalisée par une solution de 50% eau/50% méthanol à 1% d'acide formique.

IV.4/ Spectrométrie de masse en mode Désorption/Ionisation laser assistée par Matrice (MALDI-MS)

Les échantillons peptidiques sont resuspendus dans 10 µl d'une solution 50% méthanol / 50% H₂O contenant 1% acide formique. Un volume de 0,5 à 1 µl est alors mélangé directement sur la cible avec 1 µl de la solution de matrice constituée d'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB), préparée à une concentration de 10 mg/ml dans un mélange de 70% méthanol/30% H₂O. La cristallisation du spot sur la cible se fait par séchage de la gouttelette sous un petit ventilateur. Lorsque les spots sont cristallisés et secs, la cible est introduite dans le spectromètre de masse.

Les mesures de masse moléculaire par MALDI-MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse à temps de vol de type Vision 2000 (Finnigan, Bremen). Cet instrument est équipé d'un

réflectron et d'un laser à azote pulsé (337 nm de longueur d'onde ; durée du pulse: 3 nsec). Les ions sont accélérés par un potentiel électrique de 6 kV. Entre 30 à 50 tirs de laser sont accumulés pour obtenir le spectre de masse final. La masse des peptides est mesurée après un lissage du spectre et une calibration interne en utilisant la masse moyenne de deux peptides issus de l'autolyse de la trypsine de rapport m/z égal à 843,014 et 2212,425.

IV.5/ Spectrométrie de masse en tandem en mode nanospray (nanospray MS-MS)

Ces mesures ont été réalisées sur un spectromètre de masse électrospray triple-quadripôles (Micromass, Manchester) dont la sonde nanospray a été modifiée. Les capillaires en verre borosilicaté (Kwik-Fil, World Precision Industry) utilisés sont préparés à l'aide d'une étireuse de capillaire (pipette puller PIP5, Heka), et après étirement, ils présentent un diamètre interne de 580 à 680 μm .

Les peptides sont repris dans 10 μl d'une solution de 50% méthanol/50% H_2O contenant 1% d'acide acétique. Cette solution est introduite dans un capillaire en verre puis soumise à une tension comprise entre 1,2 et 1,5 kV dans une source portée à 30 °C. La tension est appliquée grâce à un filament métallique plongé dans la solution de peptides. Les études de spectrométrie de masse en tandem ont été conduites par sélection des ions précurseurs dans une fenêtre de 3 daltons et dissociés par collision avec des atomes d'argon à une énergie de 10 à 20 eV.

IV.6/ Recherche dans les banques de données

Celle-ci est effectuée en utilisant le site internet MS-Fit dont voici l'adresse: (<http://www.prospector.ucsf.edu/htmlucs3.0/msfit.htm>). La banque de données Swiss-Prot est la plus couramment utilisée pour la recherche des protéines à identifier. Après avoir soumis la masse moyenne de chaque pic du spectre de masse MALDI et du spectre de masse en tandem obtenus, la masse moléculaire de la protéine à +/- 20% et son point isoélectrique à +/- 1 à 2 unités de pH (informations provenant du gel 2D), la recherche est lancée. Les candidats apparaissent en ordre de préférence, le premier étant celui pour lequel un nombre maximum de masses peptidiques soumise correspondent aux masses des peptides théoriques d'une même protéine. Pour les

données de la séquence peptidique obtenue par MS-MS, la recherche est effectuée sur le site PeptideSearch (<http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/PeptideSearchIntro.html>) ou MS-Tag (<http://prospector.icsf.edu/ucsfhtml3.2/mstagfd.htm>) et permet dans certains cas de confirmer l'identité de la protéine.

RESULTATS

ARTICLE 1

I/ ARTICLE 1**« PROTEOMIC ANALYSIS REVEALS THAT 14-3-3 SIGMA IS
DOWNREGULATED IN HUMAN BREAST CANCER CELLS »**

Nous avons développé l'analyse protéomique au laboratoire dans le but d'étudier la signalisation intracellulaire du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein MCF-7. Cette technologie est basée sur la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle hautement résolutive et l'analyse informatisée des gels, la digestion trypsique des protéines d'intérêt et leur identification par spectrométrie de masse grâce à l'obtention d'une empreinte peptidique (MALDI-TOF) et/ou d'une séquence en acides aminés de la protéine (MS/MS). Nous avons donc mis au point cette technologie en travaillant sur des échantillons protéiques issus de lignées cellulaires cancéreuses (MCF-7 et MDA-MB-231) et de cellules épithéliales normales de sein, caractérisant et cartographiant ainsi les protéines majeures des cellules épithéliales mammaires, normales et cancéreuses. Nos résultats regroupés dans la publication qui suit ont notamment mis en évidence une différence majeure d'expression de la protéine 14-3-3 sigma entre les cellules normales et cancéreuses, ce qui nous a amené à étudier l'expression de cette protéine dans un panel d'échantillons de tumeurs primaires mammaires.

Cet article est en révision dans la revue *Cancer Research*.

Proteomic Analysis Reveals that 14-3-3 sigma is Downregulated in Human Breast Cancer Cells

**Anne-Sophie Vercoutter-Edouart^a, Jérôme Lemoine^b, Xuefen Le Bourhis^a,
Hornez Louis^c, Bénoni Boilly^a, Victor Nurcombe^d, Françoise Révillion^c, Jean-
Philippe Peyrat^c, and Hubert Hondermarck^{a*}**

^aEquipe Facteurs de Croissance, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES-EA 1033; Villeneuve d'Ascq, France; ^bLaboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France; ^c Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre de Lutte Contre le Cancer, Lille, France; ^d Dept. of Anatomical Sciences, University of Queensland, Australia 4072

The first two authors contributed equally to this work.

* Correspondence to: H. Hondermarck, UPRES-EA 1033 de Biologie du Développement, bâtiment SN3, Université de Lille1, 59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel (33) 3 20 43 40 97. Fax : (33) 3 20 43 40 38. Email : Hubert.Hondermarck@univ-lille1.fr

The abbreviations used are : 2-DE, two-dimensional electrophoresis; ACN, acetonitrile; DTT, dithiothreitol; IEF, isoelectric focusing; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight; NBEC, normal breast epithelial cells; MAP-kinase, mitogen-activated protein kinase; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SUMMARY

The class of molecular chaperones known as 14-3-3 is involved in the control of cellular growth by virtue of its apparent regulation of various signaling pathways, including the Raf / mitogen-activated protein kinase pathway. In breast cancer cells, the sigma form of 14-3-3 has been shown to interact with cyclin-dependent kinases and control the rate of entry into mitosis. In order to test for a direct role for 14-3-3 in breast epithelial cell neoplasia, we have quantitated 14-3-3 protein levels using a proteomic approach based on 2-D electrophoresis and matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry (MALDI-TOF). We show here that 14-3-3 sigma protein is strongly downregulated in the prototypic breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and in primary breast carcinomas as compared to normal breast epithelial cells. In contrast, levels of the alpha, beta, delta or zeta isoforms of 14-3-3 were the same in both normal and transformed cells. The data support the idea that 14-3-3 sigma is involved in the neoplastic transition of breast epithelial cells by virtue of its role as a tumor suppressor; as such it may constitute a robust marker with clinical efficacy for this pathology.

Keywords : 14-3-3 proteins / proteomic analysis / breast cancer / marker

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the leading causes of death among women, and the identification of new markers to discriminate tumorigenic from normal cells, as well as the different stages of this pathology, is of critical importance. The chaperone proteins designated 14-3-3 are a class of highly conserved proteins of 25- to 30-kDa expressed in all eukaryotic cells; they help to regulate signal transduction pathways controlling proliferation, differentiation and survival (1). They associate directly or indirectly with proliferative signal transducing proteins such as PKC, MEK kinases, PI3-kinase and Raf. Raf-1 activation by 14-3-3 can lead to either cell cycle arrest or cell proliferation (1, 2, 3). They are able to inhibit Cdc25c, so controlling the entry of human cells into mitosis (4). The sigma form of 14-3-3 seems to play a particular role in the control of such kinetics because its overexpression causes cell cycle arrest (5). Most importantly, it has recently been shown that gene expression of 14-3-3 sigma is silenced in breast cancer cells (6) and that transfection of breast cancer cells with 14-3-3 sigma inhibits cyclin-dependent kinase activity, and thus cell cycle progression (7), suggesting involvement of 14-3-3 sigma in breast tumorigenesis. However, there is as yet no clear data that shows that 14-3-3 protein levels correlate directly with breast cell transformation. Here we have employed a proteomic approach to rigorously test the hypothesis that levels of 14-3-3 protein correlate with breast epithelial cell tumorigenesis and may thus constitute a robust new marker for its prognosis. Our results demonstrate that 14-3-3 sigma protein level may indeed constitute such a marker, and should be tested for clinical efficacy.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell cultures, tissues, metabolic labeling and sample preparation. Normal human breast epithelial cells (NBEC) were established as described previously (8) from reduction mammary glands (generous gift from Dr Pellerin, Medical University of Lille, France). MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell line maintenance, metabolic labeling and sample preparation were as previously described (9): briefly, pre-confluent cells were labeled for 12 h with Trans ^{35}S -label (ICN Biomedicals, Belgium) at 50 $\mu\text{Ci/ml}$. For non-labeled protein preparations, cells were plated onto 100-mm dishes (Costar, France) at 500,000 cells per 10 ml of complete medium and were starved for 24 h in serum-free medium when they reached pre-confluence. After labeling, medium was removed and the cells rinsed in ice-cold PBS. Cells were lysed on ice with lysis buffer (0.3% SDS and 1% 2 β -mercaptoethanol), centrifuged (2 min at 10,000 x g), and the supernatant diluted 1:2 with IEF buffer (9.5% (w/v) urea, 0.8% Nonidet P-40, 10% 2 β -mercaptoethanol, 2% 3-10 and 4-8 ampholines and bromophenol blue). The samples were snap frozen and stored at -80°C . Primary breast tumor tissues were obtained immediately after surgical resection at the Centre Oscar Lambret of Lille (France) and stored frozen at -80°C . About 1 mg of tissue was homogenized in five volumes of buffer (Tris 0.02 M, EDTA 3 mM, Na_2MoO_4 10 mM and 1 mM DTT at pH 7.4). The samples were centrifuged at 400 x g for 10 min at 4°C , and the supernatant was diluted 1:2 with IEF buffer. The concentration of proteins was determined using the Biorad assay (Biorad, France).

2D electrophoresis. 2-DE were performed as previously described (9) with the Investigator 2-D Electrophoresis System from Millipore (France); all reagents were purchased from Oxford Glycosystems (England). 10 - 30 μl of sample (containing 10^6 cpm for labeled proteins, or 50 μg proteins for non-labeled samples) was separated by isoelectric focusing (IEF) in rod gels containing 2% pH 4-8 and 2% pH 3-10 carrier ampholytes. The separation was performed at 20,000 V / hr over 17.5 h. After IEF, the strips were equilibrated twice for 2 min in 0.3 M Tris Base, 0.075 M Tris HCl, pH 9.0, 3% SDS, 50 mM DTT and 0.01% bromophenol blue. The second dimensional separation was done using 10% SDS-PAGE for 5 h at 20,000 mW. After 2-DE, the proteins were detected by silver -staining and the gels dried and autoradiographed (X-

Omat AR Kodak, Sigma). For preparative 2D electrophoresis, 0.5 to 1 mg of protein were separated by IEF as described above. The gels were then equilibrated twice for 20 min in the equilibration buffer. After the second dimension, the gels were stained in 0.2% (w / v) Coomassie blue in 50% methanol and 10% acetic acid.

Computer analysis. Both gels and autoradiographs were scanned (scanner SM3, Pharmacia) using the Diversity One program (Pharmacia) and analyzed using the MELANIE II program (BIORAD) on a SUN-SPARC station. Molecular masses and pI were determined after comparison with reference gels in the SWISS-2DPAGE (Expasy) database (<http://expasy.hcuge.ch/ch2d/ch2d-top.html>).

Protein identification by MALDI-TOF. Protein identification was performed as described (10,11) with modification. Spots were cut out from the gel and washed three times with 400 μ l of a 125 mM ammonium carbonate/acetonitrile (ACN) 1:1 (v/v) solution for 20 min with shaking. The wash solution was discarded and the pieces were dried at room temperature for 2 h. Enzymatic cleavage was initiated by re-swelling the gel in ammonium carbonate solution (125 mM), whereupon 50 mM acetic acid was added and the digestion finally initiated by adding 50 mM acetic acid containing 7-7.5 units of trypsin (Promega, France). After absorption of the protease solution, aliquots (5 μ l) of pure water were added sequentially. The gel slices were placed in an Eppendorf tube and a minimum volume of water was added to totally immerse the gel pieces. The digestion was carried for 12-16 h at 37 °C. The liquid was collected and the resulting peptides recovered after two extractions with a solution containing 45% acetonitrile / 10% formic acid. To recover very hydrophobic peptides, a third extraction with 95% acetonitrile / 5% formic acid was performed. The extract was finally dried using a Speed Vac-concentrator (Savant).

MALDI-TOF analysis of trypsin digests WAS performed on a Vision 2000 (Finnigan, Bremen) reflector instrument in positive ion mode at an accelerating voltage of 6 kV. Peptides were resuspended in CH₃CN/H₂O (1:1) containing 0.5% formic acid of which 0.5 μ l was mixed directly onto the target with 1 μ l of 2,5 dihydroxy benzoic acid matrix solution (10 mg/ml in

CH₃OH/H₂O, 7:3). Between 30 to 50 laser shots were accumulated to obtain a final spectrum. Mass measurements were then made after peak smoothing and internal calibration using the average mass of the two autolysis trypsin fragment ions at m/z 843.014 and 2212.425, resulting in mass accuracy better than 0.3 Dalton. Protein sequence database searching was performed using MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/htmlucsf3.0/msfit.htm>) using the average molecular weight of [M+H]⁺ peptide ions.

RESULTS

Proteomic determination of breast proteins. A proteomic approach was employed in order to examine the levels of protein expression of the different forms of 14-3-3 in normal and tumorigenic breast epithelial cells. Figure 1 illustrates the 2-DE separation of ^{35}S -labeled proteins from primary culture of normal breast epithelial cells. More than 1,000 polypeptides were detected on autoradiograms and localized between pI 4-8 and molecular mass range 20-200 kDa. Computer analysis of the autoradiograms allowed determination of molecular masses and isoelectric point after comparison with standard 2-DE gels of the Swiss-2DPAGE database. In total, we were able to identify 50 spots (corresponding to 35 different proteins) in 2-DE gels using MALDI-TOF analysis: the positions of some of the identified proteins are shown in Figure 1. All identified spots can be considered as abundant proteins as they are detectable with Coomassie blue. For each identified protein, more than 70% of the trypsin generated fragments matched with theoretical masses. For example, in case of annexin III, 14 fragments were generated by trypsin digestion and the mass of 8 of them matched with the theoretical masses obtained for annexin III tryptic fragments in sequence database. Some of these proteins, such as the cytoskeletal elements actin, alpha-actinin, β -tubulin, vimentin and tropomyosins, have already been described in breast cancer cells. Some signal-related proteins (annexins, numatrin, rho GDI) were also detected.

Characterization and quantification of the 14-3-3 proteins. The spots corresponding to the expected positions for 14-3-3 (between 15 - 35 kDa, and pH 4-5), not been previously reported for breast epithelial cells, were also isolated and then subjected to trypsin digestion and MALDI-TOF. Several members of the 14-3-3 protein family were identified. The MALDI-TOF spectra obtained after trypsin digestion are shown in Figure 2 and allow the characterization of alpha/beta, delta/zeta and sigma forms. The masses of the tryptic fragments of 14-3-3 sigma that were used for the identification are reported in Table 1. After database searching, matching masses represent more than 70% of the fragment masses obtained, with a difference between measured and calculated masses below 0.2 Da. The isoform alpha/beta represents different levels of phosphorylation of the same protein, as does the isoform delta/zeta (1); this

presumably explains the elongated form observed for the spots corresponding to these isoforms in 2-DE gels.

The distribution of these isoforms in normal breast epithelial cells, and the prototypical cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and in three representative primary tumors are shown in Figure 3, and their quantitation in Figure 4. The isoforms alpha/beta and delta/zeta of 14-3-3 showed no significant variation in their expression, whereas the sigma isoform, detected as a major spot in normal breast cells, was clearly down-regulated in MCF-7 and MDA-MB-231 cells as well as in breast carcinomas. Careful examination of the spot reveals two forms of 14-3-3 sigma which migrate differently in IEF, suggesting that it is subject to different levels of phosphorylation as has been described for the alpha/beta and delta/zeta forms (1). Figure 5 shows the quantification of the 14-3-3 sigma protein in 35 primary breast carcinomas compared to normal breast epithelium cells. The level of 14-3-3 sigma was found to be at an average of 10-fold lower in breast carcinomas than in normal breast epithelium cells. In all breast carcinomas studied, the quantity of 14-3-3 sigma was downregulated compared to normal breast epithelium and was even not detected in 5/35 samples.

DISCUSSION

In this study we have used proteomic profiling of human breast epithelial cells by 2-D electrophoresis and mass spectrometry to establish that the sigma form of the 14-3-3 protein is down-regulated in breast cancer cells as compared to normal breast epithelial cells. As these proteins are modulators of transduction signals related to cellular growth, our results suggest this down-regulation contributes to the deregulation of growth observed in breast cancer. The hypothesis that 14-3-3 sigma may constitute a marker for the discrimination of non-cancerous from breast cancer epithelial cells is thus supported by the study.

The widely expressed and highly conserved protein forms of 14-3-3 (alpha, beta, delta, sigma, zeta) help regulate those signaling pathways controlling cell proliferation, differentiation and survival (1). They are known to associate directly or indirectly with such signaling proteins as Raf, MEK kinase, PI3-kinase and cdc-25, although the precise molecular mechanism by which 14-3-3 proteins regulate these elements remains unclear (1). Recently, Tzivion et al. (2) and Roy et al. (3) have shown that Raf activation requires formation of a complex containing Raf and 14-3-3 forms, and that the cellular levels of 14-3-3 have a significant impact on the control of Raf-1 activity. Varying levels of Raf-1, MEK kinase, PI3-kinase and cdc-25 activation may account for the ability of 14-3-3 to induce either cell cycle arrest or cell proliferation (1, 4, 5, 12). Together these data strongly suggest that certain levels of 14-3-3 expression are critical for the control of cell growth, and that the down-regulation of 14-3-3 sigma observed in breast cancer cells is involved in the neoplastic transformation.

Interestingly, we have shown here that the amounts of the alpha, beta, zeta and delta forms of 14-3-3 do not significantly vary between normal and cancer cells, suggesting that it is only the regulation of the sigma form of 14-3-3 that is related to neoplastic transformation. In keratinocytes and in bladder, the expression of 14-3-3 sigma is lower in transformed cells than in normal cells (13, 14), although other forms of 14-3-3 were not monitored. The sigma form of 14-3-3 is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression and its overexpression can cause cell cycle arrest (5). In addition, it is able to both upregulate cdc2 phosphorylation via Wee1 (15)

and downregulate *cdc25c* (4), so controlling the entry of cells into mitosis by maintaining the G2 checkpoint (16). Recently it was also demonstrated that 14-3-3 sigma directly associates with cyclin-dependent kinases to negatively regulate cell cycle progression (7). Gene expression of 14-3-3 sigma was found 7-10 fold lower in breast cancer cells than in normal breast cells (17, 6) due to the high frequency of hypermethylation of the 14-3-3 sigma locus (6). We found here that the 14-3-3 sigma protein is present in breast cancer biopsies in a level which is at an average of 10-fold lower than in normal breast epithelial cells. Interestingly, Fergusson et al (6) have reported that mRNA for 14-3-3 sigma was undetectable by Northern blot analysis in 45/48 primary breast carcinomas studied; in contrast, we have detected the 14-3-3 sigma protein in 30/35 primary tumor samples, indicating the high sensitivity provided by proteomic analysis. The higher level of 14-3-3 sigma in normal breast epithelial cells may therefore contribute to the prevention of the high cellular proliferation characteristic of the transformed phenotype.

Like breast cancer cells, normal breast epithelial cells express specific tyrosine kinase receptors for peptides such as nerve growth factor (NGF; 18) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2; 19). Both NGF and FGF-2 activate the Ras/Raf/MAP-kinase pathway in breast cancer cells, resulting in stimulation of the cell proliferation (18, 20). However, neither NGF nor FGF-2 has a mitogenic effect on normal breast epithelial cells (18, 21). Paradoxically, therefore, normal breast epithelial cells express both NGF and FGF receptors but do not proliferate in response to either cognate factor. The reason for the lack of sensitivity to these mitogens is not understood, but the growing body of evidence implicating 14-3-3 sigma involvement in cell cycle progression suggests that the high level we have found in normal cells may block the mitogenic effect of such growth factors. These data support the idea that the expression of 14-3-3 sigma in normal breast epithelial cells participates in the control of cellular growth by preventing proliferation, whereas in breast cancer cells the down-regulation in 14-3-3 sigma allows growth factor stimulation and cell cycle progression.

This study also confirms that proteomic analysis is a powerful tool for the discovery of such molecular markers. Complementing the burgeoning field of genomics, proteomic analysis allows the characterization of picoquantities of proteins with mass spectrometry and thus

changes in the levels inherent to the pathophysiology of any cell type, tissue or whole organism (22). It has always been hoped that it would allow the identification of markers to discriminate cancerous from normal cells, as well as the different stages of this pathology. As demonstrated here, proteome analysis may well become central to the discovery of new indicators for the diagnosis and prognosis of cancer progression.

In conclusion, our data suggest that the down-regulation of 14-3-3 sigma is involved in breast epithelial cell transformation and subsequent sensitivity to growth factors. This protein form should therefore be considered as a marker for the non-cancerous state for breast epithelial cells. Clearly it has potential at the clinical level as a robust marker for the early detection of breast cancer.

Acknowledgements: This work was supported by the «Fondation pour la Recherche Médicale», the «Association pour la Recherche contre le Cancer, Contrat 5360», the «Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité du Nord», the French Ministry of Education, and the National Health and Medical Research Council of Australia.

REFERENCES

1. Aitken, A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biology*, 6: 341-347, 1996.
2. Tzivion, G., Luo, Z., and Avruch, J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, 394: 88-92, 1998.
3. Roy, S., McPherson, R. A., Appoloni, A., Yan, J., Lane, A., Clyde-Smith, J., and Hancock, J. F. 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.*, 18: 3947-3955, 1998.
4. Peng, C. Y., Graves, P. R., Thomas, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnicka-Worms, H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 277: 1501-1505, 1997.
5. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell*, 1: 3-11, 1997.
6. Ferguson A. T., Evron, E., Umbricht, C. B., Pandita, T. K., Chan, T. A., Hermeking, H., Marks, J. R., Lambers, A. R., Futreal, P. A., Stampfer, M. R., and Sukumar, S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6049-6054, 2000.
7. Laronga, C, Yang, H. Y., Neal, C., and Lee, M. H. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 275: 23106-23112, 2000.
8. Dong-Lebourhis X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M., and Calvo, F. 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, 1997.
9. Hondermarck, H., McLaughlin, C. S., Patterson, S. D., and Bradshaw, R. A. 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, 1994.

10. Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T. and Wong, S. C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*: 5011-5015, 1993.
11. Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. and Mann, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*: 14440-14445, 1996.
12. Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A., and Land, H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol. Cell. Biol.*, *17*: 5588-5597, 1997.
13. Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Honore, B., Andersen, A. H., Walbum, E., Vandekerckhove, J., and Celis, J. E. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. *J. Mol. Biol.*, *231*: 982-998, 1993.
14. Ostergaard, M., Rasmussen, H. H., Nielsen, H. V., Vorum, H., Orntoft, T. F., Wolf, H., and Celis, J. E. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res.*, *57*: 4111-4117, 1997.
15. Wang, Y., Jacobs, C., Hook, K. E., Duan, H., Booher, R. N., and Sun, Y. Binding of 14-3-3 beta to the carboxyl terminus of Wee1 increases Wee1 stability, kinase activity, and G2-M cell population. *Cell Growth Differ.*, *11*: 211-219, 2000.
16. Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, *401*: 616-620, 1999.
17. Prasad, G. L., Valverius, E. M., McDuffie, E., and Cooper, H. L. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. *Cell Growth Differ.*, *3*: 507-513, 1992.
18. Descamps, S., Le Bourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, *273*: 16659-16662, 1998.
19. Luqmani, Y. A., Graham, M., and Coombes, R. C. Expression of basic Fibroblast Growth Factor, FGFR1, and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer*, *66* : 273-280, 1992.

20. Liu, F. J., Chevet, E., Kebache, S., Lemaitre, G., Barritault, D., Larose, L., and Crepin, M. Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2-induced DNA synthesis in MCF-7 cells. *Oncogene*, *18*:6425-6433, 1999.
21. Li, S., and Shipley, G. D. Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells in culture. *Cell Growth Diff.*, *2*: 195-202, 1991.
22. Ünlü, M. Proteomics. *Biochem. Soc. Trans.*, *27*: 547-559, 1999.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Proteomic profiling of normal breast epithelial cells. 2-DE was performed with Trans ³⁵S-labeled proteins. Molecular masses (ordinate, in kDa) and pI (abscissa) values were determined from human gels in the SWISS-Prot database. The major proteins were determined by MALDI-TOF after trypsin digestion. Abbreviations : Anx, annexin; CK, cytokeratins; Calx, calnexin ; crtc, calreticulin; GRP, glucose-regulated protein; GST, glutathione S-transferase; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HSP, heat-shock proteins; LDH, lactate dehydrogenase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PDI, protein disulfide isomerase; PGM, phosphoglycerate mutase; RhoGDI, Rho GTP-dissociation inhibitor 1; SODM, superoxide dismutase; TCTP, transcriptionally-controlled tumor protein; thio. peroxidase, thioredoxin peroxidase; TM, tropomyosin; vim,vimentin; 14-3-3: σ , sigma; α , alpha; β , beta; δ , delta; ζ , zeta. The area of the gel used as the basis for Fig. 3 is framed.

Figure 2. MALDI-TOF peptide-mass fingerprint spectrum of the tryptic digest of 14-3-3 proteins (A : alpha/beta form, B: delta/zeta form, C : sigma form) of human breast epithelial cells. Peaks designated with an asterisk indicate the trypsin autolytic fragments.

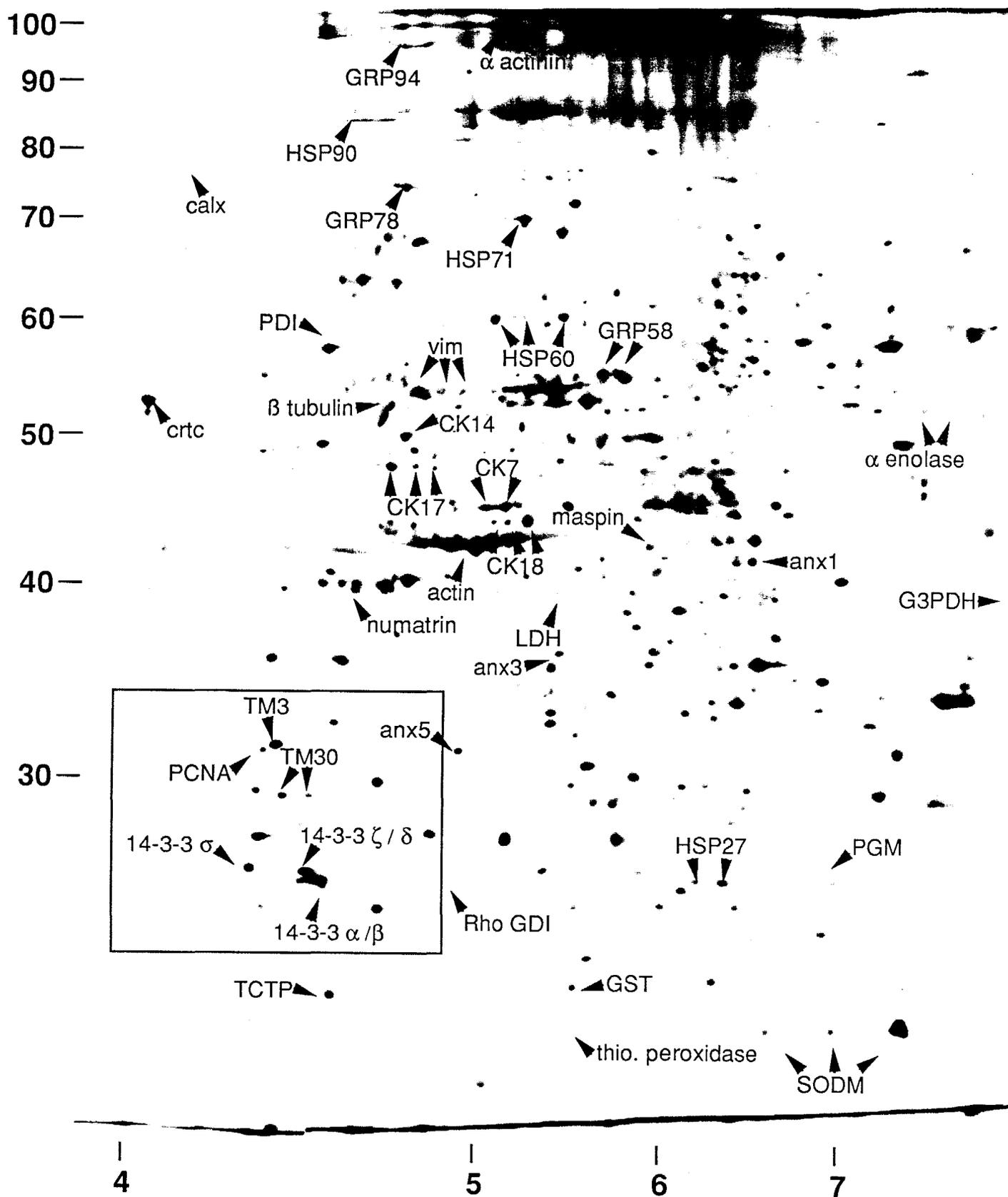
Figure 3. Two-dimensional silver-stained gel portions encompassing 14-3-3 proteins obtained from different cell types. A) normal breast epithelial cells, B) MCF-7, C) MDA-MB-231, D- E- F) representative primary breast tumors.

Figure 4. Quantitation of the levels of 14-3-3 spot intensity in normal breast epithelial cells and in the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines seen in Fig.3. The 2-D gels were scanned at high resolution and analyzed with Melanie II software.

Figure 5. Quantitation of the levels of 14-3-3 sigma in primary tumors. The 2-D gels obtained for each of the 35 primary tumor samples were scanned at high resolution and analysed with Melanie II software.

Table 1. MALDI-TOF identification of 14-3-3 sigma. The tryptic fragment masses (indicated in Daltons) that were obtained and their corresponding match to theoretical masses are listed (Fig. 2). The amino acid sequences were deduced from the tryptic fragments after database searching. Abbreviations: MSO, oxidised methionine; Cys-PAM, reduced cysteine with acrylamide adducts.

Figure 1



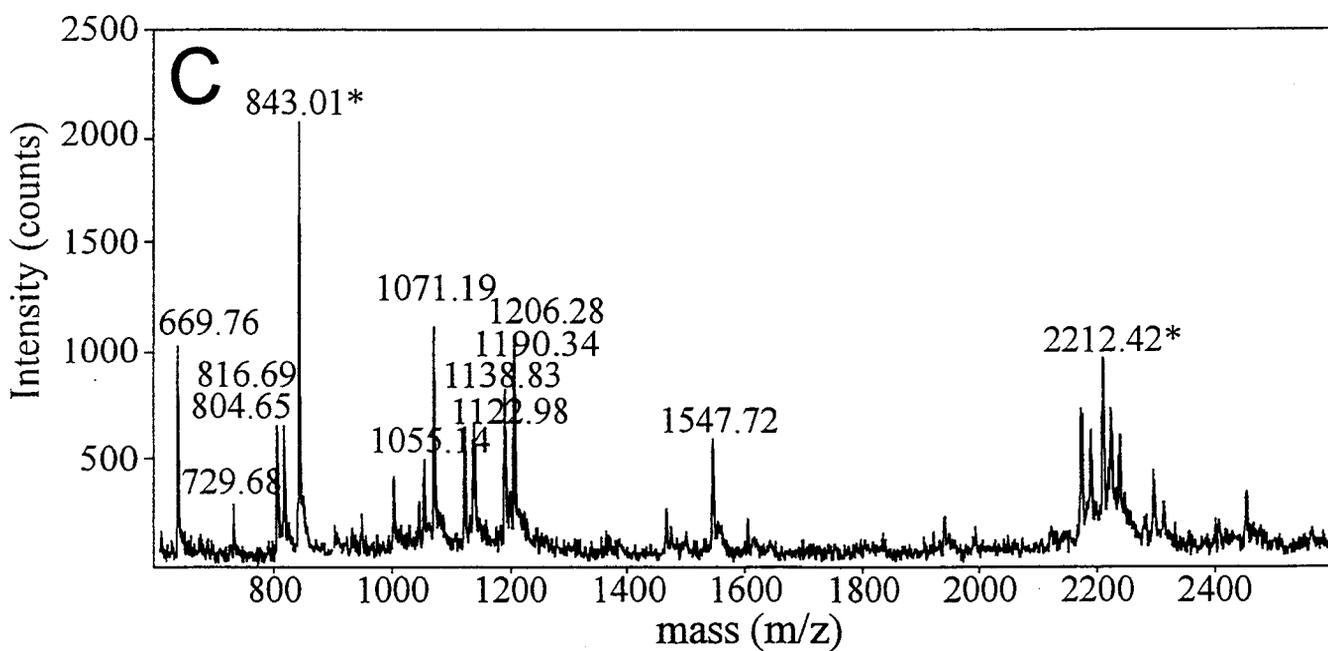
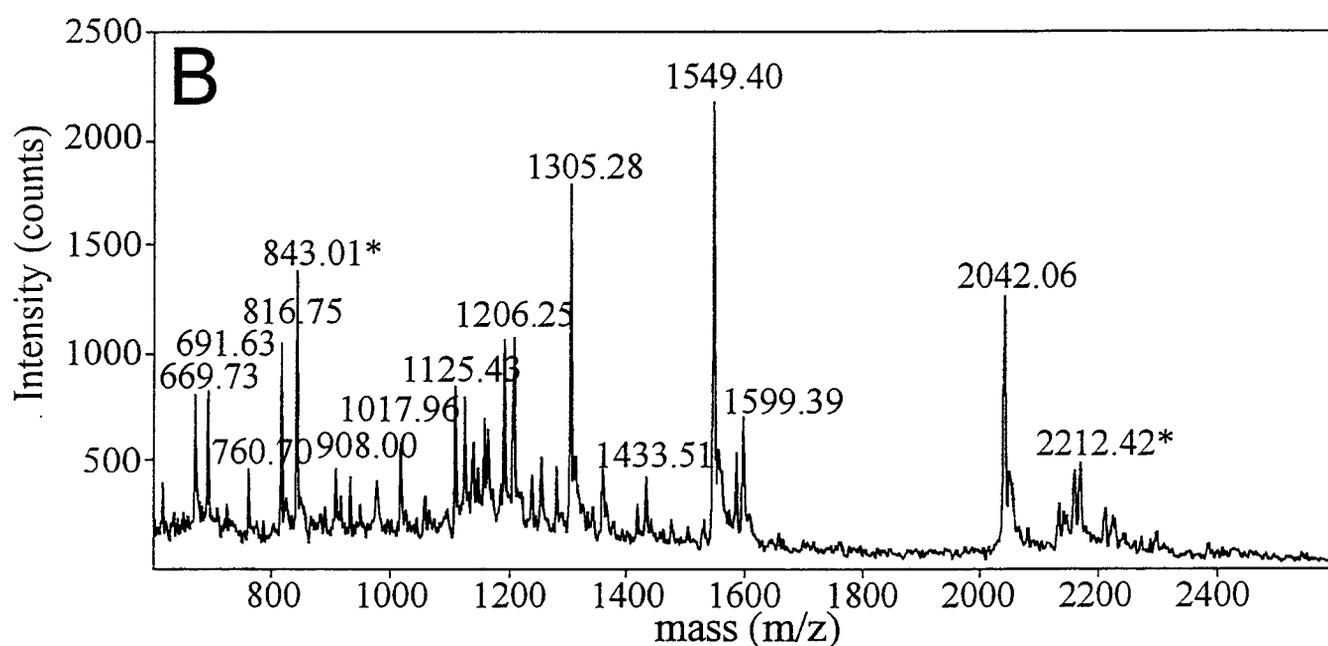
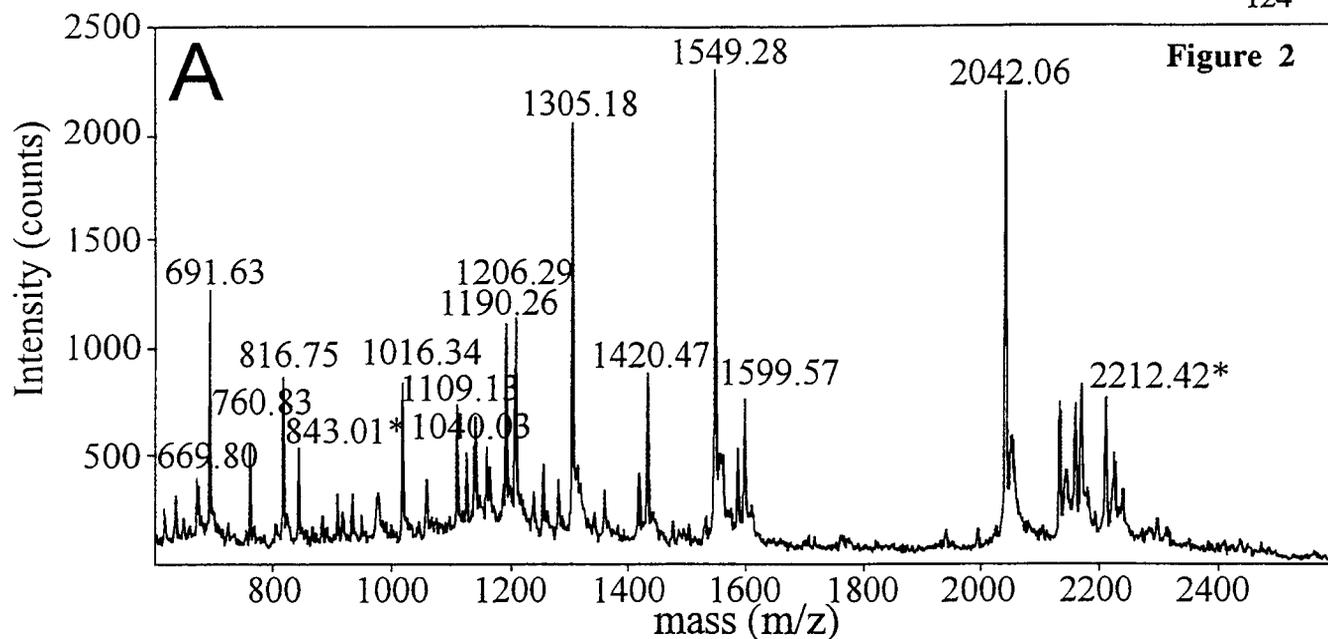


Figure 3

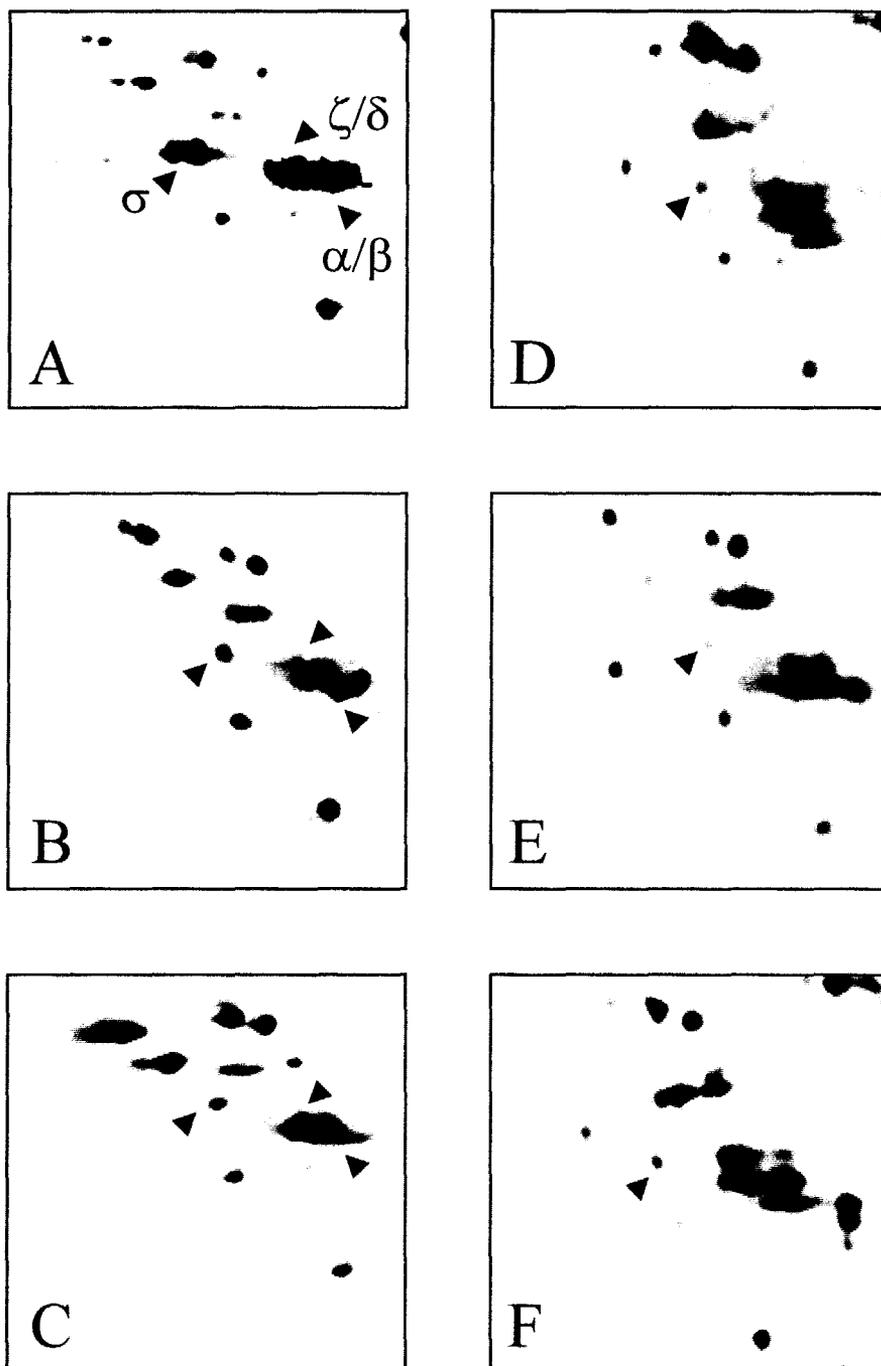


Figure 4

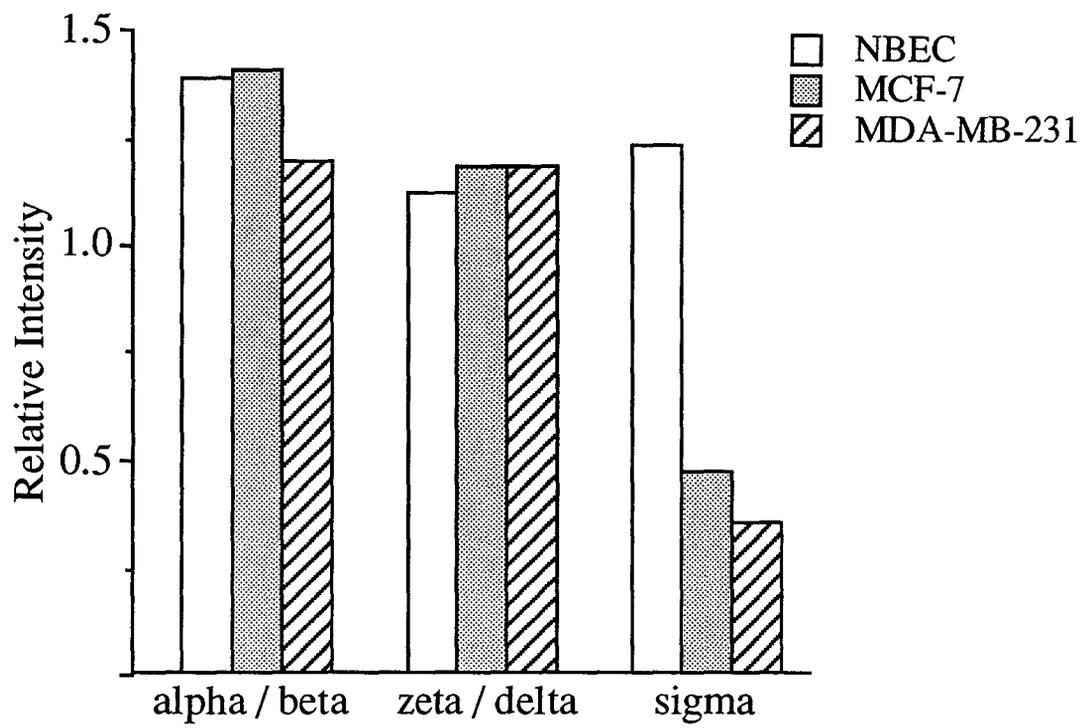


Figure 5

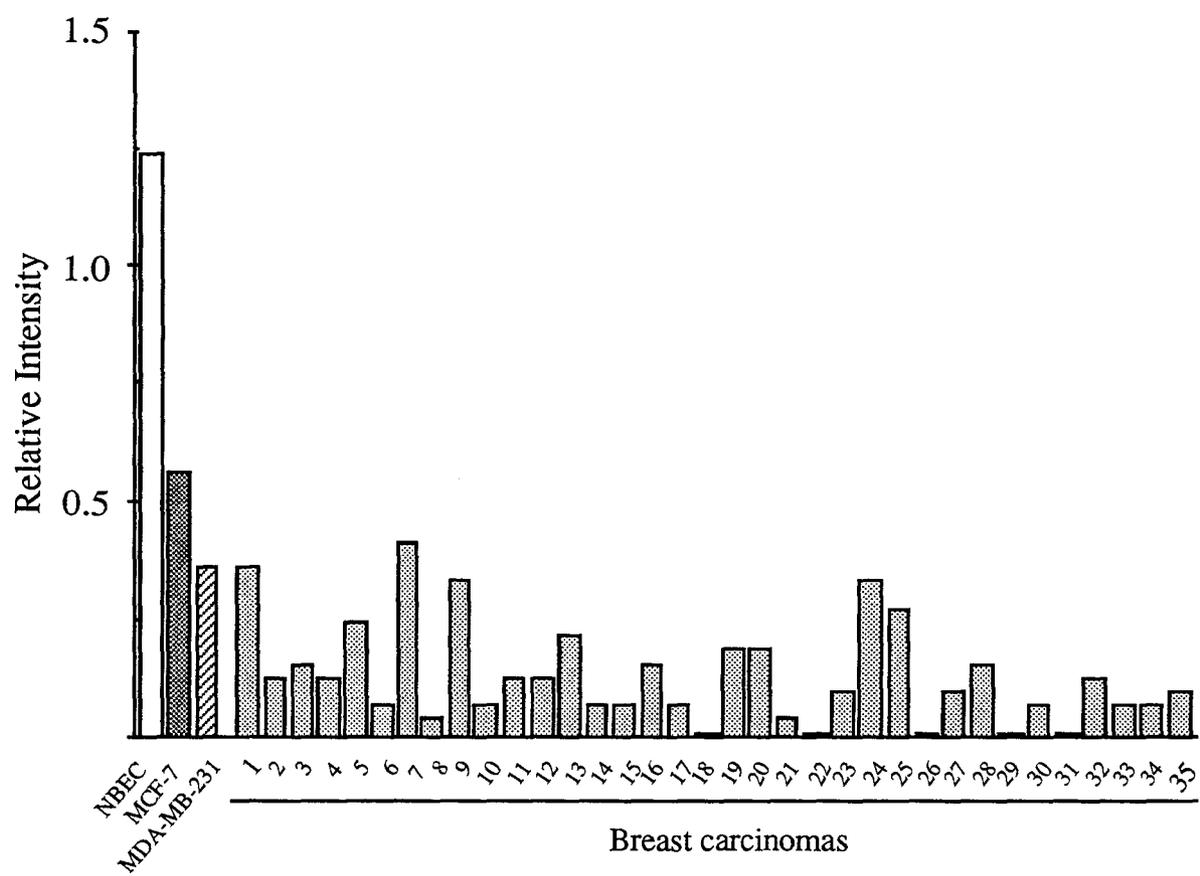


Table 1

Masses Submitted	MH+ matched	Delta Mass (Da)	Start amino acid	End amino acid	Peptide sequence consistent with mass	Modifications
669.76	669.841	0.081	118	122	VFYLK	-
729.68	729.814	0.134	50	56	NVVGQR	-
816.69	816.889	0.199	12	18	LAEQAER	-
1055.14	1055.237	0.097	161	169	EMPPTNPIR	-
1071.19	1071.236	0.046	161	169	EMPPTNPIR	MSO(162)
1122.98	1123.179	0.199	33	41	GEELSCEER	Cys-PAM (38)
1190.34	1190.443	0.103	215	224	DSTLIMQLLR	-
1206.28	1206.442	0.162	215	224	DSTLIMQLLR	MSO(220)
1547.72	1547.575	-0.1448	69	82	SNEEGSEEKGPEVR	-

ARTICLE 2

II/ ARTICLE 2**« THE MITOGENIC SIGNALING PATHWAY FOR FIBROBLAST
GROWTH FACTOR-2 INVOLVES THE TYROSINE
PHOSPHORYLATION OF CYCLIN D2 IN MCF-7 HUMAN
BREAST CANCER CELLS »**

Les travaux précédents de notre laboratoire ont montré une activité mitogène du FGF-2 sur des lignées cellulaires de cancer du sein, dont les cellules MCF-7 qui possèdent les deux types de récepteurs aux FGFs: les récepteurs de haute affinité à activité tyrosine kinase (FGFR) et les sites de fixation de basse affinité (HSPG) (Peyrat et al, 1991, 1992; Delehedde et al, 1995; Fernig et al, 2000; Nurcombe et al, 2000). Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action intracellulaire du FGF-2 menant à la stimulation de la prolifération, nous avons cherché à identifier des voies de signalisation activées par la fixation du FGF sur le FGFR en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques et avons étudié les modifications de tyrosine-phosphorylations induites par le FGF-2 dans les cellules MCF-7 grâce à des anticorps spécifiques et au couplage électrophorèse/spectrométrie de masse.

Cet article a été publié dans *FEBS Letters* (vol. 478, pp.209-215, 2000).

The mitogenic signaling pathway for fibroblast growth factor-2 involves the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells

Anne-Sophie Vercoutter-Edouart^a, Jérôme Lemoine^b, Chanel E. Smart^c, Victor Nurcombe^c, Bénoni Boilly^a, Jean-Philippe Peyrat^d, Hubert Hondermarck^{a,*}

^a*Equipe Facteurs de Croissance, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES-EA1033, bâtiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

^b*Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

^c*Department of Anatomical Sciences, University of Queensland 4072 Brisbane, Qld, Australia*

^d*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre de Lutte Contre le Cancer, Lille, France*

Received 7 May 2000; revised 8 May 2000; accepted 8 May 2000

Edited by Veli-Pekka Lehto

Abstract Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is mitogenic for the human breast cancer cell line MCF-7; here we investigate some of the signaling pathways subserving this activity. FGF-2 stimulation of MCF-7 cells resulted in a global increase of intracellular tyrosine phosphorylation of proteins, particularly FGF receptor substrate-2, the protooncogene product Src and the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) cascade. A major increase in the tyrosine phosphorylation of a 30-kDa protein species was also found. This protein was identified as cyclin D2 by mass spectrometry after trypsin digestion. Immunoprecipitation of cyclin D2 and immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies confirmed that the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 was indeed induced by FGF-2 stimulation. In addition, pharmacological inhibition of Src (with herbimycin A and PP2), and of the MAP kinase cascade (with PD98059), confirmed that Src activity is required for the FGF-2-induced phosphorylation of cyclin D2 whereas MAP kinase activity is not. Thus, tyrosine phosphorylation of cyclin D2 may be a key regulatory target for FGF-2 signaling. © 2000 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Fibroblast growth factor-2; Signaling pathway; Cyclin D2; Breast cancer cell

1. Introduction

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), the most studied member of the FGF family of growth factors, has been isolated from a large variety of tissues and various effects of this molecule have been reported for the control of cellular growth, differentiation and migration [1]. FGF-2 activates its target cells by binding to specific tyrosine kinase receptors (FGFRs)

on the cell surface, which immediately induces transient phosphorylation on their tyrosine residues [2]. The activated FGFR further associates with, and phosphorylates a set of cytoplasmic signaling molecules containing SH2 domains, which in turn activate several pathways, and in particular the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) cascade. The MAP kinase pathway ultimately leads to the regulation of gene expression essential for proliferation [3]. However, a variety of signaling pathways has been described in the diverse cellular systems used to study FGF intracellular signaling, and a complete model for one defined cell type has yet to be established.

The role of FGFs in tumor progression includes the stimulation of cancer cell growth and metastasis as well as angiogenesis [1,4]. In breast cancer, the overexpression of FGF family members as well as FGFRs has been reported in a significant percentage of breast tumors [5–10]. Moreover, high levels of FGF have been detected in sera from patients with breast cancer [11]. We and others have found that FGF-2 is a strong mitogen for the prototypic MCF-7 breast cancer cell line [12–14] and that this activity involves a recruitment of G0 cells into the cell cycle, as well as a shortening of the G1 phase [15]. Under other experimental conditions, FGF-2 has been shown to inhibit breast cancer cell growth [16,17], underlining the pleiotropic activities of this growth factor. However, the transfection of MCF-7 cells by FGFs induces a progression towards an aggressive and metastatic phenotype, supporting a role for autocrine and paracrine involvement of FGFs during malignant progression [18,19]. Interestingly, Liu et al. (1999) have shown that functional Rac-1 and Nck are required for FGF-2-induced proliferation in MCF-7 cells [20]. However, to date, the intracellular signaling pathways for the FGF-2 stimulation of breast cancer cells remain largely unknown.

In the present study, we have explored the signaling pathways involved in the mitogenic effect of FGF-2 in MCF-7 cells. Our results show that FGF-2 induces the activation of FGFR, FRS2, Src and the MAP kinase. Moreover, pharmacological inhibition indicated that the activation of both Src and the MAP kinase cascade is required for FGF-2 mitogenicity. Interestingly, a strong increase in the tyrosine phosphorylation of a 30-kDa protein was found to be induced by FGF-2; this protein was identified as cyclin D2 by mass spectrometry. The induction of tyrosine phosphorylation of

*Corresponding author. Fax: (33)-3-20 43 40 38.
E-mail: hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

Abbreviations: ERK, extracellular regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; FRS2, fibroblast growth factor receptor substrate-2; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; PI3 kinase, phosphatidylinositol 3' kinase; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

cyclin D2 by FGF-2 stimulation was further confirmed using specific antibodies.

2. Materials and methods

2.1. Materials

FGF-2 was from Amersham (France). The pharmacological inhibitors PD98059, K252-a, herbimycin A and PP2 were from Calbiochem (France) and genistein was from Sigma (France). All the cell culture products were from Bio-Whittaker (Belgium) except insulin (Organon, France), fibronectin (Falcon-Biocoat, France) and transferrin (Sigma, France). The petri dishes were purchased from Greiner (Fisher, France). The antibodies against phosphotyrosine (PY99), FRS2, ERK-1, and cyclin D2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu, France). The rabbit polyclonal anti-FGFR (nominally against R1) was from UBI (Euromedex, France). Trypsin was purchased from Promega (France).

2.2. Cell culture

MCF-7 human breast cancer epithelial cells were obtained from the American Type Culture Collection. They were cultured between passages 15–25 in minimal essential medium (Earle's salts) supplemented with 20 mM HEPES, 2 g/l sodium bicarbonate, 10% fetal calf serum (FCS), 1% non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine, 5 µg/ml insulin, 40 U/ml penicillin–streptomycin, 50 µg/ml gentamicin. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.3. Cell growth assay

MCF-7 cells were seeded at 30 000 cells/ml in 35-mm dishes in complete medium. When 40% confluence was reached, cells were washed twice and starved in a serum-free medium containing fibronectin (2 µg/ml) and transferrin (30 µg/ml) for 24 h. Cells were then treated for 48 h with FGF-2 (10 ng/ml) in fresh serum-free medium in the presence of various inhibitors at different concentrations: 1–100 µM genistein, 5 nM K-252a, 1–100 µM PD98059, 25–100 nM herbimycin A, 5–15 nM PP2. After 48 h of treatment, cell numbers were determined after trypsinization of the monolayer culture with 0.25% trypsin/EDTA solution. In parallel with the experiments with FGF-2, MCF-7 cells were treated with the same inhibitors in control serum-free medium to ensure that the effect of each compound on FGF-2-induced proliferation was not due to a non-specific toxicity.

2.4. Cell lysate preparation

Cells were seeded in 100-mm dishes at 500 000 cells per dish. They were grown to pre-confluency and then made quiescent in serum-free MEM for 24 h. Pretreatment of cells by 10 µM pervanadate before addition of FGF-2 was performed for 10 min. FGF-2 was then directly added to the medium (10 ng/ml) for another 10 min. When inhibitors were used, they were added directly into the medium at the required concentration 50 min before pretreatment with pervanadate. Cells were rinsed with cold PBS containing 100 µM orthovanadate. Cell lysates were prepared by adding 200 µl of immunoprecipitation (IP) lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, supplemented with the following inhibitors: orthovanadate, PMSF, and Na₄P₂O₇ at 1 mM, leupeptin and aprotinin at 10 µg/ml, pepstatin at 1 µg/ml) to each dish, kept 15 min on ice, transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes, boiled for 10 min, and centrifuged for 2 min at 10 000 × g. The supernatants were stored at –80°C. Protein content in cell lysates was measured with the Bio-Rad protein assay.

2.5. Immunoprecipitation and Western blot analysis

Immunoprecipitations were performed by incubation of cell lysates (500 µg protein) at 4°C for 2 h with the appropriate antibody, followed by incubation of the immunocomplexes with protein A-agarose 10% (Sigma) beads for 1 h at 4°C. The beads were then washed three times with the IP buffer. The immunocomplexes were resuspended in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min and subjected to 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell). The membranes were immersed for 2 h at room temperature in blocking buffer: Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20 containing 5% non-fat dry milk (for detection of FGFR, ERK, and cyclin D2), 1% non-fat dry milk (for detection of FRS2) or 3% BSA (for detection of phosphotyrosine), and were then incubated

overnight at 4°C with the appropriate antibody. The membranes were then incubated with the appropriate secondary antibody for 1–2 h and, after extensive washing, antibody complexes were detected by the enhanced chemoluminescence (ECL) Western blotting detection system according to the manufacturer's instructions (Amersham).

2.6. Src kinase assay

Src kinase activity was determined by immunoprecipitation with the anti-Src monoclonal antibody 327 [21]. The antibody complexes were washed 3 times with lysis buffer and once with kinase buffer (30 mM Tris pH 7.4, 10 mM MnCl₂), and were subsequently incubated in 50 µl of kinase buffer containing 10 µCi of (γ-³²P)-ATP and 2 µg acid-denatured enolase (Sigma) at room temperature for 10 min. The phosphorylated proteins were resolved by 7.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, visualized by autoradiography and bands quantitated using NIH Image software. Subsequently, immunoblot analysis was performed using the anti-Src-2 antibody [21] and quantitated by fluorimaging (Molecular Dynamics) with the ECL+reagent (Amersham Pharmacia) procedure. The results of at least six separate experiments were averaged and the standard deviation calculated.

2.7. Mass spectrometry analysis

Protein identification was performed as described [22,23] with modifications. Silver nitrate-stained proteins were cut out from the gel and washed three times with 400 µl of a 125 mM ammonium carbonate/acetonitrile (ACN) 1:1 (v/v) solution for 20 min with shaking. The wash solution was discarded and the pieces of gel were dried at room temperature for 2 h. Enzymatic cleavage was initiated by re-swelling the gel in ammonium carbonate solution (125 mM); 50 mM acetic acid was then added, and finally the digestion was initiated by adding 50 mM acetic acid containing 7–7.5 units of trypsin (Promega). After absorption of the protease solution, aliquots (5 µl) of pure water were added sequentially. The gel slices were placed in an Eppendorf tube and a minimum volume of water was added to totally immerse the gel pieces. The digestion was carried for 12–16 h at 37°C. The liquid was collected and the resulting peptides recovered after two extractions with a solution containing 45% acetonitrile and 10% formic acid. To recover very hydrophobic peptides, a third extraction with 95% acetonitrile, 5% formic acid was performed. The total extract was then dried using a Speed Vac-concentrator (Savant).

MALDI-TOF analysis of trypsin digests was performed on a Vision 2000 (Finnigan, Bremen, Germany) reflector instrument in positive ion mode at an accelerating voltage of 6 kV. Peptides were resuspended in CH₃CN/H₂O (1:1) containing 0.5% formic acid of which 0.5 µl were mixed directly onto the target with 1 µl of 2,5-dihydroxy benzoic acid matrix solution (10 mg/ml in CH₃OH/H₂O, 7:3). Between 30 and 50 laser shots were accumulated to obtain the final spectrum. Mass measurements were then finalized after peak smoothing and internal calibration using the monoisotopic mass of the two autolysis trypsin fragment and DHB matrix ions respectively at 2211.1, 842.8 and 273.04, resulting in mass accuracy better than 0.2 Da. Protein database searching was performed using MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/htmlucsf3.0/msfit.htm>) according to the average molecular weight of [M+H]⁺ peptide ions.

3. Results

3.1. Pharmacological inhibition of FGF-2 mitogenic effect

MCF-7 cells were treated with each inhibitor in the presence of FGF-2, and the cell number measured after 2 days of treatment. For each inhibitor used we determined the dose-response for the inhibition of FGF-2 mitogenic activity (data not shown). Genistein inhibited the proliferation induced by FGF-2 (Fig. 1), confirming that FGF-2 stimulates cell growth through tyrosine kinase pathways. In contrast, a specific inhibitor of the NGF receptor (TrkA) tyrosine kinase, K-252a, which inhibits NGF-induced proliferation in MCF-7 cells [24], had no effect on FGF-2-induced proliferation (Fig. 1). Herbimycin A and PP2 are known to inhibit Src and Src-related kinases by binding to their SH2 domains. These two inhibitors markedly decreased the mitogenic activity of FGF-2 (Fig. 1),

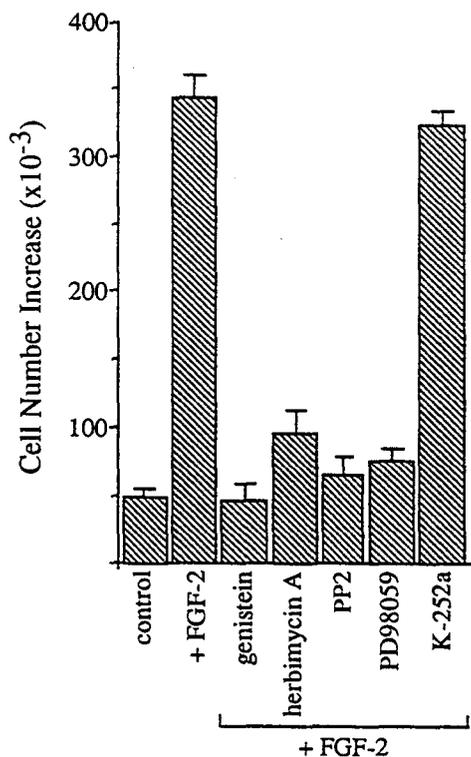


Fig. 1. Pharmacological inhibition of FGF-2 mitogenic activity on MCF-7 cells. Quiescent MCF-7 cells were stimulated with FGF-2 (10 ng/ml) for 48 h with or without inhibitors (genistein 10 μ M, K-252a 5 nM, PD98059 10 μ M, herbimycin A 25 nM, PP2 15 nM) and the cell number determined. For each inhibitor, a dose-response curve was generated and only the effect for the optimal concentration is presented here. Results represent the average of triplicate determinations for two independent experiments.

suggesting that Src kinase activity is involved in the signaling of this growth factor. In contrast, the PI3 kinase inhibitor wortmannin (5–15 nM) had only a slight inhibitory effect on the mitogenic activity of FGF-2, even when the medium was changed after 24 h of treatment (data not shown). This indicates that PI3 kinase is probably not crucial for the mitogenesis induced by FGF-2 in breast cancer cells. MAP kinase pathway involvement in the FGF-2 mitogenic effect in MCF-7 cells was investigated using the synthetic MEK-1 inhibitor, PD98059. At a concentration of 10 μ M, the mitogenic effect of FGF-2 was completely inhibited (Fig. 1), demonstrating that MAP kinase activity is necessary for the mitogenic stimulation of MCF-7 cells by FGF-2.

3.2. Tyrosine phosphorylation induced by FGF-2

The tyrosine phosphorylation induced by FGF-2 in MCF-7 cells was studied after immunoprecipitation and Western blotting of cell lysates using an anti-phosphotyrosine antibody. Several bands with apparent molecular weights of 110, 95, 90, 85–70, 64, 60, 45 and 30 kDa were found phosphorylated after 10 min of stimulation with FGF-2 (Fig. 2). The 45-kDa protein has a molecular weight corresponding to the ERK-1/2 isoforms known to be regulated by growth factors; the 60–64-kDa band could correspond to ERK-4 and/or Src, which have a molecular mass of about 60 kDa and are also reported to be phosphorylated by MEK in response to growth stimuli [3].

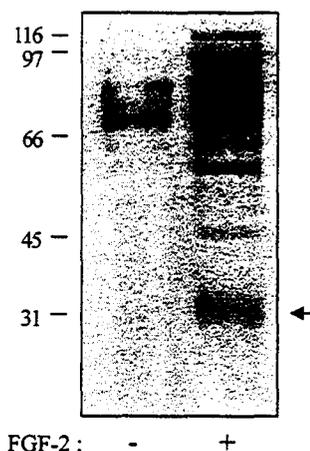


Fig. 2. FGF-2-induced tyrosine phosphorylation. Cells were stimulated with 10 ng/ml of FGF-2 in serum-free medium for 10 min as described in Section 2. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine antibodies and subjected to immunoblot analysis with the same antibody. Molecular weight is indicated in kDa. The arrow indicates the position of the 30-kDa band which has been subjected to analysis by mass spectrometry.

3.3. FGFR, FRS2, Src and MAP kinase activation

We used a polyclonal antibody to immunoprecipitate FGFR-1, and its activation was detected by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies. Tyrosine phosphorylation of the FGFRs was observed after 10 min of stimulation by FGF-2 (Fig. 3A). Differences observed in FGFR phosphorylation were not due to differences in protein quantity, as we reprobated the membrane with the anti-FGFR antibody. Similarly, FGF-2 induced the tyrosine phosphorylation of the FGF receptor substrate FRS2, a membrane-anchored docking protein involved in the activation of the Ras/MAP kinase cascade through FGFR (Fig. 3B).

As we have shown an inhibition of FGF-2-induced proliferation by herbimycin A and PP2, we further studied Src

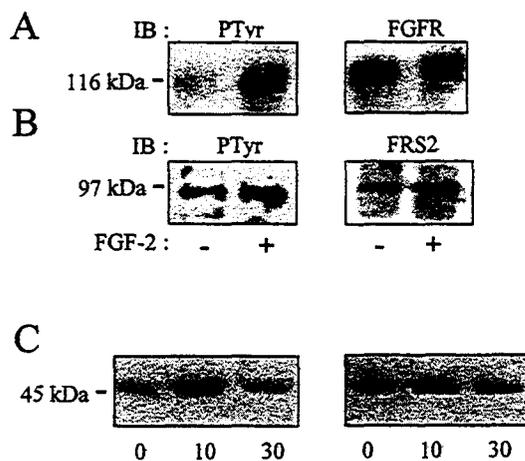


Fig. 3. Activation of FGFR, FRS2, and MAP kinase. Cells were exposed to 10 ng/ml of FGF-2 for 10 min. Cell lysates were prepared as described in Section 2 and immunoprecipitated with anti-FGFR (A) or anti-FRS2 antibodies (B). The immunocomplex was resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phosphotyrosine antibodies. C: MAP kinase activation. Cells were stimulated for the indicated times with FGF-2 at 10 ng/ml. Lysates were immunoprecipitated with anti-ERK1 antibodies and immunoblotted with anti-phosphotyrosine or anti-ERK1 antibodies.

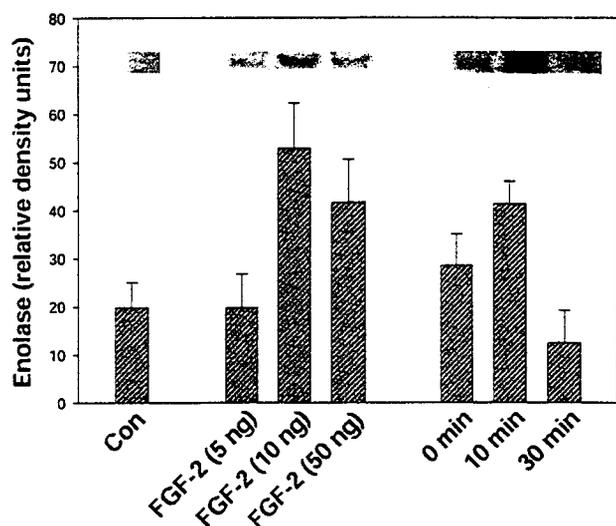


Fig. 4. Quantitation of Src kinase activity. MCF-7 cells were exposed to different concentrations (0, 5, 10, 50 ng/ml) of FGF-2 and for 0, 10 or 30 min with 10 ng/ml FGF-2. Src kinase activity was determined by immunoprecipitation with the anti-Src monoclonal antibody 327 and in vitro kinase assays performed using enolase as a substrate. The density of the enolase bands was then quantitated using calibrated densitometry. Representative enolase bands appear above the graph. Each bar represents the mean+S.D. of six replicate cell preparations.

activation. Because the Src protein can be phosphorylated on tyrosine in an inactive, as well as an active state [25], we used an in vitro kinase assay in the manner of LaVallee and co-workers [21] to determine the effects of FGF-2 on Src activity. The activity of Src was not stimulated by 5 ng/ml FGF-2 in the MCF-7 cells, but was markedly stimulated by 10 ng/ml; at 50 ng/ml it was already starting to be inhibited (Fig. 4). Maximal activity for the FGF-2 was reached within 10 min, whereafter it declined. Quantitative fluorimaging results using the ECL+visualizing reagent demonstrated that although there were changes in Src activities brought about by FGF-2, there were no major changes in the general Src pool at any of the times or concentrations tested (data not shown).

To visualize MAP kinase activation, extracts of MCF-7 cells were immunoprecipitated with an ERK1-specific antibody and immunoblotted for phosphotyrosine. MAP kinases (p42, p44) were slightly phosphorylated in control, unstimulated cells, whereas treatment with FGF-2 resulted in a rapid and transitory activation of MAP kinase (Fig. 3C). To demonstrate equal loading of proteins, the blot was stripped and reprobated with a MAP kinase antibody, which recognized both the phosphorylated and non-phosphorylated forms. The use of specific ERK2 antibodies showed the same result, although the signal was less strong (data not shown).

Table 1
Peptide mass fingerprint of the 30-kDa phosphotyrosyl protein

Masses submitted	MH ⁺ matched	Delta Da	Start amino acid	End amino acid	Peptide sequence consistent with mass	Modifications
1636.00	1636.8157	0.2157	180	193	(K) HAQTFIALCATDFK (F)	–
1667.90	1667.8362	0.0638	1	13	(–) MELLCHEVDPVRR (A)	–
1924.10	1923.9131	0.1869	57	71	(R) RMVATWMLEVCEEQK (C)	–
1955.70	1955.9029	–0.2029	57	71	(R) RMVATWMLEVCEEQK (C)	2 Met-ox

Tryptic fragment masses obtained by MALDI-TOF analysis (Fig. 5) are listed. The amino acid sequences shown are deduced from the tryptic fragments after database searching. Abbreviations: Met-ox: oxidated methionine.

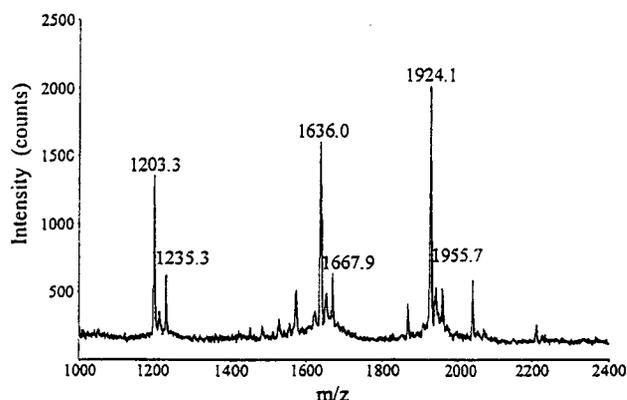


Fig. 5. MALDI-TOF peptide mass fingerprint spectrum of the 30-kDa phosphotyrosyl protein regulated by FGF-2. The band corresponding to the 30-kDa phosphotyrosyl protein that we found regulated by FGF-2 (indicated by an arrow in Fig. 2) was cut out from a silver-stained gel of anti-phosphotyrosine immunoprecipitated material and submitted to trypsin digestion and MALDI-TOF mass spectrometry as described.

3.4. Detection of cyclin D2 tyrosine phosphorylation induced by FGF-2

As shown in Fig. 2, there was a major increase in the tyrosine phosphorylation of a 30-kDa protein induced by FGF-2 stimulation. None of the antibodies that we used recognized this 30-kDa protein. Consequently, we used mass spectrometry to identify this protein. The band corresponding to the 30-kDa protein was cut out and submitted to in-gel trypsin digestion. MALDI-TOF analysis revealed a spectrum of tryptic peptides (Fig. 5). This allowed the identification of the 30-kDa protein as the cyclin D2, with 4/6 matched tryptic peptides covering 10% of the protein sequence (Table 1). MALDI-TOF mass spectrometry is a powerful method for characterization of proteins after database searching [22,23,26]. However, this method does not monitor the entire population of peptides resulting from the tryptic digestion of a protein. This results from differences in the charge and mass of the ion species generated after trypsin digestion, which leads to the preferential protonation of the low mass, and more basic peptides. It should be emphasized that only small or basic peptides can be detected in MALDI-TOF. Thus, the identification of a protein is based on the fingerprint of the molecule obtained after trypsin digestion, and not on the characterization of the entire molecule. Differences in amino acid sequence between the different categories of cyclin D (1, 2 or 3) are important and the fragments that we have obtained specific identify the D2 form. In particular, we have observed a tryptic fragment of 1667.90 Da corresponding to the N-terminal end of cyclin D2, which does not exist in cyclins D1 and D3. The tyrosine phosphorylation of cyclin D2 by FGF-2 was further

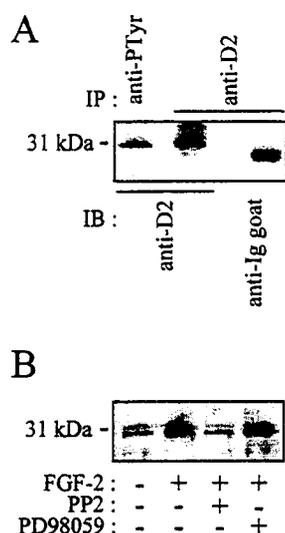


Fig. 6. A: Immunoblotting with anti-cyclin D2. MCF-7 cells were stimulated by FGF-2 (10 ng/ml) for 10 min and cell lysates immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine or anti-D2 antibodies. After SDS-PAGE, immunoblotting was performed with anti-D2 antibodies using anti-goat antibodies as control. B: Tyrosine phosphorylation of cyclin D2. MCF-7 cells were exposed to FGF-2 (10 ng/ml) for 10 min with or without PD98059 (20 μ M) or PP2 (50 nM). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-D2 antibodies and immunoblotting performed with anti-phosphotyrosine antibodies.

confirmed using specific antibodies. As shown in Fig. 6A, when we performed immunoprecipitation with either anti-phosphotyrosine or anti-cyclin D2 antibodies, followed by immunoblotting for cyclin D2, we detected the same band at 30 kDa. In addition, immunoprecipitation of cyclin D2 followed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies confirmed that tyrosine phosphorylation of cyclin D2 is induced by FGF-2 and that this phosphorylation is inhibited by PP2 but not by PD98059 (Fig. 6B).

4. Discussion

In this study, we have examined the intracellular signaling pathway involved in the FGF-2 mitogenic stimulation of the breast cancer cell line MCF-7. Immunoblot analysis of phosphotyrosyl proteins from MCF-7 cells revealed changes in the tyrosine phosphorylation of several bands. Specifically, FGF-2 induced an increase in the activation of FGFR, FRS2, Src and MAP kinase. We further detected a 30-kDa protein whose tyrosine phosphorylation was induced by FGF-2; this we identified with mass spectrometry and immunoblotting as cyclin D2.

The FGFR complement was rapidly tyrosine phosphorylated after FGF-2 stimulation of MCF-7 cells. To date, four distinct members of the FGFR family have been described (fgf or FGFR-1, bek or FGFR-2, FGFR-3 and FGFR-4) and are known to be expressed in breast cancer cells [6]. Our experiments were performed with an antibody that recognized FGFR-1, but due to the structural similarities between FGFR family members, we cannot exclude other receptor isotypes. FGFR activation by tyrosine phosphorylation leads to the direct or indirect binding of SH2 domain-containing proteins which are crucial for mitogenic intracellular signaling pathways [2]. A role for Src in FGF-2 mitogenic signal-

ing has been demonstrated [27] and members of the Src family participate in the control of a variety of cellular functions, including response to growth factors [28]. We have observed a small but significant increase of Src tyrosine phosphorylation after FGF-2 stimulation (data not shown). However, Src protein can be phosphorylated on tyrosine in an inactive as well as active state [25], so the increase of tyrosine phosphorylation that we observed after FGF-2 stimulation cannot be linked to the activation of Src tyrosine kinase activity. Using an *in vitro* kinase assay in the manner of LaVallee and co-workers [21], we demonstrated that Src kinase activity is indeed induced in MCF-7 cells by FGF-2. In addition, the pharmacological inhibition of Src that we report here using herbimycin and PP2 indicates that the tyrosine kinase activity of Src is required for the mitogenic stimulation by FGF-2 in breast cancer cells. In contrast, pharmacological inhibition of PI3 kinase activity by wortmannin caused only a slight decrease in the FGF-2 mitogenesis and had no effect on the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3; data not shown), which is known to be a direct target of this enzyme [29]. Therefore PI3 kinase does not seem to play a significant role in the FGF-2-induced proliferation of MCF-7 cells.

Downstream of the activated receptors, we observed the tyrosine phosphorylation of FRS2 in response to FGF-2 stimulation. FRS2, a membrane-anchored docking protein, has been shown to play a major role in mediating the signal from activated FGF receptors to the Ras/MAP kinase cascade. Ong et al. (2000) have recently shown that the PTB domain of FRS2 associates with the juxtamembrane region of FGFR-1 [30]. Moreover, FRS2 tyrosine phosphorylation seems to be essential for the FGF mitogenic signaling pathway because inhibition of FRS2 reduces activation of MAP kinase [31] and the lack of FRS2 tyrosine phosphorylation in MCF-7 Ras is correlated with an inhibition of the proliferation induced by FGF-2 [20]. Interestingly, FRS2 is also a substrate for the nerve growth factor (NGF) receptor p140^{TrkA} [32]. We have recently demonstrated that NGF is also mitogenic for breast cancer cells through the tyrosine kinase activity of p140^{TrkA} and the activation of the MAP kinase cascade [24]. This suggests that mitogenic stimulation of both FGF-2 and NGF requires the activation of the Ras/MAP kinase pathway in breast cancer cells. However, it should be noted that, in contrast to FGF-2, herbimycin A and PP2 do not exhibit any inhibiting activity for NGF-induced mitogenesis, whereas wortmannin does (unpublished data). These data confirm significant differences in the FGF-2 and NGF mitogenic signaling pathways despite their common requirement for the Ras/MAP kinase cascade.

The MAP kinase pathway is considered to be essential for the activation of proliferation. The MAP kinases are known to be overexpressed in human breast cancer cells and abnormalities in this signaling pathway play an important role in growth deregulation of these cells [3]. We have shown that FGF-2 mitogenic signaling does induce a transient activation of the MAP kinase cascade. A transient activation of this cascade is usually reported during mitogenic stimulation [3], although it has also been shown that constitutive MAP kinase activation (induced by Ras overexpression) can lead to an inhibition of proliferation in MCF-7 cells [33]. In our experiments, the requirement for activated MAP kinase is supported by the complete inhibition of FGF-2-induced proliferation in

the presence of the MEK inhibitor, PD98059. Activation of MAP kinase is necessary for the NGF-induced stimulation of MCF-7 cell proliferation [24] whereas mitogenic stimulation by insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is independent of the MAP kinase cascade and instead requires PI3 kinase activation [34]. These differences between IGF-1 and FGF-2 signaling indicate that the MAP kinase cascade is not always necessary for the stimulation of proliferation and that the signaling pathways used by IGF-1 and FGF-2 in breast cancer cells are clearly distinct.

The main consequence of the activation of MAP kinases is their translocation into the nucleus and the activation of transcription factors. This leads to changes in gene expression which ultimately result in the stimulation of cell proliferation. Progression through the cell cycle is under the strict control of cyclins and their catalytic subunits, the Cdks (cyclin-dependent kinases). In most cases, mitogenic factors act during the G1 phase of the cell cycle, stimulating both the proliferation of quiescent cells arrested in G0 and the progression of cycling cells through the restriction point in late G1 [35]. One link between cell cycle progression and growth factor signaling is provided by the D-type cyclins whose genes are induced as a secondary response to mitogenic stimulation [36,37]. Although changes in cyclin D synthesis and activity have been studied during cell cycle progression [38], modifications in the tyrosine phosphorylation of these proteins have not been well described. Our data indicate that a major modification of tyrosine phosphorylation induced by FGF-2 involves a 30-kDa protein that we have identified as cyclin D2. The phosphorylation of cyclin D1 on tyrosine has already been described in osteosarcoma and lung epithelial cells [39], demonstrating that cyclins can be recognized as substrates for tyrosine kinases. The tyrosine phosphorylation of cyclin D2 that we have observed does not require MAP kinase activation as it was not affected by treatment with PD98059. In contrast, Src protein is a candidate kinase for cyclin D2 phosphorylation. Indeed, Src has been shown to phosphorylate cyclin D1 *in vitro* [39] and, in our experiments, herbimycin A and PP2 decreased the tyrosine phosphorylation induced by FGF-2. Further experiments are necessary to precisely define the signaling pathway leading to cyclin D2 phosphorylation and the function of this post-transcriptional modification.

In conclusion, our data lead to the following model. In MCF-7 human breast cancer cells, the signaling pathway for FGF-2 requires FGFR and FRS2 phosphorylation, as well as Src and MAP kinase activation. In addition, FGF-2 mitogenic stimulation induces the tyrosine phosphorylation of cyclin D2, possibly through a mechanism involving Src. We therefore hypothesize that cyclin D2 phosphorylation is an important signaling event for the proliferation of breast cancer cells.

Acknowledgements: This work was supported by the *Association pour la Recherche contre le Cancer, Contrat 5360*, the *Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité du Nord*, the French Ministry of Education and the National Health and Medical Research Council of Australia. We thank Dr. D.G. Fernig (University of Liverpool, UK) and Rachel Connor (Imperial College, London) for critical reading of the manuscript and helpful discussions.

References

- [1] McKeehan, W.L., Wang, F. and Kan, M. (1998) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59, 135–176.

A.-S. Vercoutter-Edouart et al./FEBS Letters 478 (2000) 209–215

- [2] Klint, P. and Claesson-Welsh, L. (1999) *Front. Biosci.* 15, 165–177.
- [3] Lewis, T.S., Shapiro, P.S. and Ahn, N.G. (1998) *Adv. Cancer Res.* 74, 49–139.
- [4] Zetter, B.R. (1998) *Annu. Rev. Med.* 49, 407–424.
- [5] Adnane, J., Gaudray, P., Dionne, C.A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D. and Theillet, C. (1991) *Oncogene* 6, 659–662.
- [6] Penault-Llorca, F., Bertucci, F., Adélaïde, J., Parc, P., Coulier, F., Jacquemier, J., Birnbaum, D. and Delapeyrière, O. (1995) *Int. J. Cancer* 61, 170–176.
- [7] Bansal, G.S., Cox, H.C., Marsh, S., Gomm, J.J., Yiangou, C., Luqmani, Y., Coombes, R.C. and Johnston, C.L. (1997) *Br. J. Cancer* 75, 1567–1574.
- [8] Yiangou, C., Gomm, J.J., Coope, R., Law, M., Luqmani, Y.A., Shousha, S., Coombes, R.C. and Johnston, C.L. (1997) *Br. J. Cancer* 76, 1419–1427.
- [9] Blanckaert, V.D., Hebbar, M., Louchez, M.M., Vilain, M.O., Schelling, M.E. and Peyrat, J.P. (1998) *Clin. Cancer Res.* 4, 2939–2947.
- [10] Marsh, S.K., Bansal, G.S., Zammit, C., Barnard, R., Coope, R., Roberts-Clarke, D., Gomm, J.J., Coombes, R.C. and Johnston, C.L. (1999) *Oncogene* 18, 1053–1060.
- [11] Takei, Y., Kurobe, M., Uchida, A. and Hayashi, K. (1994) *Clin. Chem.* 40, 1980–1981.
- [12] Peyrat, J.P., Hondermarck, H., Louchez, M.M. and Boilly, B. (1991) *Cancer Commun.* 3, 323–329.
- [13] Briozzo, P., Badet, J., Capony, F., Pieri, I., Montcourrier, P., Barritault, D. and Rochefort, H. (1991) *Exp. Cell Res.* 194, 252–259.
- [14] Rahmoune, H., Chen, H.L., Gallagher, J.T., Rudland, P.S. and Fernig, D.G. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 7303–7310.
- [15] Delehedde, M., Boilly, B. and Hondermarck, H. (1995) *Oncol. Res.* 7, 399–405.
- [16] Fenig, E., Wieder, R., Paglin, S., Wang, H., Persaud, R., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Yahalom, J. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3, 135–142.
- [17] Johnson, M.R., Valentine, C., Basilico, C. and Mansukhani, A. (1997) *Cancer Res.* 53, 2168–2177.
- [18] McLeskey, S.W., Kurebayashi, J., Honig, S.F., Lippman, M.E., Dickson, R.B. and Kern, F.G. (1993) *Cancer Res.* 53, 2168–2177.
- [19] Zhang, L., Kharbanda, S., Chen, D., Bullocks, J., Miller, D.L., Ding, I.Y., Hanfelt, J., McLeskey, S.W. and Kern, F.G. (1997) *Oncogene* 15, 2093–2108.
- [20] Liu, J.F., Chevet, E., Kebache, S., Lemaitre, G., Barritault, D., Larose, L. and Crépin, M. (1999) *Oncogene* 18, 6425–6433.
- [21] LaVallee, T.M., Prudovsky, I.A., McMahon, G.A., Hu, X. and Maciag, T. (1998) *J. Cell Biol.* 141, 1647–1658.
- [22] Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T. and Wong, S.C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5011–5015.
- [23] Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. and Mann, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14440–14445.
- [24] Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B. and Hondermarck, H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16659–16662.
- [25] Cooper, J.A. and Howell, B. (1996) *Cell* 73, 1051–1054.
- [26] Pennington, S.R., Wilkins, M.R., Hochstrasser, D.F. and Dunn, M.J. (1997) *Trends Cell Biol.* 7, 168–173.
- [27] Landgren, E., Blume-Jensen, P., Courtneidge, S.A. and Claesson-Welsh, L. (1995) *Oncogene* 10, 2027–2035.
- [28] Parsons, J.T. and Parsons, S.J. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 187–192.
- [29] Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panayotou, G. and Waterfield, M.D. (1997) *Trends Biochem. Sci.* 22, 267–272.
- [30] Ong, S.H., Guy, G.R., Hadari, Y.R., Laks, S., Gotoh, N., Schlessinger, J. and Lax, I. (2000) *Mol. Cell Biol.* 20, 979–989.
- [31] Hadari, Y.R., Kouhara, H., Lax, I. and Schlessinger, J. (1998) *Mol. Cell Biol.* 18, 3966–3973.
- [32] Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. and Schlessinger, J. (1997) *Cell* 89, 693–702.
- [33] Liu, J.F., Issad, T., Chevet, E., Ledoux, D., Courty, J., Caruelle, J.P., Barritault, D., Crépin, M. and Bertin, B. (1998) *Eur. J. Biochem.* 258, 271–276.
- [34] Dufourny, B., Albas, J., van Teefelen, H., van Schaik, F., van der

- Burg, B., Steenberg, P.H. and Sussenbach, J.S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31163–31171.
- [35] Kato, J.A. (1999) *Front. Biosci.* 4, 787–792.
- [36] Matshushime, H., Quelle, D.E., Shurleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2066–2076.
- [37] Sherr, C.J. (1994) *Cell* 79, 551–555.
- [38] Lukas, J., Bartkova, J. and Bartek, J. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 6917–6925.
- [39] Hall, F.L., Williams, R.T., Wu, L., Carbonaro-Hall, D.A., Harper, J.W. and Warburton, D. (1993) *Oncogene* 8, 1377–1384.

ARTICLE 3

III/ ARTICLE 3**« PROTEOMIC DETECTION OF CHANGES IN PROTEIN
SYNTHESIS INDUCED BY FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2
IN MCF-7 HUMAN BREAST CANCER CELLS »**

Dans l'article précédent, nous avons caractérisé des protéines tyrosine-phosphorylées dès les premières minutes d'action du FGF-2 sur les cellules MCF-7. Ces événements intracellulaires précoces conduisent à des modifications plus tardives de l'expression de gènes et de protéines permettant la division cellulaire. Cependant très peu de données sont actuellement disponibles en ce qui concerne les protéines dont la synthèse est modifiée après action du FGF-2. Dans un premier temps, en séparant par électrophorèse bidimensionnelle les protéines marquées au ³⁵S des cellules MCF-7 stimulées ou non par le FGF-2, nous avons cartographié les protéines dont le FGF-2 induit une augmentation de synthèse. Puis en utilisant la spectrométrie de masse après digestion trypsique des protéines d'intérêt, nous avons identifié ces protéines, cibles de l'activité mitogène du FGF-2. Enfin, nous avons étudié leur distribution dans trois lignées de cellules mammaires cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-7ras) et dans les cellules épithéliales mammaires normales.

Cet article est accepté dans la revue *Experimental Cell Research*.

**Proteomic Detection of Changes in Protein Synthesis Induced
by Fibroblast Growth Factor-2 in MCF-7 Human Breast Cancer Cells.**

Vercoutter-Edouart Anne-Sophie[§], Czeszak Xavier[¶], Crépin Michel[£], Lemoine Jérôme[¶], Boilly Bénoni[§], Le Bourhis Xuefen[§], Peyrat Jean-Philippe[#] and Hondermarck Hubert^{§*}

[§] Equipe Facteurs de Croissance, UPRES-EA 1033 Biologie du Développement,

[¶] Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576 CNRS,

Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

[#] Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre de Lutte Contre le Cancer, 59020 Lille, France.

[£] Laboratoire de Recherche Oncologie Cellulaire et Moléculaire Humaine, UFR Léonard de Vinci, Université de Paris Nord, Bobigny, France.

Running title : Proteomic analysis of FGF-2 stimulation in breast cancer cells.

* To whom correspondence should be addressed. Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES-EA 1033, Batiment SN3, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Tel (33) 3 20 43 40 97. Fax : (33) 3 20 43 40 38. Email: hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

ABSTRACT

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is a potent regulator of breast cancer cell growth through stimulation of tyrosine kinase receptors and activation of the mitogen activated protein-kinase cascade. In the present study, we have investigated changes in protein synthesis induced by FGF-2 stimulation in the prototypic human breast cancer cell line MCF-7. Using high resolution two-dimensional electrophoresis of ³⁵S-amino-acid metabolically labelled proteins and computerized analysis of 2D autoradiograms, we found that four proteins were up-regulated within the first 12 hrs of FGF-2 stimulation. Mass spectrometry analysis (MALDI-TOF and MS-MS) of tryptic fragments and database searches allowed the identification of these FGF-2 regulated proteins as the heat shock proteins HSP90 and HSP70, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the transcriptionally controlled tumour protein (TCTP). We have then analyzed the distribution of these proteins in various cancerous and normal breast epithelial cells. Interestingly, the four FGF-2 regulated proteins were found to be constitutively up-regulated in ras-transfected MCF-7 cells, indicating their relevance to the up-regulation of cellular proliferation. Moreover, HSP90 and PCNA were found at higher levels in cancerous cells than in normal cells. The role of HSP90 was further investigated using the specific inhibitor geldanamycin. We showed that the functionality of HSP90 is strictly required in order to obtain FGF-2 mitogenic stimulation in MCF-7 cells, indicating the crucial role played by this molecular chaperone in the control of breast cancer cell growth. Finally, these results show that proteomic analysis is a valuable method for identifying potential markers or therapeutic targets related to cancer growth.

ABBREVIATIONS : 2D-electrophoresis, Two-dimensional electrophoresis ; DTT, Dithiothreitol ; EDTA, ethylenediamine tetracetic acid ; FGF, Fibroblast Growth Factor ; HSP, Heat Shock Protein ; IEF, Isoelectrofocalisation ; MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight ; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase ; MS, Mass Spectrometry ; PBS, Phosphate Buffer Saline ; PCNA, Proliferating Nuclear Antigen ; PMSF, Phenyl methyl sulfonyl fluoride ; TCTP, Transcriptionally Controlled Tumor Protein.

INTRODUCTION

The growth of breast cancer cells can be regulated by various growth factors that control their proliferation, apoptosis and migration [1, 2]. For example, insulin-like growth factors and epidermal growth factor stimulate the proliferation of breast cancer cells, whereas other molecules, such as transforming growth factor- β or hepatocyte growth factor, respectively inhibit their proliferation or activate their migration. Understanding the mechanism of action of these growth regulators is a key step in defining the processes of tumor initiation and progression and in developing new strategies for breast cancer prevention, detection and treatment.

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is a pleiotropic polypeptide involved in the control of cellular proliferation, differentiation, survival and migration [reviewed in 3]. The biological effects of FGF-2 are mediated through high affinity cell surface receptors (FGFR) which exhibit a ligand-induced tyrosine-kinase activity, stimulating the recruitment of several signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase cascade [reviewed in 4]. This signaling leads to modification of transcriptional activities and ultimately to changes in protein synthesis, resulting in modulation of cellular growth. In breast cancer, several studies report the presence of FGF family members and their receptors in human breast cancer cell lines and in tumor biopsies [5-11]. We and others have previously shown that FGF-2 is a strong mitogen for the prototypic breast cancer cell line MCF-7 [12-15]. Under other experimental conditions, FGF-2 has been described to inhibit breast cancer cell growth [16, 17], underlining the pleiotropic activities of this growth factor. However, MCF-7 cells transfected with FGFs progress towards an aggressive and metastatic phenotype, supporting the idea of a role for FGFs in the stimulation of mammary tumor growth [18, 19]. Liu et al [20] have demonstrated that the induction of MCF-7 cell proliferation by FGF-2 requires a transient activation of the ras/MAPK cascade and an intact Rac-1 and Nck signaling network. However,

to date the consequences of FGF-2 signaling in terms of modification of gene expression and protein synthesis leading to cellular proliferation remains largely unknown.

To further understand the intracellular events leading to FGF-2 mitogenic stimulation, we have investigated changes in protein synthesis induced in MCF-7 cells using high resolution two-dimensional electrophoresis. This methodology has been considerably improved over the last few years to allow sensitive detection of individual protein changes studied from a total cell extract. 2D-electrophoresis sensitivity and reproducibility have been increased and have been complemented by the possibility of characterizing picoquantities of polypeptides using mass spectrometry analysis. Based on genomic information, database searching allows the identification of proteins from the fingerprint and amino-acid sequence obtained by mass spectrometry [reviewed in 21]. The use of proteomic analysis for studying the mechanism of action of growth factors has been initiated with pheochromocytoma PC12 cells [22]. In these cells, protein synthesis induced by the differentiating activity of nerve growth factor has been compared to the mitogenic activity of epidermal growth. More recently, changes in protein phosphorylation have been investigated for platelet-derived growth factor stimulation of mouse fibroblast NIH 3T3 cells [23]. Concerning breast epithelial cells, proteomic analyses have already been performed [24-27], but to date nothing has been done to investigate changes in protein synthesis induced by growth factors.

Our results show that the major changes in protein synthesis induced by FGF-2 consist of the up-regulation of heat shock proteins HSP90 and HSP70, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and TCTP (translationally controlled tumor protein). Interestingly, these four FGF-2-regulated proteins were found to be constitutively up-regulated in ras-transfected MCF-7, indicating their relevance to the activation of cellular proliferation in transformed cells. In addition, we have observed that inhibition of HSP90 activity impaired the mitogenic effect of FGF-2, showing that there is a requirement for this molecular chaperone in the mitogenic stimulation of breast cancer cells.

MATERIAL AND METHODS

Materials. FGF-2 was from Amersham (France). The inhibitors, cycloheximide and geldanamycin, were purchased from Sigma (France). Modified trypsin was from Promega (France). All cell culture products were from BIO Witter (Belgium), except insulin (Organon, France), fibronectin (Falcon-Biocoat, France) and transferrin (Sigma, France). The Petri-dishes were purchased from Greiner (Fisher, France). The monoclonal HSP90 antibody (SPA-830) was from StressGen (Tebu, France). All the 2-D electrophoresis reagents were purchased from ESA (Coger, France).

Cell culture. Human breast cancer epithelial cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) were obtained from the American Type Culture Collection. They were cultured as previously described [14] in Minimal Essential Medium (Earle's salts) supplemented with 20 mM HEPES, 2 g/l sodium bicarbonate, 10% fetal calf serum (FCS), 1% non-essential amino acids, 2 mM L-glutamin, 5 µg/ml insulin, 40 U/ml penicillin-streptomycin, 50 µg/ml gentamycin. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Normal breast epithelial cell cultures were established as described previously [28] from reduction mammoplasties (women aged 20-40 years) obtained in the Department of plastic surgery (Dr. Pellerin) of the Medical University of Lille (France). The MCF-7_{ras} cell line, established by transfection of v-Ha-Ras cDNA in MCF-7 cells [29] was a gift from Dr Sommers. Cells were grown in the same condition than MCF-7 cells.

Cell growth assay. MCF-7 cells were seeded at 30,000 cells/ml in 35-mm dishes in a complete medium (described above). When 40% confluence was reached, cells were washed twice and starved in a serum-free medium containing fibronectin (2 µg/ml) and transferrin (30 µg/ml) for 24 hrs. Cells were then treated for 48 hrs with FGF-2 (10 ng/ml) in fresh serum-free medium. Following treatment, the cell number increase was determined using an hemocytometer after trypsinization of the monolayer culture with 0.25% trypsin/EDTA solution. In presence of FGF-2, MCF-7 cells were treated with cycloheximide (0.5 µg/ml) or

the benzoquinone ansamycin, geldanamycin (2-50 nM). Geldanamycin binds to HSP90 and disrupts multimolecular complexes containing signaling proteins [30]. The absence of toxicity was verified by testing the same concentration of geldanamycin or cycloheximide against cells in serum free medium.

Metabolic labeling and sample preparation for 2D-electrophoresis. For metabolic labeling, cells were plated in 35-mm dishes at 60,000 cells/ml of complete medium. When 60% confluence was attained, the cells were washed twice with serum-free medium (MEM) and then placed in serum-free medium (MEM) containing no cysteine or methionine (ICN, France). After 24 hrs in this medium, cells were labelled for 12 hrs with Trans ³⁵S-label (ICN Biomedicals, Belgium) at 50 μ Ci/ml in presence or in absence of 10 ng/ml FGF-2. For unlabelled protein preparation, cells were plated in 100-mm dishes at 500,000 cells per dish in complete medium and were starved for 24 hrs in serum-free medium when they reached 60% confluence. Samples were prepared as previously described [22]. Briefly, at the end of the labeling period, medium was removed and the cells rinsed in ice-cold PBS. Cells were lysed on ice with lysis buffer containing 0.3% SDS and 1% 2 β -mercaptoethanol. After boiling for 5 min and centrifugation (2 min at 10,000 x g), the supernatant was diluted 1:2 with IEF buffer (9.5 M urea, 0.8% Nonidet P-40, 10% 2 β -mercaptoethanol, 2% 3-10 and 4-8 ampholytes and bromophenol blue). The samples were snap frozen and stored at -80°C.

2D-electrophoresis. 2D electrophoresis was performed as previously described [22] with the Investigator 2D Electrophoresis System from ESA (France). The equivalent of 10⁶ cpm of ³⁵S-labelled proteins (10-30 μ l of sample) were separated by isoelectric focusing (IEF) in rod gels (1 mm x 26 cm) containing 9.5 M urea, 3% acrylamide, bis-acrylamide 0.22%, 2% triton X100, 2% pH 4-8 and 2% pH 3-10 carrier ampholytes. The separation was performed at 20,000 Volt Hours and 110 μ A over 17h30 min. After IEF, the gels were equilibrated twice for 2 min in 0.3 M Tris Base, 0.075 M Tris HCl, 3% SDS, 50 mM DTT and 0.01% bromophenol blue. The second dimensional separation was performed using 10% SDS-PAGE (1mm, 20x20 cm) and the migration lasted 5 hrs at 20,000 mW. After 2D

electrophoresis, the proteins were detected by silver-staining. Following staining, gels were dried and exposed to autoradiography (X-Omat AR Kodak, Sigma). For preparative 2D electrophoresis, 0.5 to 1 mg of protein was separated by IEF as described above (3 mm x 26 cm gels at 500 μ A). The IEF gels were then equilibrated twice, for 20 min in the equilibration buffer. After electrophoresis, the gels were stained in 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 (Millipore) in 50% methanol and 10% acetic acid.

Computer analysis. Both gels and autoradiograms were scanned (scanner SM3, Pharmacia) using the Diversity One program (Pharmacia) and analysed using the MELANIE II program (BIORAD) on a SUN-SPARC station. Molecular masses and pI were determined after comparison with reference gels in the SWISS-2DPAGE (Expasy) database (<http://expasy.ch/>).

Mass spectrometry analysis.

The spots that we have found to be regulated by FGF-2 were characterized by mass spectrometry (MALDI-TOF and MS-MS) after trypsin digestion.

In-gel tryptic digestion. Coomassie-blue stained proteins corresponding to the FGF-2 regulated spots were cut from the gel and washed with 400 μ l of a 125 mM ammonium carbonate/acetonitrile (ACN) 1:1 (v/v) solution. The wash solution was discarded and the pieces of gel were dried at room temperature. Enzymatic cleavage was initiated by first reswelling the gel in ammonium carbonate solution (125 mM), then adding 50 mM acetic acid and finally digestion was initiated by adding 50 mM acetic acid containing 7-7.5 units of trypsin (Promega). After absorption of the protease solution, aliquots of pure water were added sequentially. The digestion was carried out for 12-16 hrs at 37 °C. The resulting peptides were recovered through extraction with a solution containing 45% acetonitrile and 10% formic acid. To recover very hydrophobic peptides, an extraction with 95% acetonitrile, 5% formic acid was performed. The final extract was dried using a Speed Vac-concentrator (Savant).

Desalting of the peptides mixtures. Desalting columns were prepared and operated essentially as previously described [31]. About 1 μ l of poros oligo R2 (Perseptive

Biosystems, Framingham MA) was placed in a gel loader tip (Eppendorf) and equilibrate with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The dried peptide mixture was resuspended in 5 μ l of 0.1% TFA, then applied to the column, and washed three times with 20 μ l of 0.1% TFA. Peptides were eluted with 5 μ l of methanol/H₂O (1:1) containing 0.1% TFA. The resulting eluate was analysed using both MALDI-TOF and nanospray mass spectrometry.

MALDI-TOF Mass Spectrometry. MALDI-TOF analyses of tryptic digests were performed using a Vision 2000 (Finnigan, Bremen) instrument equipped with a 337 nm nitrogen laser. The instrument operated in reflector positive mode at an accelerating voltage of 6 kV. Peptides were resuspended in 5 μ l of H₂O containing 0.1% TFA of which 0.5 μ l were mixed directly onto the target with 0.5 μ l of 2,5 dihydroxy benzoic acid matrix solution (10 mg/ml in CH₃OH/H₂O (7:3)). Mass measurements were realised from spectrum resulting from 30 to 50 laser shots after peak smoothing and internal calibration using the average mass of the two autolysis trypsin fragments at m/z 843.01 and 2212.42.

Nanospray tandem Mass Spectrometry (nanospray MS-MS). Nanospray in the MS-MS mode was performed using a Quattro II triple quadrupole (Q1qQ2) instrument (Micromass, Manchester) fitted with a nanoelectrospray modified source. Needles for electrospraying were stretched using a micropipette puller (Puller PIP5, Heka, Sega, France) from 680 μ m internal diameter borosilicate capillaries (Kwik-Fil, World Precision Industry). Dried protein digests were redissolved in 5 μ l of 1% formic acid in methanol/H₂O (1:1). Q1 was set to transmit a mass window of 3 Da, collision gas was tuned using argon at a 2.5-3.5 10^{-3} mbar gas pressure, and collision energy setting for product ion scans was between 20 and 30 eV.

Database Searching. Proteins were identified according to both their tryptic peptide mass fingerprint (MALDI-TOF) and their sequence (MS-MS) after database searching performed using Protein Prospector (<http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/mshome3.2.htm>).

Western-blot detection of HSP90. Cells were seeded in 100-mm dishes at 500,000 cells per dish. They were grown to 60% confluence and then starved in serum-free medium for 24 hrs. After treatment for 6 hrs with 20 nM geldanamycin or 1 μ g/ml cycloheximide, FGF-2 was directly added to the medium (10 ng/ml) for 10 min. Cells were

rinsed with cold PBS containing 100 μ M orthovanadate and lysed in immunoprecipitation lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% nonidet P-40, supplemented with inhibitors (orthovanadate, PMSF, and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ at 1 mM, leupeptin and aprotinin at 10 μ g/ml, pepstatin at 1 μ g/ml). After centrifugation, the supernatants were stored at -80°C . After SDS-PAGE and transfer onto nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell), the membranes were immersed in blocking phosphate-buffer-saline- 0.1% Tween-20 (PBST) containing 5% fat free dried milk at room temperature for 2 hrs, then incubated overnight at 4°C with anti-HSP90 (1/1000). The membranes were then incubated with the horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Santa Cruz, France) for 1 h and after washes in PBST, detection was performed by enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham).

RESULTS

2D-electrophoresis protein profile of FGF-2 stimulated MCF-7 cells and spot identification by mass spectrometry. The synthesis of individual proteins induced by FGF-2 in MCF-7 cells was analyzed by 2D-electrophoresis after incorporation of ^{35}S -amino-acids for 12 hrs (10^6 cpm of ^{35}S -labelled proteins per gel and for each condition). The autoradiograms obtained for control unstimulated cells and for FGF-2 stimulated cells are shown in figure 1. About 1,000 spots on each autoradiogram were sufficiently intense and well defined to be compared. Variations induced by FGF-2 have been detected using the MELANIE-II software package. The reproducibility of 2D gel analysis has already been described [32, 22] and in our present study, the coefficient of variation for 50 well-defined spots (which were not found to be regulated by FGF-2) has been calculated in five different gels. The result of this statistical analysis is presented in figure 2A and show that the coefficient of variation for the unregulated proteins was always between 0.4 and 36%. Consequently, we have considered a variation of at least 100% in spot intensity to be significant. Four spots were found to be regulated by FGF-2 and have been indicated in figure 1B. The identity of these polypeptides was determined after trypsin digestion and analysis using MALDI-TOF and tandem mass spectrometry (MS-MS). MALDI-TOF allowed the establishment of a mass fingerprint of the protein whereas MS-MS was used to obtain a micro-sequence of amino-acids. The information compiled about the fingerprint, the sequence Tag, the molecular mass and the isoelectric point of the protein were used for database searching. To illustrate the process of identification, the MALDI-TOF and MS-MS spectra obtained for HSP90 are shown in figure 3. The results of database searching (according to mass fingerprint, sequence Tag, pI, molecular mass) are presented in table 1 and allowed the identification of the heat shock proteins HSP90 and HSP70, the proliferating nuclear antigen (PCNA) and the transcriptionally controlled tumor protein (TCTP). The results of the quantitative analysis of these FGF-2 regulated proteins are presented in figure 2B. FGF-2 induced a two-fold increase in synthesis of HSP90 and HSP70. The relative intensity of PCNA and TCTP was increased in presence of FGF-2 by 4 times and 5 times respectively.

Distribution of FGF-2 regulated proteins in various breast epithelial cells. The spots corresponding to HSP90, HSP70, PCNA and TCTP were quantified in 2D autoradiograms of ^{35}S -labelled proteins from normal breast epithelial cells (NBEC), ras-transfected MCF-7 cells (MCF-7ras) and MDA-MB-231 cells which are highly metastatic breast cancer cells. For each cell type, the same quantity of radioactivity (10^6 cpm of ^{35}S -labelled proteins) was subjected to 2D electrophoresis and the resulting 2D gels were analyzed using MELANIE II program. Result of the quantification are presented in figure 4. All FGF-2 regulated proteins were found to be up-regulated in MCF-7ras cells when compared to the non transfected cells. HSP90 and PCNA were found to be at a higher level in breast cancer cell lines than in normal cells. In contrast, TCTP was found at a higher level only in MCF-7ras cells. It should be noted that HSP90, HSP70, TCTP and PCNA were not regulated by FGF-2 in normal cells, in MDA-MB-231 or MCF-7ras cells (data not shown), none of which are stimulated to proliferate by this growth factor.

Implication of HSP90 in FGF-2 induced proliferation. As shown in figure 5A, FGF-2 induced an increase in MCF-7 cell number, confirming the mitogenic effect of this growth factor. The increase of proliferation induced by FGF-2 was completely inhibited by cycloheximide (0.5 $\mu\text{g/ml}$) which is reported to be an inhibitor of protein translation in breast cancer cells [33]. The inhibition of mitogenesis observed in presence of cycloheximide shows that *de novo* protein translation is required for FGF-2 stimulation of proliferation. In parallel, treatment in a serum-free medium did not modify the basal level of proliferation indicating that the concentrations used were not toxic (data not shown). Geldanamycin binds to the N-terminal domain of HSP90 and disrupts signaling pathways by inducing destabilisation of the complexes formed between HSP90 and its partners, leading to the subsequent degradation of signaling intermediates by the proteasome [29]. We used geldanamycin to establish if HSP90 was involved in the FGF-2 signaling pathway in MCF-7 cells. We found that geldanamycin inhibited the mitogenic effect of FGF-2 ; the dose-response of this compound is presented in figure 5A. The EC_{50} is about 8 nM and a complete inhibition of FGF-2-induced proliferation was observed at 20 nM (the basal rate of proliferation was not affected at these

concentrations). As shown in figure 5B, the increased level of HSP90 observed after 6 hrs of FGF-2 stimulation was not affected by geldanamycin. In contrast, cycloheximide inhibited the increase in HSP90 level induced by FGF-2. This shows that the up-regulation of HSP90 synthesis, observed after stimulation of MCF-7 cells by FGF-2, requires *de novo* protein synthesis and that geldanamycin does not interfere with this synthesis. Altogether, these results indicate that the functionality of HSP90 is required for the FGF-2-induced proliferation of MCF-7 cells.

DISCUSSION

In the present study, we have used proteomic analysis to study changes in protein synthesis induced by the mitogenic stimulation of MCF-7 breast cancer cells by FGF-2. Our data indicate that FGF-2 induces various modifications of protein synthesis and the inhibition of FGF-2 induced cellular proliferation, observed in the presence of cycloheximide, suggests that *de novo* protein synthesis is necessary to achieve this mitogenic effect. The requirement of protein synthesis for growth factor activity is in accordance with what has been shown in case of PC12 cell stimulation by nerve growth factor [34]. In MCF-7 cells, we have been able to detect four proteins whose synthesis is up-regulated by FGF-2. From a quantitative point of view, these four modifications of individual protein synthesis represent only a small proportion among the 1,000 spots that are defined in each 2D gel. In addition, no decrease in spot intensity was found after FGF-2 stimulation. Similarly, for pheochromocytoma PC12 cells, changes in only 12 proteins were detected during mitogenic stimulation by epidermal growth factor [22]. Therefore, mitogenic stimulation of PC12 and breast cancer cells seems to require a limited number of modifications to protein synthesis suggesting that these cancerous cells are already programmed for growth in terms of protein content. It should be highlighted that in spite of recent progress in 2D electrophoresis technology, the capacity of separation and the sensitivity of spot detection do not allow access to all the proteins expressed by a cell type. Therefore, it should be emphasized that other variations induced by FGF-2 might not have been detected in our experiments.

Mass spectrometry characterization led to the identification of the four FGF-2 regulated proteins as the HSP90, HSP70, TCTP and PCNA. Interestingly, no change in these four proteins was observed after exposure to FGF-2 in normal breast epithelial cells or in MDA-MB-231 neither of which are stimulated to grow by this factor [35-37]. In addition, these four proteins were also found constitutively up-regulated in ras-transfected MCF-7 cells, in which the ras/MAPK pathway is overactivated. Altogether, these data clearly show the relevance of the proteins that we have identified for the stimulation of breast cancer cell growth. This is

emphasised by the fact that we have detected up-regulation of PCNA, a nuclear cofactor of DNA polymerase delta, which is extensively used as a marker for proliferation [reviewed in 38]. It has been evidenced that PCNA is rapidly induced by mitogenic factors, and using immunocytochemistry, we have previously detected its up-regulation by FGF-2 in breast cancer cells [14]. In the present study, we have found higher level of PCNA in cancerous cells than in normal cells and it is noticeable that PCNA was found at the highest level in MDA-MB-231 cells, which also exhibit the highest rate of proliferation. This confirms the relationship between proliferation and PCNA level in breast cancer cells.

Transcriptionally controlled tumor protein (TCTP) was initially described as a tumour related polypeptide in mouse ascetic tumour and erythroleukaemic cells [39, 40], but it has more recently been found in other tumourous cells as well as in normal human cells [41]. Despite its ubiquity and high level of conservation, the physiological role of TCTP remains to be elucidated. Synthesis of TCTP is under translational control [42], but it has recently been demonstrated that its expression is also regulated at the transcriptional level [43]. Expression of TCTP has been shown to be regulated by serum, PMA and gamma-interferon [44, 45], suggesting that its regulation may be related to cellular proliferation. However, regulation of TCTP by FGF-2 has not been reported before, and the up-regulation that we observe in MCF-7 cells suggests that this protein may be involved in breast cancer cell growth, indicating the need to further explore its role in mammary carcinogenesis.

Two of the FGF-2 regulated proteins that we identified belong to the Heat Shock Protein family (HSP). Originally identified as proteins involved in protection against thermal stress, HSPs have emerged as a group of molecular chaperones involved in several basic biological functions [reviewed in 46]. In our 2D-electrophoresis experiments, we found that HSP90 and HSP70 were up-regulated by FGF-2. Previous studies using other mammalian cells have shown that mitogens such as insulin-like growth factor or epidermal growth factor,

increase synthesis and accumulation of HSP90 and HSP70 [47-49]. We demonstrate here that synthesis of HSP90 and HSP70 are both up-regulated after FGF-2 stimulation. In addition, the inhibition of FGF-2 mitogenic activity that we have observed in presence of geldanamycin, an inhibitor of HSP90 activity, suggests that the function of this molecular chaperone is necessary for the stimulation of proliferation. HSP90 can exist in complex with components of the growth factor signaling pathway : tyrosine kinase receptors, Src, Raf or MAP-kinase-kinase [29] and its interaction with these signaling proteins allows for their protection and correct conformational folding. It should also be noted that steroid hormone receptors are also substrates for HSP90, and that the function of these receptors is inhibited by geldanamycin [50]. Thus, involvement of HSP90 in FGF-2 stimulation of proliferation suggests that appropriate protein folding and trafficking are essential processes for the regulation of breast cancer cell growth. Together with the fact that we found a higher level of HSP90 in cancerous cells than in normal breast epithelial cells, these data emphasize the idea that expression of this protein is related to the cancerisation of breast epithelial cells and this points out the interest of HSP90 as a potential therapeutic target for breast cancer treatment.

In conclusion, the characterization of proteins regulated by FGF-2 provides new information on the molecular events leading to breast cancer cell growth. Further clinical investigation would now be required to determine the functional implication of these proteins as well as their potential uses for breast cancer detection and / or treatment. Finally, our study shows that proteomic analysis is a valuable methodology for evidencing modifications in proteins related to the mechanism of tumour growth, and this approach opens the way of defining potential markers and therapeutic targets for the treatment of this pathology.

Acknowledgements : This work was supported « Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), contrat 5360 ». ASV and XC were financially supported by the French Ministry of Research and Education. We thank Rachel Connor (Imperial College, London) for critical reading of the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

1. Ethier, S. P. (1995). Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 964-973.
2. Le Bourhis, X., Toillon, R. A., Boilly, B. and Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **1722**, 1-8.
3. McKeehan, W. L., Wang, F. and Kan, M. (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 135-176.
4. Klint, P. and Claesson-Welsh, L. (1999). Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci.* **15**, D165-177.
5. Adnane, J., Gaudray, P., Dionne, C. A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D. and Theillet, C. (1991). BEK et FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* **6**, 659-662.
6. Peyrat, J. P., Bonnetterre, J., Hondermarck, H., Hecquet, B., Adenis, A., Louchez, M. M., Lefebvre, J., Boilly, B. and Demaille, A. (1992). Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF): mitogenic activity and binding sites in human breast cancer. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**, 87-94.
7. Luqmani, Y. A., Graham, M. and Coombes, R. C. (1992). Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer* **66**, 273-280
8. Penault-Llorca, F., Bertucci, F., Adélaïde, J., Parc, P., Coulier, F., Jacquemier, J., Birnbaum, D. and Delapeyrière, O. (1995). Expression of FGF and FGF receptors genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer* **61**, 170-176.
9. Bansal, G. S., Cox, H. C., Marsh, S., Gomm, J. J., Yiangou, C., Luqmani, Y., Coombes, R. C. and Johnston, C. L. (1997). Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer. *Br. J. Cancer* **75**, 1567-1574.
10. Blanckaert, V. D., Hebbar, M., Louchez, M. M., Vilain, M. O., Schelling, M. E. and Peyrat, J. P. (1998). Basic fibroblast growth factor receptors and their pronostic value in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2939-2947.

11. Marsh, S. K., Bansal, G. S., Zammit, C., Barnard, R., Coope, R., Roberts-Clarke, D., Gomm, J. J., Coombes, R. C. and Johnston, C. L. (1999). Increased expression of fibroblast growth factor-8 in human breast cancer. *Oncogene* **18**, 1053-1060.
12. Peyrat, J. P., Hondermarck, H., Louchez, M. M. and Boilly, B. (1991). Demonstration of basic Fibroblast Growth Factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer Comm.* **3**, 323-329.
13. Briozzo, P., Badet, J., Pieri, I., Montcourrier, P., Barritault, D. and 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.
14. Delehedde, M., Boilly, B. and Hondermarck, H. (1995). Differential responsiveness of human breast cancer cells to basic Fibroblast Growth Factor. A cell kinetic study. *Oncology Res.* **7**, 399-405.
15. Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S. and Fernig, D. G. (1998). Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparansulfate. *J. Biol. Chem.* **273**, 7303-7310.
16. Fenig, E., Wieder, R., Paglin, S., Wang, H., Persaud, R., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Yahalom, J. (1997). Basic fibroblast growth factor confers growth inhibition and mitogen-activated protein kinase activation in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **3**, 135-142.
17. Johnson, M. R., Valentine, C., Basilico, C. and Mansukhani, A. (1997). FGF signaling activates STAT1 and p21 and inhibits the estrogen response and proliferation of MCF-7 cells. *Cancer Res.* **57**, 1750-1757
- 18; McLeskey, S. W., Kurebayashi, J., Honig, S. F., Lippman, M. E., Dickson, R. and Kern, F. G. (1993). Fibroblast growth factor-4 transfection of MCF-7 cells produces cell line that are tumorigenic and metastatic in ovariectomized or tamoxifen-treated athymic nude mice. *Cancer Res.* **53**, 2168-2177.
19. Zhang, L., Kharbanda, S., Chen, D., Bullocks, J., Miller, D. L., Ding, I. Y., Hanfelt, J., McLeskey, S. W. and Kern, F. G. (1997). MCF-7 breast carcinoma cells

overexpressing FGF-1 form vascularized, metastatic tumors in ovariectomized or tamoxifen-treated nude mice. *Oncogene* **15**, 2093-2108.

20. Liu, J. F., Chevet, E., Kebache, S., Lemaitre, G., Barritault, D., Larose, L. and Crépin, M. (1999). Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2-induced DNA synthesis in MCF-7 cells. *Oncogene* **18**, 6425-6433.
21. Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D.F. and Dunn, M. J. (1997). Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends Cell Biol.* **7**, 168-173.
22. Hondermarck, H., McLaughlin, C. S., Patterson, S. D. and 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.
23. Soskic, V., Görlach, M., Poznanovic, S., Boehmer, F. D. and Godovac-Zimmermann, J. (1999). Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor β receptor. *Biochem.* **38**, 1757-1764.
24. Franzen, B., Linder, S., Alaiya, A. A., Eriksson, E., Uruy, K., Hirano, T., Okusawa, K. and Auer, G. (1996). Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions : down-regulation of cytokeratins. *Br. J. Cancer* **73**, 1632-1638.
25. Bini, L., Magi, B., Marzocchi, B., Arcuri, F., Tripodi, S., Cintorino, M., Sanchez, J. C., Frutiger, S., Hughes, G., Pallini, V., Hochstrasser, D. F. and Tosi, P. (1997). Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* **18**, 2832-2841.
26. Williams, K., Chubb, C., Huberman, E. and Giometti, C. S. (1998). Analysis of differential protein expression in normal and neoplastic human breast epithelial cell lines. *Electrophoresis* **19**, 333-343.
27. Page, M. J., Amess, B., Townsend, R. R., Parekh, R., Herath, A., Brusten, L., Zvelebil, M. J., Stein, R. C., Waterfield, M. D., Davies, S. C. and O'Hare, M. J. (1999). Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12589-12594.

28. Dong-Le Bourhis, X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M. and 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.
29. Sommers, C. L., Papageorge, A., Wilding, G. and Gelmann, E. P. (1990). Growth properties and tumorigenesis of MCF-7 cells transfected with isogenic mutants of rasH. *Cancer Res.* **50**, 67-71.
30. Pratt, W. P. (1998). The hsp90-based chaperone system: Involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 420-434.
31. Kussmann, M., Nordhoff, E., Rahbek-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-Larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kroll-Kristensen, A., Palm, L. and Roepstorff, P. (1997). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.* **32**, 593-601.
32. Garrels, J. I. (1989). The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *J. Biol. Chem.* **264**, 5269-5282.
33. Vadlamudi, R., Adam, L., Tseng, B., Costa, L. and Kumar, R. (1999). Transcriptional up-regulation of paxillin expression by heregulin in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **59**, 2843-2846.
34. Burstein, D. E., and Greene, L. A. (1978). Evidence for RNA synthesis-dependent and -independent pathways in stimulation of neurite outgrowth by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 6059-6063.
35. Li, S. and Shipley, G. D. (1991). Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells in culture. *Cell Growth Differ.* **2**, 195-202.
36. Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. (1996). Heparan sulfate proteoglycan play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* **229**, 398-406.

37. Fernig, D. G., Chen, H. L., Rahmoune, H., Descamps, S., Boilly, B. and Hondermarck, H. (2000). Differential regulation of FGF-1 and FGF-2 mitogenic activity is related to their kinetics of binding to heparan sulfate in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **267**, 770-776.
38. Kelman, Z. (1997). PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-640.
39. Yenofski, R., Cereghini, S., Krowczynska, A. and Brawerman, G. (1983). Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1197-1203.
40. Chitpatima, S. T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R. and Brawerman, G. (1988). Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2350.
41. Sanchez, J. C., Schaller, D., Ravier, F., Golaz, O., Jaccoud, S., Belet, M., Wilkins, M. R., James, R., Deshusses, J. and Hochstrasser, D. (1997). Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several non tumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* **18**, 150-155.
42. Bommer, U. A., Lazaris-Karatzas, A., De Benedetti, A., Nurnberg, P., Benndorf, R., Bielka, H. and Sonenberg, N. (1994). Translational regulation of the mammalian growth-related protein P23. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 633-641.
43. Xu, A., Bellamy, A. R. and Taylor, J. A. (1999). Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem. J.* **342**, 683-689.
44. Bohm, H., Bennhorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nurnberg, P., Kraft, R., Otto, A. and Bielka, H. (1989). The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor : translational control, cloning and primary structure. *Biochem. Int.* **19**, 277-286.
45. Walsh, B. J., Gooley, A. A., Williams, K. L. and Breit, S. N. (1995). Identification of macrophage activation associated proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 507-512.
46. Mayer, M. P. and Bukau, B. (1999). Molecular chaperones: The busy life of Hsp90. *Current Biol.* **9**, R322-R325.

47. Wu, B. J. and Morimoto, R. I. (1985). Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6070-6074.
48. Ferris, D. K., Harel-Bellan, A., Morimoto, R. I., Welch, W. J. and Farrar, W. L. (1988). Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3850-3854.
49. Jerome, V., Leger, J., Devin, J., Baulieu, E. E. and Catelli, M. G. (1991). Growth factors acting via tyrosine kinase receptors induce HSP90 alpha gene expression. *Growth Factors* **4**, 317-327.
50. Segnitz, B. and Gehring, U. (1997). The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound Geldanamycin. *J. Biol. Chem.* **272**, 18694-18701.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FGF-2 effect on the 2D-electrophoresis profile of ³⁵S-labelled proteins of MCF-7 cells. MCF-7 cells were seeded in 35-mm dishes at 60,000 cell per dish and when they attained 60% confluence, they were starved for 24 h in a serum-free medium containing neither methionine nor cysteine. Then MCF-7 cells were or were not stimulated with 10 ng/ml FGF-2 for 12 hrs in presence of ³⁵S-amino acids at 50 μ ci/ml, and then lysed in a buffer containing 0.3% SDS and 1% β -mercapto-ethanol. 10^6 cpm of ³⁵S-labelled protein were separated on 2D-gels. After electrophoresis, the gels were dried and exposed to autoradiography for 10 weeks. Panel (A) represents the unstimulated MCF-7 cells and panel (B) the FGF-2 stimulated MCF-7 cells. Molecular masses (kDa) and isoelectric point (pI) were determined using the SWISS-2D-PAGE database.

Figure 2. Quantitative analysis of modifications induced by FGF-2 in MCF-7 cells. 10^6 cpm of ³⁵S-labelled proteins of MCF-7 cells (stimulated or not by FGF-2) were loaded on 2D gel. A) Coefficient of variation for spots unregulated by FGF-2. The coefficient of variation of 50 well-defined spots was calculated from the analysis of all categories of gels used (control and FGF-2 stimulated conditions). B) Quantitative analysis of spots regulated by FGF-2.

Figure 3. MALDI-TOF and MS-MS spectra obtained for HSP90. Spectra obtained for HSP90 are presented here. MCF-7 cell proteins were separated by 2D-electrophoresis and stained using the Coomassie-blue dye. The spot was cut from the 2D gel and subjected to tryptic digestion. Peptide fragments were analyzed by MALDI-TOF (A) and tandem mass spectrometry analysis of peak m/z 1515.0 was performed (B). Database searching allowed the identification of HSP90 as reported in table 1.

Figure 4. Quantification of FGF-2 regulated proteins in various breast epithelial cells. 2D electrophoresis was performed on ³⁵S-radiolabelled proteins of Normal breast epithelial cells (NBEC) and breast cancer cell lines MCF-7, MCF-7ras and MDA-MB-

231. For each cell type, 10^6 cpm of ^{35}S -labelled proteins were subjected to 2D electrophoresis. Relative intensities of HSP90, HSP70, PCNA and TCTP were determined after computerized analysis using the MELANIE II software package.

Figure 5. Implication of HSP90 in FGF-2 mitogenic stimulation of MCF-7 cells. (A) Effect of cycloheximide and geldanamycin on FGF-2 mitogenic stimulation. MCF-7 cells were seeded as previously described in figure 1. Starved cells were then stimulated by FGF-2 (10 ng/ml) in presence of various concentrations of cycloheximide (0.5 $\mu\text{g/ml}$) or geldanamycin (2, 5, 10, 20, 50 nM) for 48 hrs. Cell number increase was determined by cell counting. Values represent means of 3 experiments realized in duplicate. (B) Western-blot analysis of HSP90. MCF-7 cells were grown in complete medium in 100-mm dishes until they reached 60% confluence and then made quiescent for 24 hrs in a serum-free medium. Cells were stimulated by FGF-2 (10 ng/ml) in presence of geldanamycin (20 nM), or cycloheximide (1 $\mu\text{g/ml}$) for 6 hours and lysed. 50 μg of total protein from cell lysates were loaded on 7.5 % SDS-PAGE and western-blot detection was done using anti-HSP90 revealed by ECL.

Table 1. Mass spectrometry (MALDI-TOF and MS-MS) identification of FGF-2 regulated proteins. The regulated spots were cut from the 2D gels and subjected to in gel trypsin digestion prior to mass spectrometry analysis as reported in Material and methods section.

- a) MM and pI were obtained from 2D gel analysis.
- b) Accession numbers are from the Swiss-Prot database.
- c) The molecular masses of ions obtained by MALDI-TOF are indicated in Daltons.
- d) The sequences, indicated in bold, were obtained by nanoelectrospray MS/MS from the underlined parent ions.

Figure 1

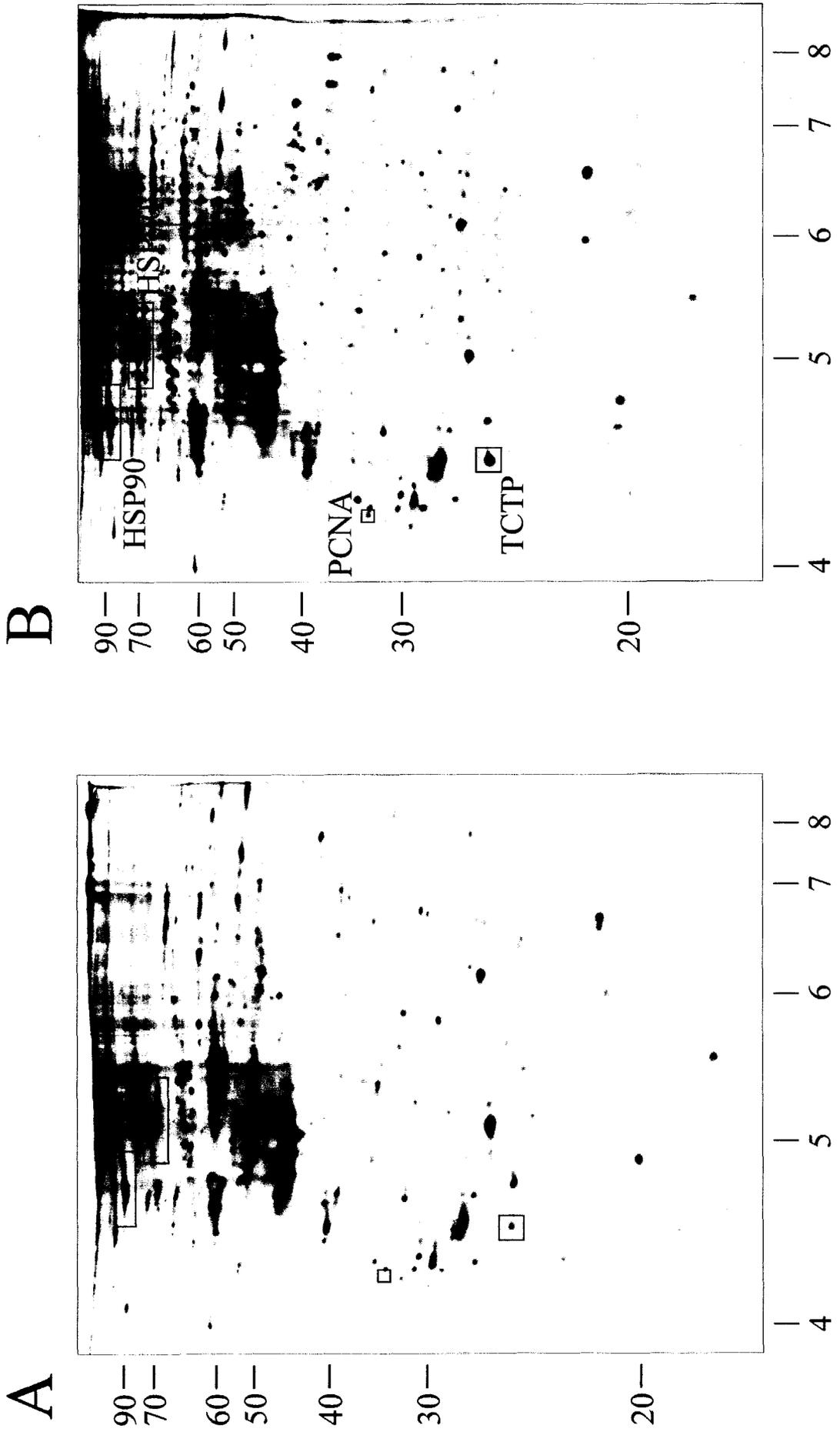


Figure 2

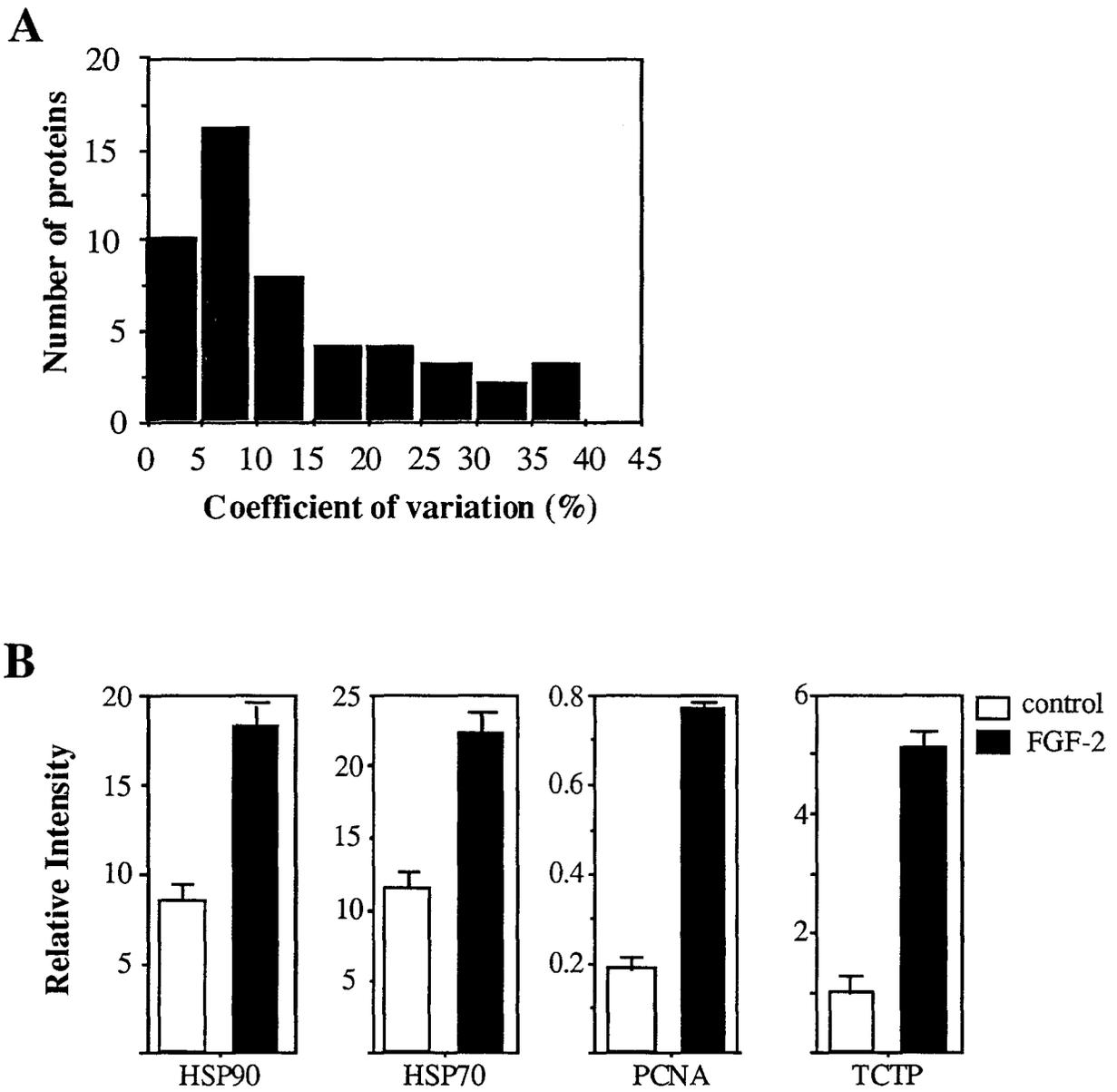


Figure 3

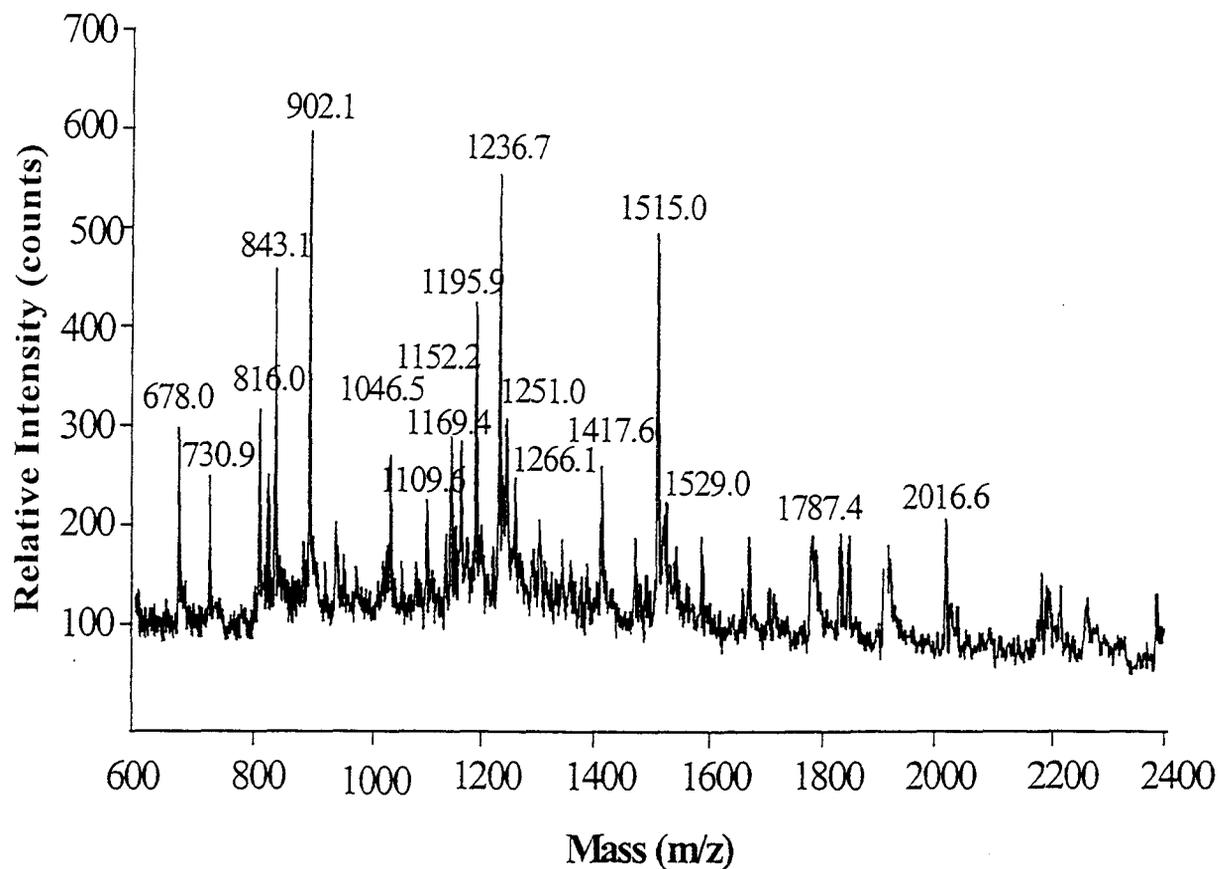
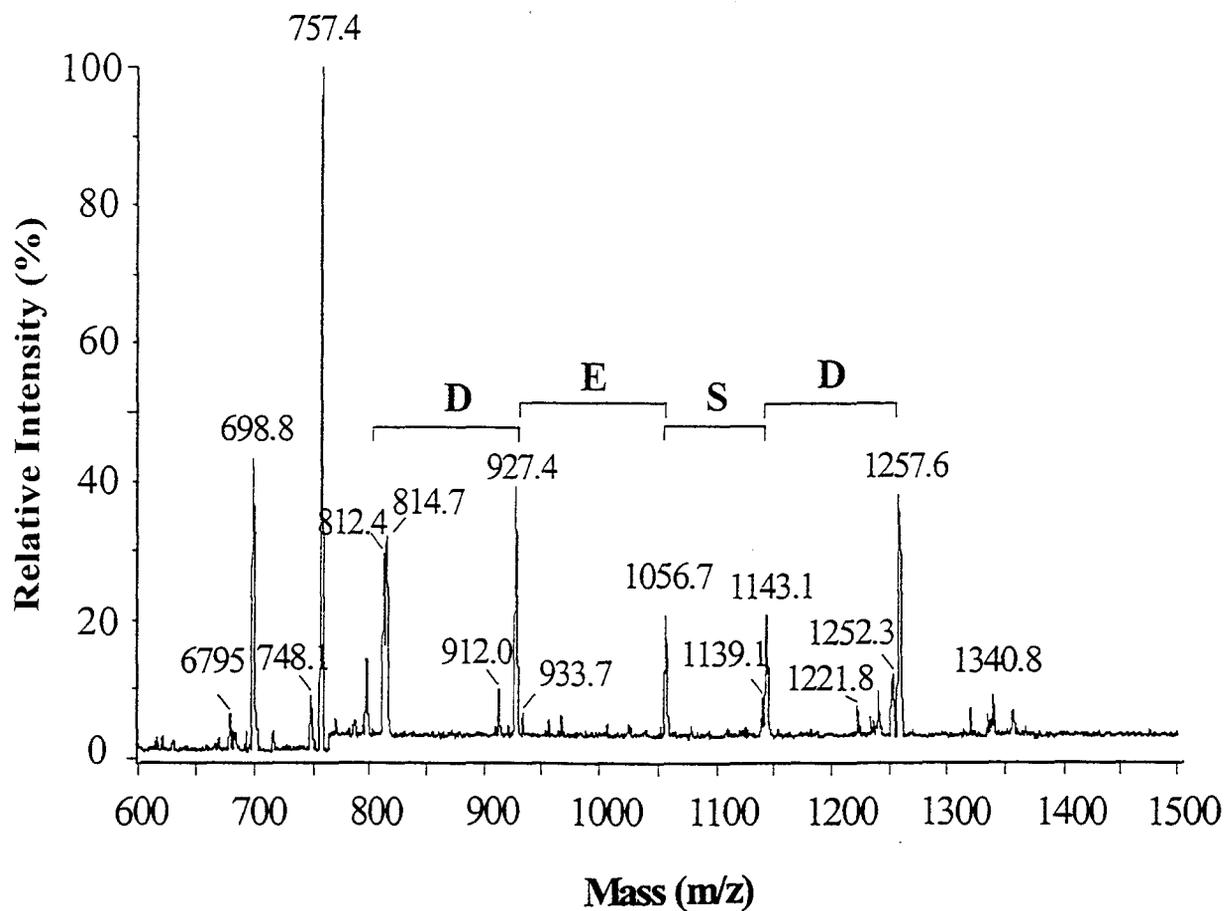
A**B**

Figure 4

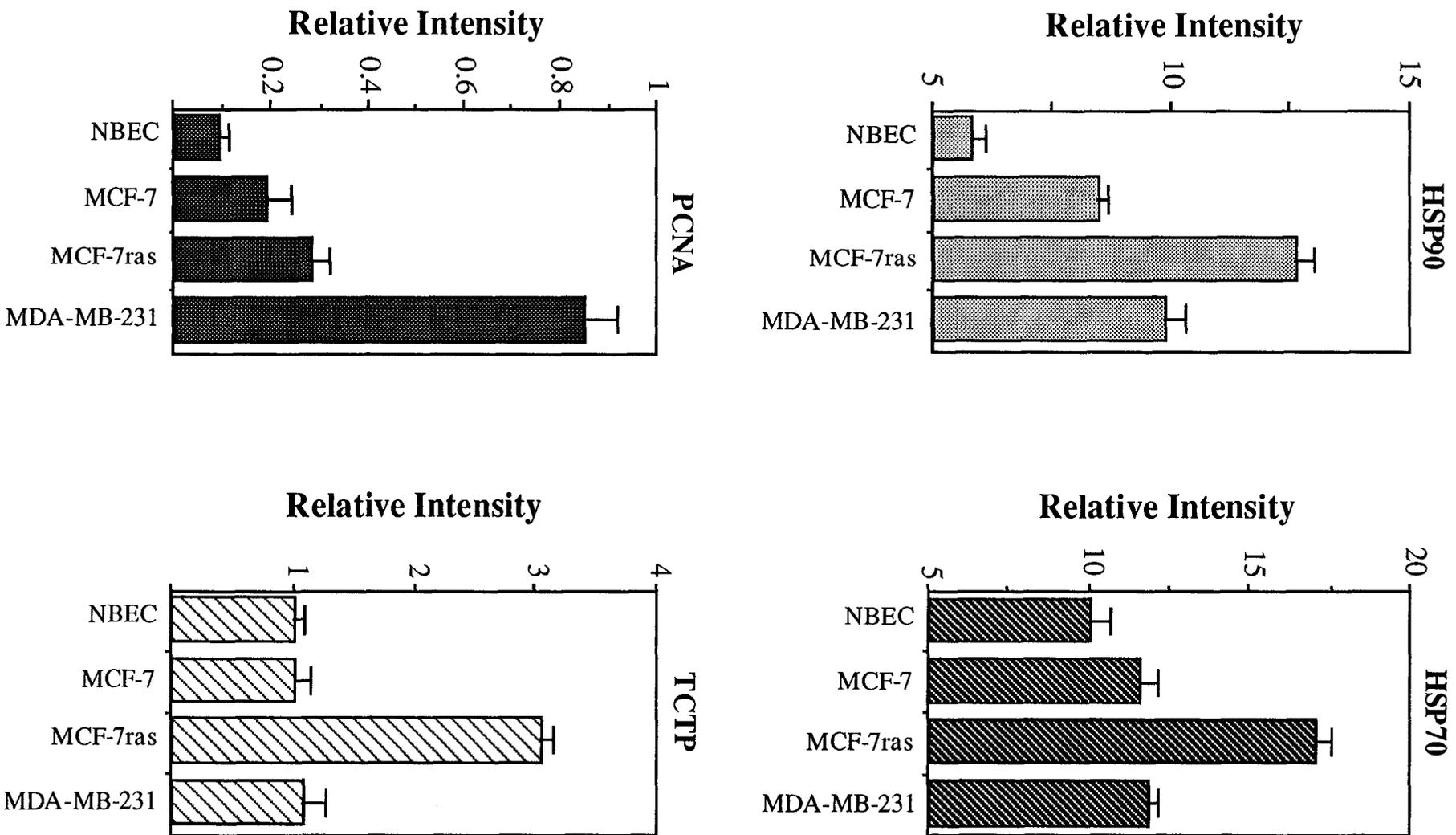
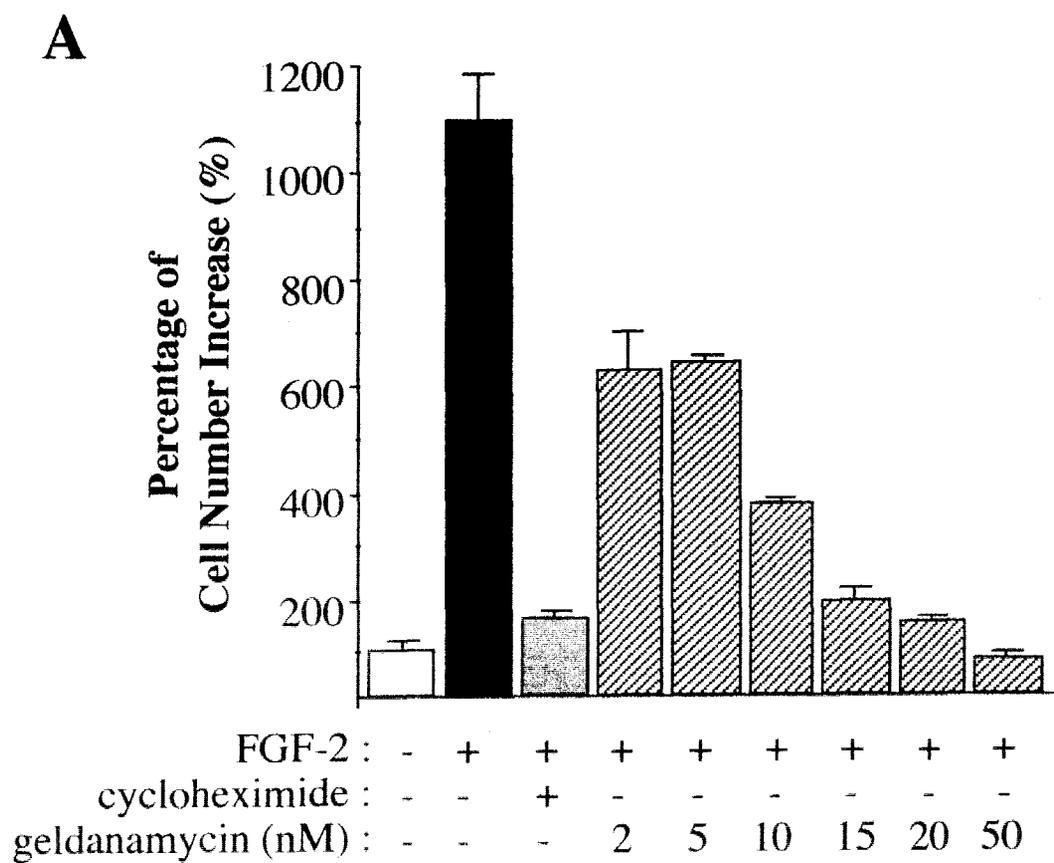


Figure 5



B

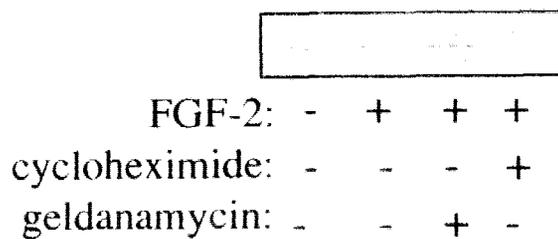


Table 1

spot	MM pI ^{a)}	accession number ^{b)}	molecular ion masses used for identification by MALDI-TOF ^{c)}	sequence obtained by MS/MS ^{d)}
HSP90	87 kDa 4.85	P08238	678.0 / 730.9 / 816.0 / 902.1 / 1109.6 / 1152.2 / 1169.4 / 1236.7 / 1251.0 / 1266.1 / 1417.6 / <u>1515.0</u> / 1529.0 / 1787.4 / 2016.6	⁽³⁸⁶⁾ GVVDS ⁽³⁹⁹⁾ EDLPLNISR
HSP70	70 kDa 5.38	P11142	990.7 / 1082.1 / 1200.3 / 1236.6 / 1253.9 / 1304.1 / 1319.9 / 1411.3 / 1458.7 / <u>1488.3</u> / 1566.8 / 1633.7 / 1650.5 / 1692.3 / 1788.4 / 1806.4 / 1838.9 / 1982.5	⁽³⁷⁾ TTPSYVAFTDTER ⁽⁴⁹⁾
PCNA	32 kDa 4.57	P12004	653.90 / <u>858.0</u> / 895.10 / 911.10 / 974.90 / 1276.60 / 2076.60 / 2320.80 / 2480.30 / 3340.22	⁽⁶⁾ LVQGSILK ⁽¹³⁾
TCTP	24 kDa 4.84	P13693	1057.15 / 1061.32 / 1242.18 / <u>1420.7</u> / 1436.75 / 1447.67 / 1729.9	⁽¹¹¹⁾ VKPFMTGAAEGIK ⁽¹²³⁾

DISCUSSION GENERALE

Les résultats des travaux précédents de notre laboratoire sur le FGF-2 ont montré que ce facteur de croissance est un mitogène puissant pour la lignée de cellules mammaires cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 et que ces cellules possèdent les deux catégories de sites de fixation du FGF-2, de haute (FGFR) et de basse affinité (HSPG). En revanche, le FGF-2 ne stimule pas la prolifération des cellules cancéreuses hormono-indépendantes MDA-MB-231 et des cellules épithéliales mammaires normales (Peyrat et al, 1991, 1992; Delehedde et al, 1995; Fernig et al, 2000; Nurcombe et al, 2000). Notre étude s'inscrit dans la continuité de ces travaux, le but étant de mieux comprendre les mécanismes de signalisation intracellulaire du FGF-2 menant à la stimulation de la prolifération des cellules MCF-7. Les récepteurs membranaires de haute affinité du FGF-2 possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque, qui une fois activée par la fixation du ligand, déclenche des cascades de phosphorylations intracellulaires sur des protéines de signalisation dont l'activité enzymatique est alors modifiée. Ces variations de phosphorylation conduisent, de manière ultime, à des modifications de l'expression de gènes et de la synthèse de protéines, permettant ainsi la prolifération cellulaire. Les différents évènements de signalisation du FGF-2 menant à la division des cellules sont encore incomplètement décrits, notamment en ce qui concerne les cellules de cancer du sein pour lesquelles peu de données sont disponibles. Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les modifications de tyrosine-phosphorylation et de synthèse de protéines induites par ce facteur de croissance dans les cellules de cancer du sein MCF-7.

Parallèlement aux travaux de notre laboratoire précédemment cités, d'autres études de différentes équipes ont également montré une stimulation importante de la prolifération des cellules MCF-7 par le FGF-2 (Karey et Sirbasku, 1988; Briozzo et al, 1991; Stewart et al, 1992; Fernig et al, 2000). Toutefois, quelques travaux de l'équipe de Yahalom (Fenig et al, 1997; Wang et al, 1997) ont montré une inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 par le FGF-2 corrélée avec l'augmentation de l'expression d'un inhibiteur du cycle cellulaire $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$, et ce, malgré la détection de l'activation des ERK1/2 et une augmentation du niveau de protéines permettant la progression dans la phase S du cycle cellulaire comme les cyclines D1 et E, et la cyclin-dependent kinase cdk4. Il faut noter que l'effet inhibiteur du FGF-2 sur la

prolifération est obtenu en présence de sérum de veau foetal, contrairement à l'effet mitogène qui est observé dans un milieu de sevrage dépourvu de sérum. Il est possible que la présence simultanée du sérum (qui contient de nombreuses molécules activant la prolifération cellulaire) et du FGF-2 entraîne une suractivation de Ras ou de Raf. Or il a été montré que cette suractivation peut avoir des effets positifs sur la croissance mais aussi des effets négatifs sur le cycle cellulaire et induire l'apoptose des cellules (Fan et Bertino, 1997; El-Ashry et al, 1997), ce qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur du FGF-2 sur la prolifération des cellules MCF-7.

Grâce à l'utilisation conjointe de moyens "traditionnels" (utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'anticorps spécifiques) et d'une technologie innovante et performante, l'analyse protéomique, nous avons identifié plusieurs protéines-clés dont la tyrosine-phosphorylation est essentielle à la signalisation du FGF-2 dans les cellules MCF-7. Ainsi, nous avons montré que dès les premières minutes d'action du FGF-2, le récepteur FGFR lui-même est la cible d'une augmentation de phosphorylation intracellulaire, mettant ainsi en évidence l'activation du premier élément de la cascade de signalisation induite par le FGF-2 dans les cellules MCF-7 (figure 19). L'activation du FGFR conduit à la tyrosine-phosphorylation de protéines de signalisation (revue dans Klint et Claesson-Welsh, 1999) parmi lesquelles nous avons identifié l'adaptateur FRS2, la protéine tyrosine-kinase Src, les p42/p44 MAPK et une protéine régulatrice du cycle cellulaire, la cycline D2. La phosphorylation de la protéine FRS2 est une étape importante dans le signal mitogène du FGF-2 et de manière intéressante, est également requise lors de la stimulation de la prolifération des cellules MCF-7 par un autre facteur de croissance, le NGF (résultats non publiés du laboratoire), qui active lui aussi la voie des MAPK (Descamps et al, 1998). Nous avons donc mis en évidence un élément majeur en amont de la cascade Ras/MAPK, commun à ces deux facteurs mitogènes dans les cellules cancéreuses mammaires. Une étude réalisée sur les cellules MCF-7 transfectées par Ras qui a montré une corrélation entre l'inhibition de la prolifération par le FGF-2 et la non-phosphorylation de FRS2 (Liu et al, 1999) suggère fortement que l'activation de cet adaptateur est importante pour l'activité mitogène du FGF-2. L'utilisation de dominants négatifs de FRS2, d'anticorps neutralisants ou d'anti-sens de cette protéine pourrait permettre de préciser son rôle dans l'activation de la voie des MAPK par le FGF-2 dans les cellules MCF-7.

En aval du récepteur, nous avons également mis en évidence l'activation par le FGF-2 de la tyrosine-kinase Src et des p42/p44 MAPK, ces protéines étant absolument nécessaires à l'activité mitogène du FGF-2, comme l'a montré l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces kinases (cf figure 19). Nos résultats indiquent un rôle essentiel pour Src dans la prolifération induite par le FGF-2 dans les cellules MCF-7, alors que dans ces mêmes cellules stimulées par le FGF-1, Nurcombe et coll (2000) ont montré qu'une activation plus forte (environ d'un facteur 2) de l'activité kinasique de Src est corrélée avec l'induction de la migration cellulaire. Cette même étude indique qu'en présence du FGF-2, les cellules MCF-7 migrent très peu, ce mouvement des cellules pouvant être assimilé aux extensions membranaires (lamellipodes et membrane ruffling) observées par Liu et coll (1999) et corrélé avec l'activation de la protéine Rac qui intervient dans le remodelage du cytosquelette (Liu et al, 1999). Ainsi, l'activation de Src que nous avons observée dans les cellules MCF-7 en réponse au FGF-2 est corrélée directement à la prolifération induite par le FGF-2. De plus, il est important de souligner ici que les résultats obtenus par notre équipe sur le FGF-1 (Nurcombe et al, 2000) et le FGF-2 indiquent clairement que l'activité kinasique de Src peut induire une réponse biologique différente (migration versus prolifération) selon l'amplitude plus ou moins élevée de son activation. Cette conclusion est à rapprocher de celle obtenue pour les kinases ERK1/2, pour lesquelles une activation transitoire est associée à la prolifération, alors qu'une activation soutenue entraîne des processus de migration ou de différenciation (Milasincic et al, 1996; van Puijenbroek et al, 1997; Liu et al, 1998; Maher, 1999). Nos données obtenues sur les MAPK soulève un autre point. En effet, il est maintenant établi, et nos résultats le confirment, que l'activation des p42/p44 MAPK est nécessaire à la stimulation de la prolifération cellulaire par les agents mitogènes. En revanche, l'activation des autres kinases de la famille (JNK/SAPK et p38MAPK) est plus généralement décrite lors des processus de survie cellulaire, de différenciation ou de réponse au stress (revue dans Lewis et al, 1998). Cependant des résultats préliminaires que nous avons obtenus (non montrés dans cette thèse) montrent une inhibition partielle de la prolifération induite par le FGF-2 en présence de l'inhibiteur spécifique des p38MAPK, le PD169316. Ces données soulignent que les p42/p44 MAPK ne sont probablement pas les seules protéines de la famille des MAPK à être impliquées dans la

prolifération des cellules épithéliales mammaires cancéreuses MCF-7. Quelques travaux appuient cette hypothèse. En effet, la stimulation de fibroblastes NIH3T3 par le FGF-2 active à la fois les p42/p44 MAPK et la p38MAPK, mais seule cette dernière est absolument requise pour la réponse biologique (Maher, 1999). Par contre, dans des oligodendrocytes, l'activation concomitante des kinases ERKs et p38MAPK est indispensable à la prolifération induite par le FGF-2 (Baron et al, 2000). Enfin, Liu et coll (1999) ont récemment montré l'implication de JNK1 dans la signalisation du FGF-2 dans les cellules MCF-7. Comme l'indique l'ensemble de ces données, il convient désormais de nuancer le concept généralement admis du "partage des tâches" entre les différents membres de la famille des MAPK (ERK, p38MAPK et JNK/SAPK), et il paraît important d'évaluer la contribution des p38MAPK et JNK/SAPK dans le signal mitogène du FGF-2 sur les cellules cancéreuses de sein.

Nos résultats mettent en évidence un rôle tout à fait nouveau pour l'activation de la protéine kinase Src par le FGF-2. En effet, nous avons montré que la tyrosine-phosphorylation de la cycline D2 induite par le FGF-2 revient à son niveau basal lorsque l'activité kinasique de Src et des autres membres de la famille de Src est inhibée, alors que l'inhibition des MAPK kinases n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la cycline D2. Comme nous l'avons indiqué dans le schéma récapitulatif de nos résultats (figure 19), nos résultats suggèrent donc que la famille des protéines Src pourraient être impliquées directement ou indirectement dans la phosphorylation de la cycline D2. Nos données sont en accord celles obtenues par Hall et coll (1993) qui ont montré que la tyrosine-kinase Src est capable de phosphoryler *in vitro* la cycline D1 qui est par ailleurs tyrosine-phosphorylée *in vivo* par le sérum dans des cellules épithéliales de poumon de rat (Hall et al, 1993). Les cyclines D étant localisées dans le noyau durant la phase G1 du cycle cellulaire (revue dans Yang et Kornbluth, 1999), on peut supposer que la tyrosine-kinase responsable de la phosphorylation a accès au compartiment nucléaire. Les protéines kinases de la famille de Src, qui, comme nous l'avons montré semblent être de bons candidats potentiels, possèdent un site de myristoylation en N-terminal et sont donc associées, pour la plupart, avec la face interne de la membrane plasmique (revue dans Resh, 1994). Pourtant, la translocation nucléaire de Src a été reportée dans des cellules épithéliales de rétine de poulet différenciées (Moszczynska et Opas, 1994) et dans des kératinocytes différenciés

(Zhao et al, 1992). De plus, un autre membre de la famille, Lyn, a été trouvé localisé dans le noyau de cellules HeLa et de fibroblastes de rat, avec une activité kinase intacte (Radha et al, 1996). Par ailleurs, en 1994, deux équipes ont identifié une nouvelle tyrosine-kinase apparentée à Src, Rak (qui signifie « cancer », en russe) ou FRK (Fyn-Related Kinase), qui est exprimée surtout dans les cellules épithéliales et qui est trouvée essentiellement dans le noyau (Cance et al, 1994; Lee et al, 1994). Ainsi, l'association de nos résultats avec des études antérieures appuie l'hypothèse de l'implication de la famille de Src dans la tyrosine-phosphorylation de la cycline D2 par le FGF-2. Des études ultérieures basées, par exemple sur l'effet de la transfection d'un dominant négatif de la kinase Src sur la phosphorylation de la cycline D2, ou la co-visualisation de la localisation cellulaire de ces deux protéines avant et après stimulation par le FGF-2 pourraient permettre de tester l'implication de Src et d'identifier la kinase de la cycline D2.

Les cyclines D (D1, D2, D3), qui partagent environ 50 à 60% d'homologie de séquence, sont des protéines-clés du cycle cellulaire dont l'expression et l'activité sont stimulées par de multiples signaux extracellulaires mitogènes pendant la phase G1. En se complexant avec leur sous-unité catalytique, les cdk-2, -4 ou -6 (cyclin-Dependent protein Kinase), elles inactivent la protéine du rétinoblastome pRb en l'hyperphosphorylant. Ceci entraîne le relargage des facteurs de transcription comme ceux de la famille E2F, qui vont permettre la transcription de gènes qui sont essentiels pour la progression de la phase G1 du cycle cellulaire et la synthèse d'ADN, telles que l'ADN polymérase α , PCNA, la cycline A ou cdc2, et E₂F (DeGregori et al, 1995). Comme nous l'avons indiqué de manière brève sur la figure 19, la voie Ras/MAPK peut agir directement sur l'expression des cyclines D grâce à l'activation par les MAPK des facteurs de transcription Fos et Jun, qui, en retour induisent la transcription du gène de la cycline D (revue dans Roussel, 1998). Il était jusqu'à maintenant reporté que l'activité mitogène du FGF induit une augmentation des ARNm et de la protéine de la cycline D1 dans différents types cellulaires (Sutherland et al, 1993; Rao et al, 1995; Wang et al, 1997; Olson et al, 2000). Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant aux effets des facteurs de croissance sur les cyclines D en mettant pour la première fois en évidence que le FGF-2 est capable d'agir à un autre niveau de régulation cellulaire, c'est-à-dire au niveau post-traductionnel, sur un membre de la famille des cyclines D. La signification biologique de la tyrosine-phosphorylation de la cycline D2 par le FGF-2 -ou par d'autres facteurs mitogènes- reste à déterminer, ainsi que son rôle éventuel

dans la cancérisation des cellules épithéliales mammaires, d'autant plus que les cyclines, et en particulier les cyclines D, sont fréquemment surexprimées dans le cancer du sein, soulignant leur importance dans la (dé)régulation de la croissance des cellules cancéreuses (revue dans Landberg et Roos, 1997). En outre, se pose la question de savoir si la phosphorylation que nous avons décrite pour la cycline D2 touche également les autres cyclines D, ou si au contraire elle lui est spécifique, contribuant ainsi à différencier le rôle des cyclines D. En effet, bien que la fonction de chaque cycline D est identique dans la régulation du cycle cellulaire, certaines données soulignent pourtant que leur rôle respectif n'est pas nécessairement redondant. Ainsi, des différences entre les cyclines D1, D2 et D3 ont été reportées au niveau de leur expression cellulaire et tissulaire, de leur association avec leur partenaire Cdk et de la phosphorylation de protéines-cibles (Buckley et al, 1993; Palmero et al, 1993; Fantl et al, 1995; Sicinski et al, 1995, 1996; Sweeney et al, 1997; Sarcevic et al, 1997), suggérant que la tyrosine phosphorylation est peut-être aussi un processus permettant de discriminer le rôle des cyclines D.

L'effet mitogène du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein est étroitement lié à la modifications touchant des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. En effet, en plus de la tyrosine-phosphorylation de la cycline D2, nous avons identifié le Proliferating Cell Nuclear Antigen, ou PCNA, comme une des cibles moléculaires dont la synthèse est augmentée par le FGF-2 dans les cellules MCF-7 (figure 19). PCNA qui est exprimé exclusivement dans les cellules en cycle est impliqué dans la réplication de l'ADN en s'associant avec l'ADN polymérase delta et dans la réparation de l'ADN (revue dans Kelman, 1998). Dans cette étude, nous montrons d'une part que l'action mitogène du FGF-2 induit une augmentation de la synthèse de PCNA, et d'autre part que le taux de synthèse de PCNA est étroitement corrélé à l'activité prolifératrice de base des différentes lignées de cellules de cancer du sein (MCF-7, MCF-7_{ras}, MDA-MB-231) et des cellules épithéliales mammaires normales : plus les cellules mammaires prolifèrent, plus elles expriment la protéine PCNA. Ceci confirme les précédents résultats obtenus au laboratoire qui ont montré par immunohistochimie que le FGF-2 entraîne une augmentation du niveau de PCNA dans les cellules cancéreuses mammaires, en accord avec la diminution de la durée de la phase S observée dans les cellules MCF-7 (Delehedde et al, 1995). Nos résultats s'inscrivent dans le cadre général de l'action des agents mitogènes sur le

cycle et la prolifération cellulaires. En effet, une augmentation du niveau protéique de PCNA par le TGF-beta1, l'IGF-I et l'insuline a été reportée dans les adipocytes lors de la stimulation de la prolifération (Teruel et al, 1996; Porras et al, 1998), alors que dans les cellules mammaires cancéreuses MDA-MB-468 transfectées par le récepteur aux oestrogènes, l'inhibition de la prolifération par l'oestradiol est corrélée à une diminution de PCNA au niveau protéine (Wang et al, 1997). Par rapport à ces travaux, nos résultats restent néanmoins originaux de part la mise en place d'une approche méthodologique innovante basée non pas sur des techniques classiques de western-blot ou d'immunohistochimie, mais sur l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle hautement résolutive pour cartographier dans un premier temps les protéines dont la synthèse est modifiée par le FGF-2, et dans un deuxième temps, pour permettre la caractérisation de ces protéines grâce au couplage avec la spectrométrie de masse. L'intégration de cette augmentation de synthèse de PCNA dans le schéma du signal mitogène du FGF-2 dans notre modèle cellulaire se fait en bout de chaîne: Les cascades de signaux intracellulaires, et en particulier celle que nous avons décrite impliquant les MAPK, conduisent directement ou indirectement à l'activation de facteurs de transcription qui induisent alors la transcription de gènes, dont celui de PCNA. L'augmentation de la traduction des ARNm de PCNA en protéine permet alors la progression des cellules dans la phase S du cycle cellulaire grâce à la réplication de l'ADN cellulaire à laquelle participe activement la protéine PCNA.

Dans notre étude, nous avons identifié une autre protéine, la TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein), et nos résultats mettent pour la première fois en évidence la régulation de la synthèse de cette protéine par un facteur de croissance, le FGF-2 (cf figure 19). La TCTP est une protéine cytoplasmique très conservée de 23 kDa, présente chez les mammifères, les plantes (Sage-Ono et al, 1998), les bactéries (Bhisutthibhan et al, 1999) et la levure (Bonnet et al, 2000), et elle est exprimée aussi bien dans des cellules humaines normales que cancéreuses (Hochstrasser et al, 1992; Rasmussen et al, 1992, 1997; Sanchez et al, 1997; Chung et al, 2000). Contrairement à PCNA, nous avons observé un taux de synthèse identique dans les cellules épithéliales mammaires normales, et les lignées cellulaires cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231. Seules les cellules MCF-7 transfectées par le produit du protooncogène ras montrent un taux plus élevé que dans les autres cellules mammaires. Nos résultats semblent

donc indiquer que la TCTP pourrait être une nouvelle cible indirecte de l'activation de la voie Ras/MAPK. En effet, nous avons montré que cette voie est activée par le FGF-2 dans les cellules MCF-7 et de plus, elle est suractivée dans les cellules MCF-7ras (Liu et al, 1998, 1999). Comme dans ces deux cas expérimentaux nous observons une augmentation de synthèse ou un taux élevé de synthèse de la TCTP, nous pouvons supposer que la synthèse de cette protéine est corrélée à l'activation de la cascade Ras/MAPK. Cette hypothèse émise à partir de nos travaux est d'ailleurs enrichie par une étude de Thiele et coll (1998) qui ont identifié dans le promoteur du gène de la TCTP du lapin plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription activés par la voie des MAPK, tels que Ets-1 et AP-1 (Activator Protein-1) (cf figure 19). L'inhibition de l'activité des p42/p44 MAPK, soit par un inhibiteur spécifique, soit par une protéine mutée inactive, nous permettrait de vérifier l'incidence des MAPK sur l'augmentation de synthèse de la TCTP par le FGF-2. Ainsi, l'analyse protéomique nous a permis d'identifier la TCTP comme élément majeur impliqué dans l'action intracellulaire mitogène du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein et nos résultats suggèrent une relation entre l'activation de la voie des MAPK par le FGF-2 et la régulation de la TCTP, dont le rôle dans la prolifération cellulaire reste cependant à définir.

Deux des protéines dont la synthèse est modifiée par le FGF-2 et que nous avons identifiées sont des protéines chaperones : les "Heat Shock Proteins" HSP90 et HSP70. S'il a été montré que d'autres facteurs mitogènes tels que le sérum, l'IGF et l'EGF stimulent la synthèse des HSP90 et HSP70 (Wu et Morimoto, 1985; Ferris et al, 1988; Jerome et al, 1991), c'est en revanche la première fois que le FGF-2 est reporté comme stimulateur de la synthèse des HSP90 et HSP70. Il est fort probable que l'augmentation de synthèse de ces deux protéines induite par le FGF-2 après 12 heures de stimulation soit corrélée à leur rôle de chaperone moléculaire (cf figure 19). Comme l'indique l'augmentation de synthèse de PCNA, pendant la phase G1 (phase dans laquelle se situent la majorité des cellules après 12 heures d'action du FGF-2 (Delehedde et al, 1995), la cellule se prépare à la réplication de l'ADN qui aura lieu au cours de la phase S en synthétisant davantage de PCNA. Nos résultats suggèrent fortement que les cellules se préparent également à l'augmentation globale du taux de synthèse de protéines durant la phase G2, en synthétisant à l'avance des protéines chaperones qui aideront à la mise en conformation et la maturation des nouvelles protéines synthétisées, étape ultime avant la division

de la cellule mère en deux cellules filles. De plus, dans des conditions de sevrage des cellules, nous avons observé une surexpression de l'HSP90, et à un moindre niveau de l'HSP70, dans les cellules mammaires cancéreuses par rapport aux cellules normales. Les cellules cancéreuses ayant à la base une capacité proliférative plus importante que les cellules normales, on peut supposer que cette surexpression est corrélée avec le métabolisme élevé des cellules cancéreuses qui nécessite une activité chaperone soutenue. Par ailleurs, la forte expression des HSP90 et HSP70 que nous observons dans les cellules transfectées par ras par rapport aux autres lignées cellulaires cancéreuses ne semble pas être spécifique aux cellules MCF-7 puisqu'une corrélation a été établie entre le caractère hautement tumorigénique des cellules mammaires immortalisées HBL-100 transformées par l'oncogène Ha-ras et la surexpression constitutive de l'HSP90 dans ces cellules (Lebeau et al, 1991). Il est intéressant de constater que, comme pour la TCTP, le lien qui existe entre l'augmentation des protéines HSP90 et HSP70 et la stimulation de la prolifération (par le FGF-2 ou par Ras) se situe au niveau du promoteur des gènes correspondants. En effet, des sites de fixation de certains facteurs de transcription, comme AP-1 et SRE (Serum Response Element), impliqués dans la régulation de la prolifération et activables notamment par les MAPK, ont été caractérisés dans le promoteur des gènes codant pour l'HSP90 et HSP70 (Wu et al, 1987; Hickey et al, 1989; Dale et al, 1996). L'analyse de nos résultats combinés aux données existantes souligne la position centrale des MAPK, et probablement de d'autres voies moins décrites, dans l'activation de facteurs de transcription qui conduit à la régulation de l'expression de multiples cibles protéiques, permettant ainsi la mise en place de la machinerie cellulaire indispensable à la prolifération.

Outre son activité de chaperone moléculaire, un rôle de l'HSP90 dans la signalisation intracellulaire émerge depuis quelques années : en interagissant avec des molécules de signalisation telles que Src, Raf, MEK, et Cdk4, l'HSP90 permet la stabilisation de leur conformation et la régulation de leur activité (revues dans Pratt, 1998; Mayer et Bukau, 1999). Ayant identifié l'HSP90 comme une des protéines régulées par le FGF-2, nous avons abordé l'implication de l'HSP90 dans la signalisation intracellulaire du FGF-2 en utilisant la geldanamycine qui inhibe l'activité stabilisatrice de cette dernière en se fixant sur le site de fixation de l'ATP sur l'HSP90 (Stebbins et al, 1997). Nous avons montré que la geldanamycine inhibe de manière dose-dépendante la prolifération des cellules MCF-7 induite par le FGF-2,

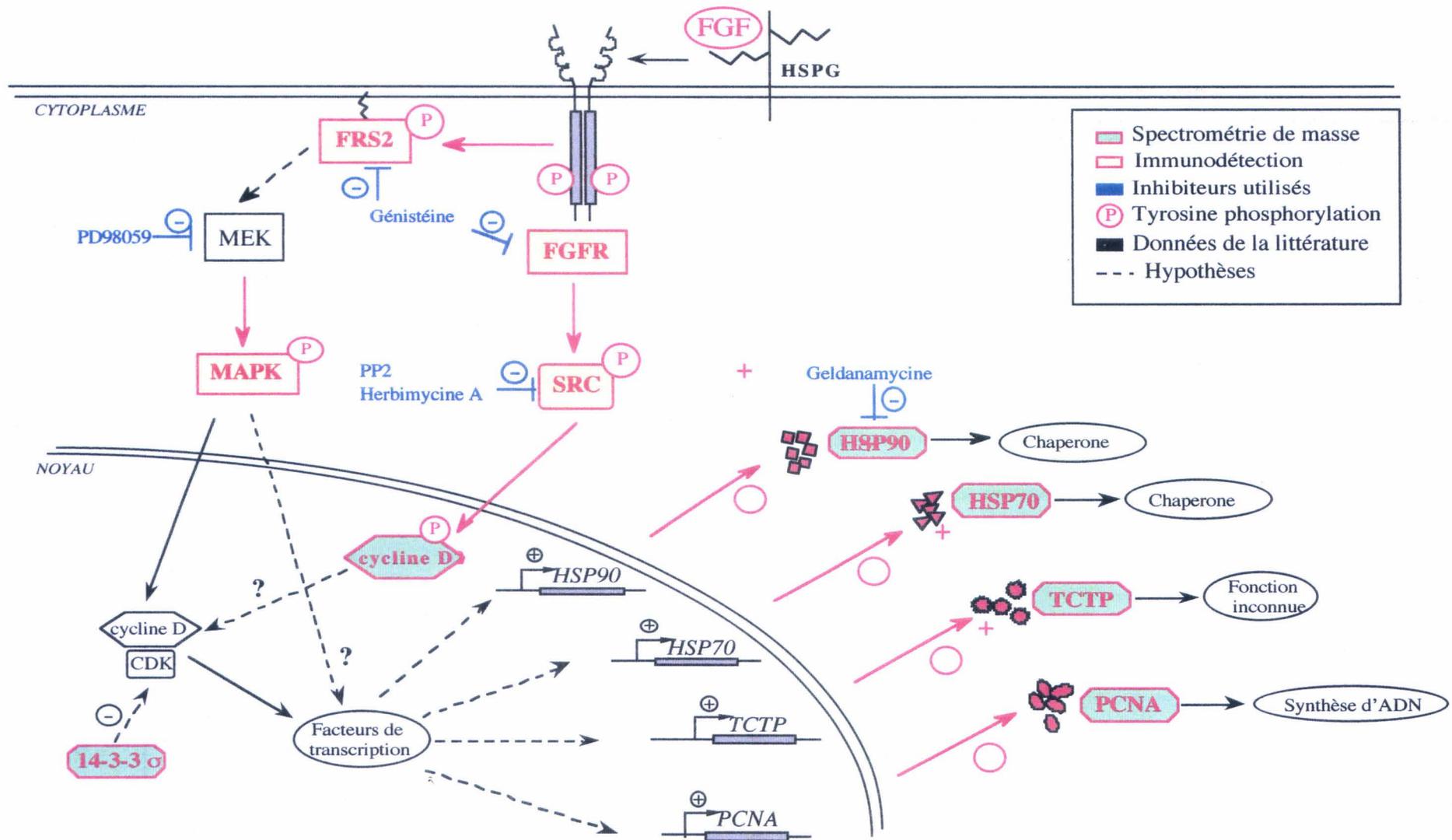


Figure 19 : Apport de l'analyse protéomique à l'étude de la signalisation intracellulaire du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein MCF-7. L'ensemble de nos résultats sont présentés ici sous la forme d'un schéma récapitulatif. Les protéines indiquées en jaune ont été caractérisées à l'aide d'anticorps et celles indiquées en vert ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés sont indiqués en bleu.

suggérant que les complexes multimériques HSP90-protéines de signalisation sont indispensables à l'activité mitogène du FGF-2. Nos résultats mettent donc en évidence un double rôle de l'HSP90 dans l'activité mitogène du FGF-2 : un rôle précoce dans la cascade d'évènements intracellulaires induite par le FGF-2, en agissant directement avec des protéines de signalisation dont la nature reste à découvrir ; et un rôle plus tardif de chaperone en aidant à la mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées. L'identification des protéines complexées avec l'HSP90 dans les cellules MCF-7 stimulées ou non par le FGF-2 pourrait être réalisée en séparant par électrophorèse les protéines immunoprécipitées avec l'HSP90 dans des conditions très douces et en les caractérisant après digestion trypsique et analyse en spectrométrie de masse, comme nous l'avons fait pour identifier la cycline D2. Les données concernant le rôle des HSP dans la régulation de la croissance des cellules de cancer du sein sont d'autant plus importantes que plusieurs membres de la famille des HSP sont surexprimés dans les tumeurs malignes par rapport aux tissus bénins et normaux issus des poumons, du sein, ou des ovaires (Okuzawa et al, 1994; Franzen et al, 1996; Athanassiadou et al, 1998). Cette surexpression donne d'ailleurs lieu à des essais de traitement immuno-thérapeutiques des tumeurs. En effet, l'injection des HSP purifiées à partir des tumeurs induit une réponse immunologique dirigée contre les cellules tumorales, et une diminution de la taille tumorale (Blachère et al, 1997; Tamura et al, 1997; Ménoret et Chandawarkar, 1998; Yedavelli et al, 1999), laissant espérer un traitement futur des cancers par ce moyen.

L'application de l'analyse protéomique à notre modèle d'étude (la signalisation intracellulaire du FGF-2 dans les cellules de cancer du sein) a nécessité une mise au point préalable conséquente. En effet, à partir des protéines séparées par électrophorèse 2D et colorées au bleu de coomassie, il nous a fallu dans un premier temps optimiser différentes étapes de la manipulation. Pour la digestion trypsique, nous avons cherché à obtenir un meilleur rapport enzyme (trypsine)/substrat (quantité de protéine contenue dans le spot découpé) afin d'optimiser la coupure en fragments peptidiques de la protéine et de minimiser l'autolyse de la trypsine tout en conservant malgré tout quelques peptides tryptiques, indispensables à la calibration du spectre de masse MALDI-TOF. Une fois la digestion trypsique terminée, nous avons aussi

amélioré l'extraction des peptides les plus hydrophobes du gel, en faisant le dernier lavage des spots dans une solution beaucoup plus hydrophobe (95% acétonitrile, 5% acide formique, vol/vol) que celle des deux premières extractions (45% eau, 45% acétonitrile, 10% acide formique). Il nous a fallu aussi diminuer la concentration en sels de nos échantillons en augmentant les lavages des spots avant la digestion enzymatique, et en diminuant la concentration de la solution de bicarbonate d'ammonium utilisée. En effet, même si un des avantages du spectromètre de masse MALDI-TOF est la tolérance en sels, nous avons observé une nette amélioration des spectres de masse (rapport signal/bruit beaucoup plus élevé) après diminution des sels dans l'échantillon peptidique. L'étape de déssalage de nos échantillons est devenue indispensable lorsque nous avons travaillé sur des spots colorés à l'argent dans lesquels la quantité de protéine est nettement inférieure (1-10 ng) à celle contenue dans les spots colorés au bleu de coomassie (100-1000 ng) et pour pouvoir analyser les échantillons (colorés au bleu de coomassie ou au nitrate d'argent) en spectrométrie de masse en mode nanoélectrospray, qui nécessite des échantillons exempts de contaminants salins. En plus des améliorations citées ci-dessus, l'utilisation de colonnes de microdéssalage a été mise au point par X. Czeszak au laboratoire de chimie biologique. Ces colonnes hydrophobes ne fixent pas les sels qui sont polaires et qui sont éliminés par des lavages de la colonne, mais retiennent les peptides qui sont plus ou moins hydrophobes et qui sont ensuite élués de la colonne et analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF et/ou en tandem.

Ces mises au point de différentes étapes de l'analyse protéomique ont été réalisées sur des échantillons des lignées cellulaires cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231 ainsi que sur les cellules épithéliales mammaires normales, ce qui nous a permis d'enrichir la banque de données des protéines de cellules épithéliales mammaires. Nous avons ainsi identifié des protéines majeures (visibles au bleu de coomassie) des cellules mammaires et avons détecté des différences significatives en protéines entre d'une part les cellules normales et cancéreuses, et d'autre part entre les deux lignées cellulaires prototypiques MCF-7 et MDA-MB-231, notamment dans les protéines du cytosquelette telles que les cytokératines et la vimentine. Mais le résultat essentiel de cette étude est sans conteste l'identification d'une protéine appartenant à la famille des 14-3-3, la 14-3-3 sigma, qui est beaucoup plus exprimée dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses, alors que les 14-3-3 alpha/beta et delta/zeta ne varient pas de

manière significative. Non seulement la 14-3-3 sigma est plus faiblement exprimée dans les lignées de cellules cancéreuses mais également dans les 35 échantillons de tumeurs mammaires primaires que nous avons analysés. Nos résultats issus de l'analyse protéomique des cellules et des tumeurs mammaires suggèrent donc fortement que la diminution de l'expression de la 14-3-3 sigma est corrélée à la dérégulation de la croissance des cellules cancéreuses. Ce rôle négatif de la 14-3-3 sigma dans la régulation de la croissance cellulaire semble être confirmé par des études montrant que sa surexpression entraîne un arrêt du cycle cellulaire (Hermeking et al, 1997) et que la transfection de la 14-3-3 sigma dans les cellules de cancer du sein inhibe l'activité des cdk (cyclin-dependent kinases) et donc la progression du cycle cellulaire (Laronga et al, 2000) (cf figure 19). Par ailleurs, Fergusson et coll (2000) ont montré récemment que les ARNm de la 14-3-3 sigma sont très faiblement exprimés, voire indétectables dans des échantillons de cancer du sein, à cause d'une hyperméthylation du gène qui le rend silencieux. Ceci suggère que la faible quantité de 14-3-3 sigma que nous observons dans les lignées cellulaires et les biopsies de cancer du sein pourrait être due à une régulation négative au niveau transcriptionnel plutôt qu'au niveau traductionnel. Comme nous le discutons dans l'article 1, la non-sensibilité des cellules épithéliales normales au FGF-2 et au NGF alors qu'elles expriment les récepteurs correspondants, pourrait s'expliquer par la forte expression de la 14-3-3 sigma qui bloquerait l'effet mitogène de ces deux facteurs de croissance au niveau de la progression du cycle cellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester l'activité mitogène du FGF-2 et du NGF après avoir bloqué l'expression ou la fonction de la 14-3-3 sigma dans les cellules normales en les transfectant avec un vecteur exprimant l'anti-sens ou un dominant négatif de cette protéine respectivement. Par ailleurs, l'implication de la 14-3-3 sigma dans le contrôle de la prolifération cellulaire corrélée à sa faible expression dans les tumeurs mammaires soulève la question de son application clinique. La mise au point et le développement d'un test clinique rapide et fiable, basé par exemple sur la technique ELISA, permettrait de mesurer le niveau d'expression de la protéine 14-3-3 sigma dans les tumeurs et d'évaluer l'impact pronostique de cette protéine dans le cancer du sein, voire même dans d'autres types de cancers.

Les résultats acquis au cours de cette thèse contribuent à la compréhension du mécanisme d'action intracellulaire du FGF-2 qui mène à la prolifération des cellules de cancer du sein, grâce à l'identification de nouvelles protéines régulées par le FGF-2 au niveau des phosphorylations ou de la synthèse protéique. Ils ouvrent aussi des perspectives sur le mode d'action du FGF dans d'autres types de cellules cancéreuses et sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le diagnostic et le traitement de cette maladie, comme le soulignent nos résultats sur la 14-3-3 sigma et l'HSP90. De plus, nos résultats mettent en exergue l'apport de l'analyse protéomique pour l'étude de la signalisation intracellulaire d'un facteur de croissance ou d'une autre molécule biologique et pour la découverte de nouveaux marqueurs de cancérisation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abram CL and Courtneidge SA.** (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Res.*, **254**: 1-13.
- Adnane J, Gaudray P, Dionne C, Crumbley G, Jaye M, Schlessinger J, Jeanteur P, Birnbaum D, and Theillet C.** (1991) BEK and FLG, two receptors of the FGF family, are amplified in a subset of human breast cancers. *Oncogene*, **6**: 659-663.
- Aicher L, Wahl D, Arce A, Grenet O, and Steiner S.** (1998) New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis*, **19**: 1998-2003.
- Alaiya AA, Franzen B, Auer G, and Linder S.** (2000) Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis*, **21**: 1210-1217.
- Amaya E, Stein PA, Musci TJ, and Kirschner MW.** (1993) FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development*, **118**: 477-487.
- Anandappa SY, Winstanley JHR, Leinster S, Green B, Rudland PS, and Barraclough R.** (1994) Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease. *Br. J. Cancer*, **69**: 772-776.
- Anderson NL and Anderson NG.** (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, **19**: 1853-1861.
- Anderson NL, Esquer-Blasco R, Hoffmann JP, and Anderson NG.** (1991) A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. *Electrophoresis*, **12**: 907-930.
- Antelman H, Bernhardt J, Schmid R, Mach H, Volker U, and Hecker M.** (1997) First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis*, **18**: 1451-1463.
- Anton Y, and Wennogle LP.** (1998) The RAF family : an expanding network of post-translational controls and protein-protein interactions. *Cell Res.*, **8**: 81-98.
- Arakawa T, Hsu YR, Schiffer SG, Tsai LB, Curless C, and Fox GM.** (1989) Characterization of a cysteine-free analog of recombinant human basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**: 335-341.
- Arbiser JL, Fine JD, Murrell D Paller A, Connors S, Keough K, Marsh E, and Folkman J.** (1998) Basic fibroblast growth factor: a missing link between collagen VII, increased collagenase, and squamous cell carcinoma in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Med.*, **4**: 191-195.
- Arbott D, O'Connell KL, King KL, and Stults JT.** (1998) An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. *Anal. Biochem.*, **258**: 1-18.
- Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, and Lonai P.** (1998) Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF

signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 5082-5087.

Arman E, Haffner-Krausz R, Gorivodsky M, and Lonai P. (1999) Fgfr2 is required for limb outgrowth and lung-branching morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 11895-11899.

Arnaud E, Touriol C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, and Prats AC. (1999) A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor-2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 505-514.

Arteaga CL, Tandon Ak, Von Hoff DD, and Osborne CK. (1988) Transforming growth factor beta: potential inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **48**: 3898-3904.

Assouline M, Hutchinson C, Morton K, Mascarelli F, Jeanny JC, Fayein N, Pouliquen Y, and Courtois Y. (1989) In vivo binding of topically applied human bFGF on rabbit corneal epithelial wound. *Growth Factors*, **1**: 251-261.

Athanassiadou P, Petrakakou E, Sakelariou V, Zerva C, Lioffi A, Michalas S, and Athanassiades P. (1998) Expression of p53, bcl-2 and heat shock protein (hsp72) in malignant and benign ovarian tumours. *Eur. J. Cancer Prev.*, **7**: 225-231.

Aviezer D, Cotton S, David M, Segev A, Khaselev N, Galili N, Gross Z, and Yayon A. (2000) Porphyrin analogues as novel antagonists of fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor receptor binding that inhibit endothelial cell proliferation, tumor progression, and metastasis. *Cancer Res.*, **60**: 2973-2980.

Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, and Yayon A. (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell*, **79**: 1005-1013.

Aviezer D, Iozzo RV, Nooman DM, and Yayon A. (1997) Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 1938-1946.

Avivi A, Yayon A, and Givol D. (1993) A novel form of FGF receptor-3 using an alternative exon in the immunoglobulin domain III. *FEBS Lett.*, **330**: 249-252.

Bagheri-Yarmand R, Kourbali Y, Mabilat C, Morere JF, Martin A, Lu H, Soria C, Jozefonvicz J, and Crépin M. (1998) The suppression of fibroblast growth factor 2/ fibroblast growth factor 4-dependent tumor angiogenesis and growth by the anti-growth factor activity of dextran derivative (CMDB7). *Br. J. Cancer*, **78**: 111-118.

Baird A, Shubert D, Ling N, and Guillemain R. (1988) Receptor and heparin binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2324-2328.

- Bansal GS, Cox HC, Marsh S, Gomm JJ, Yiangou C, Luqmani YA, Coombes RC, and Johnston CL.** (1997) Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, **75**: 1567-1574.
- Bansal GS, Yiangou C, Coope RC, Gomm JJ, Luqmani YA, Coombes RC, and Johnston CL.** (1995) Expression of fibroblast growth factor-1 is lower in breast cancer than in normal human breast. *Br. J. Cancer*, **72**: 1420-1426.
- Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D, and de Vries H.** (2000) PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol. Cell. Neurosci.*, **15**: 314-329.
- Barraclough R, Fernig DG, Rudland PS, and Smith JA.** (1990) Synthesis of basic fibroblast growth factor upon differentiation of rat mammary epithelial to myoepithelial-like cells in culture. *J. Cell. Physiol.*, **144**: 333-344.
- Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhaicer OL, Chenard MP, Rio MC, and Chambon P.** (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, **348**: 699-704.
- Bastaki M, Nelli EE, Dell'Era P, Rusnati M, Molinari-Tosatti MP, Parolini S, Auerbach R, Ruco LP, Possati L, and Presta M.** (1997) Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**: 454-464.
- Battaglia C, Berlingieri MT, Martelli ML, Trapasso F, Delli Bovi P, and Fusco A.** (1993) Mitogenic and dedifferentiating effect of the K-fgf/hst oncogene on rat thyroid PC clone 3 epithelial cells. *Cell Growth Differ.*, **4**: 185-192.
- Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, and Dionne CA.** (1991) Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J.*, **10**: 2849-2854.
- Berger W, Setinek U, Mohr T, Kindas-Mugge I, Vetterlein M, Dekan G, Eckersberger F, Caldas C, and Micksche M.** (1999) Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Cancer*, **83**: 415-423.
- Bergman AC, Benjamin T, Alaiya A, Waltham M, Sakaguchi K, Franzen B, Linder S, Bergman T, Auer G, Appella E, Wirth PJ, and Jörnvall H.** (2000) Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*, **21**: 679-686.
- Berman B, Ostrovasky O, Shlissel M, Lang T, Regan D, Vlodaysky I, Ishai-Michaeli R, and Ron D.** (1999) Similarities and differences between the effects of heparin and glypican-1 on the bioactivity of acidic fibroblast growth factor and the

keratinocyte growth factor. *J. Biol. Chem.*, **274**: 36132-36138.

Bernfield M, Koyenyesi R, Kato K, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, and Lose EJ. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **8**: 365-393.

Besser D, Presta M, and Nagamine Y. (1995) Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth Differ.*, **6**: 1009-1017.

Bessman MJ, Frick DN, and O'Handley SF. (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J. Biol. Chem.*, **271**: 25059-25062.

Bhattacharya B, Prasad GL, Valverius EM, Salomon DS, and Cooper HL. (1990) Tropomyosins of human mammary epithelial cells: consistent defects expression in mammary carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, **50**: 2105-2112.

Bhisutthibhan J, Philbert MA, Fujioka H, Aikawa M, and Meshnick SR. (1999) The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur. J. Cell. Biol.*, **78**: 665-670.

Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez JC, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, Hochstrasser DF and Tosi P. (1997) Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*, **18**:2832-2841.

Biscardi JS, Tice DA, and Parsons SJ. (1999) C-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv. Cancer Res.*, **76**: 61-119.

Blachère NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NJ, Bassu S, Udono H, and Srivastava PK. (1997) Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.*, **186**: 1315-1322.

Blackstock WP and Weir MP. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.*, **17**: 121-127.

Blanckaert V, Hebbar M, Louchez MM, Vilain MO, Schelling ME, and Peyrat JP. (1998) Basic fibroblast growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, **4**: 2939-2947.

Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, and Sugden PH. (1994) Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **269**: 1110-1119.

Bohm, H., Bennhorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nurnberg, P., Kraft, R., Otto, A. and Bielka, H. (1989) The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor : translational control, cloning and primary structure. *Biochem. Int.*, **19**:

B

277-286.

B

- Boilly B, Cavanaugh C, Thomas D, Hondermarck H, Bryant S, and Bradshaw RA.** (1990) Presence of acidic FGF and its binding sites in the axolotl regeneration blastema. *Developmental Biology*, **145**: 183-187.
- Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, and Le Bourhis X.** (2000) FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor*, **4**: 1-8.
- Bommer UA, Lazaris-Karatzas A, De Benedetti A, Nurnberg P, Benndorf R, Bielka H, and Sonenberg N.** (1994) Translational regulation of the mammalian growth-related protein P23. *Cell. Mol. Biol. Res.*, **40**: 633-641.
- Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, and Maroteaux P.** (1996) Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *Am. J. Med. Genet.*, **63**: 148-154.
- Bonneh-Barkay D, Shlissel M, Berman B, Shaoul E, Admon A, Vlodaysky I, Carey DJ, Asundi VK, Reich-Slotky R, and Ron D.** (1997) Identification of glypicans as a dual modulator of the biological activity of fibroblast growth factors. *J. Biol. Chem.*, **272**: 12415-12421.
- Bonnet C, Perret E, Dumont X, Picard A, Caput D, and Lenaers G.** (2000) Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast*, **16**: 23-33.
- Borg A, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SAW, Olsson H, Killander D, and McGuire WL.** (1991) Association of int-2/hst-1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *Br. J. Cancer*, **63**, 136-142.
- Brickman YG, Nurcombe V, Ford MD, Gallagher JT, Barlett PF, Turnbull JE.** (1998) Structural comparison of fibroblast growth factor-specific heparan sulfates derived from a growing or differentiating neuroepithelial cell line. *Glycobiology*, **8**: 463-467.
- Briozzo P, Badet J, Capony F, Pieri I, Montcourrier P, Barritault D, and 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.
- Bronzert DA, Pantazis P, Antoniadis HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB, and Lippman ME.** (1987) Synthesis and secretion of PDGF-like growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5763-5767.
- Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, and Pouyssegur J.** (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for

growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.*, **18**: 664-674.

Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, deFazio A, Watts CK, Musgrove E, and Sutherland RL. (1993) Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, **8**: 2127-2133.

Bugler B, Almaric F, and Prats H. (1991) Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 573-577.

Bunnag P, Waddell KS, Varban ML, and Chiu IM. (1991) Transformed phenotype conferred to NIH/3T3 cells by ectopic expression of heparin-binding growth factor 1/acidic fibroblast growth factor. *In vitro Cell Dev. Biol.*, **27**: 89-96.

Burack WR and Sturgill TW. (1997) The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry*, **36**: 5929-5933.

Burger AM, Zhang X, Li H, Ostrowski JL, Beatty B, Venanzoni M, Papas T, and Seth A. (1998) Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene*, **16**: 2459-2467.

Burgess WH, Dionne CA, Kaplow J, Mudd R, Friesel R, Zilberstein A, Schlessinger J, and Jaye M. (1990) Characterization and cDNA cloning of phospholipase c-gamma, a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 4770-4777.

BurgessWH, and Maciag T. (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 575-606.

Burke D, Wilkes D, Blundell TL, and Malcom S. (1998) Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *TIBS*, **23**: 59-62.

Burrus LW, and Olwin BB. (1989) Isolation of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factor from embryonic chick. *J. Biol. Chem.*, **264**: 18647-18653.

Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, and Olwin BB. (1992) Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 5600-5609.

Cance WG, Craven RJ, Bergman M, Xu L, Alitalo K, and Liu ET. (1994) Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells. *Cell Growth Diff.*, **5**: 1347-1355.

Cao D, Fan ST, and Chung SS. (1998) Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J. Biol. Chem.*, **273**: 11429-11435.

Carstens RP, Eaton JV, Krigman HR, Walther PJ, and Garcia-Blanco MA. (1997) Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) in human prostate cancer. *Oncogene*, **15**: 3059-3065.

Celis JE, Ostergaard M, Basse B, Celis A, Lauridsen JB, Ratz GP, Andersen

- I, Hein B, Wolf H, Orntoft TF, and Rasmussen HH. (1996) Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res.*, **56**: 4782-4790.
- Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R, and Merlino G. (1998) Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *EMBO J.*, **17**: 1642-1655.
- Champème MH, Bièche I, Hacène K, and Lidereau R. (1994) Int-2/FGF3 amplification is a better independent predictor of relapse than c-myc and c-erbB-2/neu amplifications in primary human breast cancer. *Modern Pathol.*, **7**: 900-905.
- Champion-Arnaud P, Ronsin C, Gilbert E, Gesnel MC, Houssaint E, and Breathnach R. (1991) Multiple messenger RNAs code for proteins related to the BEK fibroblast growth factor receptor. *Oncogene*, **6**: 979-987.
- Chandler LA, Sosnowski BA, Greenlees L, Aukerman SL, Baird A, and Pierce GF. (1999) Prevalent expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors and FGF2 in human tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, **81**: 451-458.
- Chang HC, and Rubin GM. (1997) 14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**: 1132-1139.
- Chellaiah A, Yuan W, Chellaiah M, and Ornitz DM. (1999) Mapping ligand binding domains in chimeric fibroblast growth factor receptor molecules. Multiple regions determine ligand binding specificity. *J. Biol. Chem.*, **274**: 34785-34794.
- Chevalier S, MacDonald N, Tonge R, Rayner S, Rowlison R, Shaw J, Young J, Davison M, and Roberts RA. (2000) Proteomic analysis of differential protein expression in primary hepatocytes induced by EGF, tumour necrosis factor alpha or the peroxisome proliferator nafenopin. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 4624-4634.
- Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquié D, Fuchs A, Kieffer S, Rossignol M, Munardi J, Garin J, and Rabilloud T. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **19**: 1901-1909.
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, and Brawerman G. (1988) Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 2350.
- Chong BE, Lubman DM, Miller FR, and Rosenspire AJ. (1999) Rapid screening of protein profiles of human breast cancer cell lines using non-porous reversed-phase high performance liquid chromatography separation with matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectral analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**: 1808-1812.
- Chua CC, Geiman DE, Keller GH, and Ladda RL. (1985) Induction of collagenase

secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors. *J. Biol. Chem.*, **260**: 5213-5216.

- Chung KC, Gomes I, Wang D, Lau LF, and Rosner MR.** (1998) Raf and fibroblast growth factor phosphorylate Elk1 and activate serum response element of the immediate early gene *pip92* by mitogen-activated protein kinase-independent as well as dependent signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 2272-2281.
- Chung S, Kim M, Choi W, Chung J, Lee K.** (2000) Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett.*, **156**: 185-190.
- Cizmeci-Smith G, Langan E, Youkey J, Showalter LJ, and Carey DJ.** (1997) Syndecan-4 is a primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**: 172-180.
- Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, Der CJ, and Campbell SL.** (1997) 14-3-3 zeta negatively regulates Raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J. Biol. Chem.*, **272**: 20990-20993.
- Cobb MH and Goldsmith EJ.** (2000) Dimerization in MAP-kinase signaling. *TIBS*, **25**: 7-9.
- Coleman S, and Daniel CW.** (1990) Inhibition of mouse mammary ductal morphogenesis and down-regulation of the EGF-receptor by epidermal growth factor. *Dev. Biol.*, **137**: 425-433.
- Colomer R, Aparicio J, Montero S, Guzman C, Larrodera L, and Cortés-Funes H.** (1997) Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer*, **76**: 1215-1220.
- Coltrini D, Rusnati M, Zoppetti G, Oreste P, Isacchi A, Caccia P, Bergonzini L, and Presta M.** (1993) Biochemical bases of the interaction of human basic fibroblast growth factor with glycosaminoglycans. New insights from trypsin digestion studies. *Eur. J. Biochem.*, **214**: 51-58
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, and Ornitz DM.** (1996) Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.*, **12**: 390-397.
- Coope RC, Browne PJ, Yiangou C, Bansal GS, Walters J, Groome N, Shousha S, Johnston CL, Coombes RC, and Gomm JJ.** (1997) The location of acidic fibroblast growth factor in the breast is dependent on the activity of proteases present in breast cancer tissue. *Br. J. Cancer*, **75**: 1621-1630.
- Corbit KC, Foster DA, and Rosner MR.** (1999) Protein kinase C delta mediates neurogenic but not mitogenic activation of Mitogen-Activated protein Kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 4209-4218.

C

- Cordeiro PJ, Seckel BR, Lipton SA, Amore PA, Wagner J, and Madison R.** (1989) Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast. Recons. Surg.*, **83**: 1013-1019.
- Coulier F, Pizette S, Ollendorff V, DeLapeyrière O, and Birnbaum D.** (1994) The human and mouse fibroblast growth factor 6 (FGF6) genes and their products: possible implication in muscle development. *Prog. Growth Factor Res.*, **5**: 1-14.
- Coutts AS and Murphy LC.** (1998) Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **58**: 4071-4074.
- Cross MJ, Hodgkin MN, Roberts S, Landgren E, Wakelam MJO, and Claesson-Welsh L.** (2000) Tyrosine 766 in the fibroblast growth factor receptor-1 is required for FGF-stimulation of phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A2, phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal reorganisation in porcine aortic endothelial cells. *J. Cell Sci.*, **113**: 643-651.
- Curto M, Frankel P, Carrero A, and Foster DA.** (1998) Novel recruitment of Shc, Grb2, and Sos by fibroblast growth factor receptor-1 in v-Src transformed cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **243**: 555-560.
- D'Angelo G, Struman I, Martial J, and Weiner RI.** (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa-N-terminal fragment of prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6374-6378.
- Dabin I, and Courtois Y.** (1991) Acidic fibroblast growth factor overexpression in corneal epithelial wound healing. *Growth Factors*, **5**: 129-139.
- Dale EC, Yang X, Moore SK, and Shyamala G.** (1997) Murine 86-kDa heat shock protein gene and promoter. *Cell. Stress Chaperones*, **2**: 87-93.
- Damerval C, deVienne D, Zivy M, Tarroux P, and Vincens P.** (1993) L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines. *Biofutur, le technoscope*, **123**: 1-18.
- Davies BR, Fernig DG, Barraclough R, and Rudland PS.** (1996) Effect on tumorigenicity and metastasis of transfection of a diploid benign rat mammary epithelial cell line with DNA corresponding to the mRNA for basic fibroblast growth factor. *Int. J. Cancer*, **65**: 104-111.
- Daviet I, Herbert JM, and Maffrand JP.** (1990) Involvement of protein kinase C in the mitogenic and chemotaxis effects of basic fibroblast growth factor on bovine cerebral cortex capillary endothelial cells. *FEBS Lett.*, **259**: 315-317.
- Davis RJ.** (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, **268**: 14553-14556.
- Dealy CN, Seghatoleslami MR, Ferrari D, and Kosher RA.** (1997) FGF-stimulated outgrowth and proliferation of limb mesoderm is dependent on syndecan-3.

C
D

Dev. Biol., **184**: 343-350.

DeGregori J, Kowalik T, and Nevins JR. (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 4215-4224.

deLapeyrière O, Ollendorff V, Planche J, Ott MO, Pizette S, Coulier F, and Birnbaum D. (1993) Expression of the *fgf6* gene is restricted to developing skeletal muscle in the mouse embryos. *Development*, **118**: 601-611.

Delehedde M, Boilly B, and Hondermarck H. (1995) Differential responsiveness of human breast cancer cells to basic fibroblast growth factor. *Oncology Res.*, **7**: 399-405.

Delehedde M, Deudon E, Boilly B, and 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.

Delehedde M, Seve M, Sergeant N, Lyon M, Rudland PS, and Fernig DG. (2000) FGF-2 stimulation of p42/p44MAPK phosphorylation and I-kappaB degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, sous presse.

Dell'Era P, Mohammadi M, and Presta M. (1999) Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **10**: 23-33.

Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen M, Daugherty C, Ornitz DM, and Leder P. (1994) Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.*, **8**: 3045-3057.

Denhardt DT. (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediates by Ras/Rho proteins in the mammalian cell : the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.*, **318**: 729-747.

Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, and Lapière CM. (1997) Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.*, **57**: 5590-5597.

Derossi D, Williams EJ, Green PJ, Dunican DJ, and Doherty P. (1998) Stimulation of mitogenesis by a cell-permeable PI 3-kinase binding peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**: 148-152.

Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, Boilly B, and Hondermarck H. (1998) Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **273**: 16659-16662.

Désirée L, Courtois Y, and Jeanny JC. (1998) Suppression of fibroblast growth

D

factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival. *Exp. Cell. Res.*, **241**: 210-221.

Dickson RB, Johnson MD, Bano M, Shi E, Kurebayashi J, Ziff B, Martinez-Lacaci I, Amundadottir LT, and Lippman ME. (1992) Growth factors in breast cancer : mitogenesis to transformation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **43**: 69-78.

Dickson RB, Thompson EW, and Lippman ME. (1990) Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **37**: 305-316.

Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, and Schlessinger J. (1990) Cloning and expression of two distinct high affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J.*, **9**: 2685-2692.

Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, and Zeller R. (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.*, **17**: 4213-4225.

Dotto GP, Moellmann G, Ghosh S, Edwards M, and Halaban R. (1989) Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J. Cell Biol.*, **109**: 3115-3128.

Duan DS, Werner S, and Williams LT. (1992) A naturally occurring secreted form of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 binds basic FGF in preference over acidic FGF. *J. Biol. Chem.*, **267**: 16067-16080.

Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, and Sussenbach JS. (1997) Mitogenic signaling of insulin-like growth factor-I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **272**: 31163-31171.

Edvardsson U, Alexandersson M, Brockenhuus von Lowenhielm H, Nystrom AC, Ljung B, Nilsson F, and Dahllof B. (1999) A proteome analysis of livers from obese (ob/ob) mice treated with the peroxisome proliferator WY14,643. *Electrophoresis*, **20**: 935-942.

el Yazidi I and Boilly-Marer Y. (1995) Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res.*, **15**: 783-790.

El-Ashry D, Miller DL, Kharbanda S, Lippman ME, and Kern FG. (1997) Constitutive Raf-1 kinase activity in breast cancer cells induces both estrogen-independent growth and apoptosis. *Oncogene*, **115**: 423-435.

Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, Katsumata T,

**D
E**

- Negoro T, Nakatsuka M, Birnbaum D, Coulier F, and Itoh N. (1997) Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J. Biol. Chem.*, **272**: 23191-23194.
- Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, and Eppenberger-Castori S. (1998) Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, **16**: 3129-3136.
- Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, and Matthews BW. (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 3441-3445.
- Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Lindhardt RJ, and Rees DC. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science*, **271**: 1116-1120.
- Fan J, and Bertino JR. (1997) K-ras modulates the cell cycle via both positive and negative regulatory pathways. *Oncogene*, **14**: 2595-2607.
- Fannon M, and Nugent MA. (1996) Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates DNA synthesis in Balb/c3T3 cells in absence of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **271**: 17949-17956.
- Fannon M, Forsten KE, and Nugent MA. (2000) Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: A model for regulation of cellular response. *Biochemistry*, **39**: 1434-1445.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, and Dickson C. (1995) Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and in mammary gland development. *Genes Dev.*, **9**: 2364-2372.
- Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW and Williams LT. (1994) Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature*, **371**: 612-614.
- Feng S, Wang F, Matsubara A, Kan M, and McKeegan WL. (1997) Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res.*, **57**: 5369-5378.
- Fenig E, Wieder R, Paglin S, Wang H, Persaud R, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, and Yahalom J. (1997) Basic fibroblast growth factor confers growth inhibition and mitogen-activated protein kinase in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **3**: 135-142.
- Fernig DG and Gallagher JT. (1994) Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.*, **5**: 353-377.
- Fernig DG, Barraclough R, Ke Y, Wilkinson MC, Rudland PS, and Smith

- JA.** (1993) Ectopic production of heparin-binding growth factors and receptors for basic fibroblast growth factor by rat mammary epithelial cell lines from malignant metastatic tumours. *Int. J. Cancer*, **54**: 629-635.
- Fernig DG, Chen HL, Rahmoune H, Descamps S, Boilly B, and Hondermarck H.** (2000) Differential regulation of FGF-1 and -2 mitogenic activity is related to their kinetics of binding to heparan sulfate in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**: 770-776.
- Fernig DG, Smith JA, and Rudland PS.** (1990) Appearance of basic fibroblast growth factor receptors upon differentiation of rat mammary epithelial to myoepithelial-like cells in culture. *J. Cell. Physiol.*, **142**: 108-116.
- Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ, and Farrar WL.** (1988) Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3850-3854.
- Figueroa JA, and Yec D.** (1992) The insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **22**: 381-390.
- Filla MS, Dam P, and Rapraeger AC.** (1998) The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J. Cell. Physiol.*, **174**: 310-321.
- Fioravanti L, Cappelletti V, Coradini D, Miodini P, Borsani G, Daidone MG, and Di Fronzo G.** (1997) int-2 oncogene amplification and prognosis in node-negative breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, **74**: 620-624.
- Fiore F, Planche J, Gibier P, Sebille A, deLapeyrière O, and Birnbaum D.** (1997) Apparent normal phenotype of *fgf6*^{-/-} mice. *Int. J. Dev. Biol.*, **41**: 639-642.
- Florkiewicz RZ and Sommer A.** (1989) Human basic fibroblast growth factor encodes four polypeptides: three initiate translation from non AUG codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 3978-3981.
- Floss T, Arnold HH, and Braun T.** (1997) A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.*, **11**: 2040-2051.
- Fox GM, Schiffer SG, Rohde MF, Tsai LB, Banks AR, and 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.
- Franzen B, Auer, G, Alaiya AA, Eriksson E, Uryu K, Hirano T, Okuzawa K, Kato H and Linder S.** (1996a) Assessment of homogeneity in polypeptide expression in breast carcinomas shows widely variable expression in highly malignant tumors. *Int. J. Cancer.*, **69**: 408-414.
- Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Fujioka K, Bergman AC, Jornvall H, and Auer G.** Analysis of polypeptide expression in benign and

F

- malignant human breast lesions. (1997) *Electrophoresis*, **18**: 582-587.
- Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, and Auer G.** (1996b) Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. *Br. J. Cancer*, **74**: 1632-1638.
- Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, and Auer G.** (1996) Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. *Br. J. Cancer*, **73**: 1632-1638.
- Freed E, Symons M, MacDonald SG, McCormick F, and Ruggieri R.** (1994) Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science*, **265**: 1713-1716.
- Frödin M, and Gammeltoft S.** (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **151**: 65-77.
- Fu H, Xia K, Pallas DC, Cui C, Conroy K, Narsmhan RP, Mamon H, Collier RJ, and Roberts TM.** (1994) Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science*, **266**: 126-129.
- Futcher B, Latter GI, Lonardo P, McLaughlin CS, and Garrels JI.** (1999) A sampling of the yeast proteome. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 7357-7368.
- Gagnon ML, Moy GK, and Klagsburn M.** (1999) Characterization of the promoter for the human antisense fibroblast growth factor-2 gene; regulation by Ets in Jurkat T cells. *J. Cell. Biochem.*, **72**: 492-506.
- Gallagher JT.** (1998) The interaction and regulation of basic and acidic fibroblast growth factors by heparan sulphate. *Trends Glyco. Glycotech.*, **10**: 137-144.
- Galzie Z, Fernig DG, Smith JA, Poston GJ, and Kinsella AR.** (1997) Invasion of human colorectal carcinoma cells is promoted by endogenous basic fibroblast growth factor. *Int. J. Cancer*, **71**: 390-395.
- Gardner AM and Johnson GL.** (1996) Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**: 14560-14566.
- Gately S, Tsanaclis AM, Takano S, Klagsbrun M, and Brem S.** (1995) Cells transfected with the basic fibroblast growth factor gene fused to a signal sequence are invasive in vitro and in situ in the brain. *Neurosurgery*, **36**: 780-788.
- Gerwins P, Skoldenberg E, and Claseson-Welsh L.** (2000) Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **34**: 185-194.
- Gilbert E, Del Gatto F, Champion-Arnaud P, Gesnel MC, and Breathnach R.** (1993) Control of BEK and K-SAM splice sites in alternative splicing of the fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 5461-5468.
- Gille H, Sharrocks AD, and Shaw PE.** (1992) Phosphorylation of transcription factor

F
G

p62^{TCF} by MAP kinase stimulates ternary complex formation at *c-fos* promoter. *Nature*, **358**: 414-424.

G

Gillespie LL, Chen G, and Paterno GD. (1995) Cloning of a fibroblast growth factor receptor 1 variant form *Xenopus* embryos that lacks a protein kinase C site important for the regulation of receptor activity. *J Biol. Chem.*, **270**: 22758-22763.

Giometti CS, Williams K and Tollaksen SL. (1997) A two-dimensional electrophoresis database of human breast epithelial cell proteins. *Electrophoresis*, **18**: 573-581.

Giuliani R, Bastaki M, Coltrini D, and Presta M. (1999) Role of of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in urokinase-type plasminogen activator upregulation and in vitro angiogenesis by fibroblast growth factor-2. *J. Cell Sci.*, **112**: 2597-2606.

Goh KC, Lim YP, Ong SH, Siak CB, Cao X, Tan YH, and Guy GR. (1996) Identification of p90, a prominent tyrosine-phosphorylated protein in fibroblast growth factor-stimulated cells, as 80K-H. *J. Biol. Chem.*, **271**: 5832-5838.

Goldfarb M, Deed R, MacAllan D, Walther W, Dickson C, and Peters G. (1991) Cell transformation by Int-2, a member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene*, **6**: 65-71.

Gomm JJ, Browne PJ, Coope RC, Yiangou C, Bansal GS, Yiangou C, Johnston CL, Mason R, and Coombes RC. (1997) A paracrine role for myoepithelial cell-derived FGF2 in the normal human breast. *Exp. Cell. Res.*, **234**: 165-173.

Gomm JJ, Smith J, Ryall GK, Baillie R, Turnbull L, and Coombes RC. (1991) Localisation of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1 in the human mammary gland. *Cancer Res.*, **51**: 4685-4692.

Gonatas JO, Mourelatos Z, Stieber A, Lane WS, Brosius J, and Gonatas NK. (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.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, and Weiss W. (1999) Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, **20**: 712-717

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Scheibe B, Wildgruber R, and Weiss W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **21**: 1037-1053.

Gospodarowicz D, and Cheng J. (1986) Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell. Physiol.*, **128**: 475-484.

Gospodarowicz D. (1974) Localization of a fibroblast growth factor and its effects alone

and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, **249**: 123-129.

- Gospodarowicz D.** (1975) Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, **250**: 2515-2520.
- Greene JM, Li YL, Yourey PA, Gruber J, Carter KC, Shell BK, Dillon PA, Florence C, Duan DR, Blunt A, Ornitz DM, Ruben SM, and Alderson RF.** (1998) Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. *Eur. J. Neurosci.*, **10**: 1911-1925.
- Grunz H, McKeehan WL, Knochel W, Born J, and Tiedemann H.** (1988) Induction of mesodermal tissues by acidic and basic heparin binding growth factors. *Cell. Differ.*, **22**: 183-189.
- Gualandris A, Cotrini D, Bergonzoni L, Issachi A, Tenca S, Ginelli B, and Presta M.** (1993) The NH₂-terminal extension of high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor is not essential for the binding of bFGF to nuclear chromatin in transfected NIH 3T3 cells. *Growth Factors*, **8**: 49-60.
- Gupta RW, and Mayer BJ.** (1998) Dominant-negative mutants of the SH2/SH3 adapters Nck and Grb2 inhibit MAP kinase activation and mesoderm-specific gene induction by eFGF in *Xenopus*. *Oncogene*, **17**: 2155-2165.
- Guy CT, Muthuswamy SK, Cardiff RD, Soriano P, and Muller JM.** (1993) Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice. *Genes Dev.*, **8**: 23-32.
- Hadari YR, Kouhara H, Lax I, and Schlessinger J.** (1998). Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 3966-3973.
- Hagedorn M and Bkfalvi A.** (2000) Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **34**: 89-110.
- Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, Ehleiter D, Michaeli J, Vlodavsky I and Fuks Z.** (1994) Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **54**: 2591-2597.
- Hajitou A, Baramova EN, Bajou K, Noë V, Bruyneel E, Mareel M, Collette J, Foidart JM, and Calberg-Bacq CM.** (1998) FGF-3 and FGF-4 elicit distinct oncogenic properties in mouse mammary myoepithelial cells. *Oncogene*, **17**: 2059-2071.
- Hall FL, Williams RT, Wu L, Wu F, Carbonaro-Hall DA, Harper JW, and Warburton D.** (1993) Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. *Oncogene*, **8**: 1377-1384.
- Hanks SK, Quinn AM, and Hunter T.** (1988) The protein kinase family: Conserved

G
H

- features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**: 42-52.
- Hart KC, Robertson SC, Kanemitsu MY, Meyer AN, Tynan JA, and Donoghue DJ.** (2000) Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene*, **19**: 3309-3320.
- Hartung H, Feldman B, Lovic H, Coulier F, Birnbaum D, and Goldfarb M.** (1997) Murine FGF-12 and FGF-13: expression in embryonic nervous system, connective tissue and heart. *Mech. Dev.*, **64**: 31-39.
- Hebert JM, Basilico C, Goldfarb M, Haub O, and Martin GR.** (1990) Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression patterns during embryogenesis. *Dev. Biol.*, **138**: 454-463.
- Hecht D, Zimmerman N, Bedford M, Avivi A, and Yayon A.** (1995) Identification of fibroblast growth factor 9 (FGF9) as a high affinity, heparin dependent ligand for FGF receptors 3 and 2 but not for FGF receptors 1 and 4. *Growth Factors*, **12**: 223-233.
- Heffelfinger SC, Miller MA, Yassin R, and Gear R.** (1999) Angiogenic growth factors in preinvasive breast disease. *Clin. Cancer Res.*, **5**: 2867-2876.
- Hennipman A, Oirschot van BA, Smits J, Rijksen G, and Staal GEL** (1989). Tyrosine kinase activity in breast cancer, benign breast disease, and normal breast tissue. *Cancer Res.*, **49**: 516-521.
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, and Wong SC.** (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 5011-5015.
- Hickey E, Brandon SE, Smale G, Lloyd D, and Weber LA.** (1989) Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 2615-2626.
- Hirano T, Franzen B, Uryu K, Okuzawa K, Alayia AA, Vanky F, Rodrigues L, Ebihara Y, Kato H, and Auer G.** (1995) Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br. J. Cancer*, **72**: 840-848.
- Hochstrasser DF, Frutiger S, Paquet N, Bairoch A, Pasquali C, Sanchez JC, Tissot JD, Bjellqvist B, Vargas R, Appel RD, and Hughes GJ.** (1992) Human liver protein map: a reference database established by microsequencing and gel comparison. *Electrophoresis*, **13**: 992-1001.
- Hondermarck H, McLaughlin CS, Patterson SD, and Bradshaw RA.** (1994) Early changes in protein synthesis induced by basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, and epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 9377-9381.
- Hoshikawa M, Ohbayashi N, Yonamine A, Konishi M, Ozaki K, Fukui S,**

H

- and Itoh N.** (1998) Structure and expression of a novel fibroblast growth factor, FGF-17, preferentially expressed in the embryonic brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**: 187-191.
- Hou J, Kan M, McKeehan K, McBride G, Adams P, and McKeehan WL.** (1991) Fibroblast growth factor receptors from liver vary in three structural domains. *Science*, **251**: 665-668.
- Hou J, Kan M, Wang F, Xu JM, Nakahara M, McBride G, McKeehan K, and McKeehan WL.** (1992) Substitution of putative half-cysteine residues in heparin-binding fibroblast growth factor receptors. Loss of binding activity in both two and three loop isoforms. *J. Biol. Chem.*, **267**: 17804-17808.
- Hou J, McKeehan K, Kan M, Carr SA, Huddleston MJ, Crabb JW, and McKeehan WL.** (1993) Identification of tyrosines 154 and 307 in the extracellular domain and 653 and 766 in the intracellular domain as phosphorylation sites in the heparin-binding fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase (flg). *Protein Sci.*, **2**: 86-92.
- Hrzenjak M and Shain SA.** (1997) Fibroblast growth factor-2 and TPA enhance prostate-cancer-cell proliferation and activate members of the Ras and PKC signal transduction pathways. *Recept. Signal Transduct.*, **7**, 207-219.
- Hu MC, Qiu WR, Wang YP, Hill D, Ring DB, Scully S, Bolon B, DeRose M, Luethy R, Simonet WS, Arakawa T, and Dailenko DM.** (1999) FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 6063-6074.
- Hu MC, Wang YP, and Qiu WR.** (1998) Human fibroblast growth factor-18 stimulates fibroblast cell proliferation and is mapped to chromosome 14p11. *Oncogene*, **18**: 2635-2642.
- Huang J, Mohammadi M, Rodrigues GA, and Schlessinger J.** (1995) Reduced activation of Raf-1 and MAP kinase by a fibroblast growth factor receptor mutant deficient in stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **270**: 5065-5072.
- Huang S, New L, Pan Z, Han J, and Nemerow GR.** (2000) Urokinase plasminogen activator/urokinase-specific surface receptor expression and matrix invasion by breast cancer cells requires constitutive p38 α mitogen-activated protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **275**: 12266-12272.
- Hulleman E, Bijvelt JJM, Verkleij AJ, Verrips CT, and Boonstra J.** (1999) Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase p42^{MAPK} during the ongoing cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, **180**: 325-333.
- Humphery-Smith I, and Blackstock W.** (1997) Proteome analysis: Genomics via the output rather than the input code. *J. Prot. Chem.*, **16**: 537-543.

H

- Imagawa W, Cunha GR, Young P, and Nandi S.** (1994) Keratinocyte growth factor and acidic fibroblast growth factor are mitogens for primary cultures of mammary epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**: 1165-1169.
- Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, and Murdoch AD.** (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.*, **302**: 625-639.
- Iozzo RV.** (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 609-652.
- Irie K, Gotoh Y, Yashar BM, Errede B, Nishida E, and Matsumoto K.** (1994) Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science*, **265**: 1716-1719.
- Ishai-Michaeli R, Svahn CM, Weber M, Chajek-Shaul T, Korner G, Ekre HP, and Vlodayvsky I.** (1992) Importance of size and sulfatation of heparin in release of basic fibroblast growth factor from the vascular endothelium and extracellular matrix. *Biochemistry*, **31**: 2080-2088.
- Issandou M and Darbon JM.** (1991) Basic fibroblast growth factor stimulates glomerular mesangial cell proliferation through a protein kinase C-independent pathway. *Growth Factors*, **5**: 255-264.
- Jaakkola P and Jalkanen M.** (1999) Transcriptional regulation of syndecan-1 expression by growth factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **63**: 109-138.
- Jaakkola P, Maatta A, and Jalkanen M.** (1998) The activation and composition of FiRE (an FGF-inducible response element) differ in a cell type- and growth factor-specific manner. *Oncogene*, **17**: 1279-1286.
- Jaakkola S, Salmikangas P, Nylund S, Partanen J, Armstrong E, Pyrhönen S, Lehtovirta P, and Nevanlinna H.** (1993) Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int. J. Cancer*, **54**: 378-382.
- Jackson D, Bresnick J, Rosewell I, Crafton T, Poulson R, Stamp G, and Dickson C.** (1997) Fibroblast growth factor receptor signalling has a role in lobuloalveolar development of the mammary gland. *J. Cell Sci.*, **110**: 1261-1268.
- Jackson JG, Yoneda T, Clark GM, and Yee D.** (2000) Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential. *Clin. Cancer Res.*, **6**: 1135-1139.
- Jacquemier J, Adelaide J Parc P, Penault-Llorca F, Planche J, deLapeyrière O, and Birnbaum D.** (1994) Expression of the FGFR1 gene in human breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, **59**: 373-378.
- Jacquemier J, Sun ZZ, Penault-Llorca F, Geneix J, Devilard E, Adelaide J, and Birnbaum D.** (1998) FGF7 protein expression in human breast carcinomas. *J. Pathol.*, **186**: 269-274.

- Jakobovits A, Shackelford G, Varmus H, and Martin G.** (1986) Two proto-oncogenes implicated in mammary carcinogenesis, int-1 and int-2, are independently regulated during mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7806-7810.
- James P, Quadroni M, Carafoli E, and Gonnet G.** (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**: 58-64.
- Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, and Nordheim A.** (1993) Activation of ternary complex Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.*, **12**: 5097-5140.
- Jaye M, Lyall RM, Mudd R, Schlessinger J, and 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, and Dionne CA.** (1992) Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: Molecular analysis and signal transduction. *Biochem. Biophys. Acta*, **1135**: 185-199.
- Jayson GC, Vives C, Paraskeva C, Schofield K, Coutts J, Fleetwood A, and Gallagher JT.** (1999) Coordinated modulation of the fibroblast growth factor dual receptor mechanism during transformation from human colon adenoma to carcinoma. *Int. J. Cancer*, **82**: 298-304.
- Jerome V, Leger J, Devin J, Baulieu EE, and Catelli MG.** (1991) Growth factors acting via tyrosine kinase receptors induce HSP90 alpha gene expression. *Growth Factors*, **4**: 317-327.
- Ji H, Reid GE, Moritz RL, Eddes JS, Burgess AW, and Simpson RJ.** (1997) A two-dimensional gel database of human colon carcinoma proteins. *Electrophoresis*, **18**: 605-613.
- Jin W, McCutcheon IE, Fuller GN, Huang ESC, and Cote GJ.** (2000) Fibroblast growth factor receptor-1-alpha- exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors. *Cancer Res.*, **60**: 1221-1224.
- Johnson DE and Williams LT.** (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.*, **60**: 1-41.
- Johnson DE, Lee PL, Lu J, and Williams LT.** (1990) Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 4728-4736.
- Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, and Williams LT.** (1991) The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 4627-4634.
- Johnson MR, Valentine C, Basilico C, and Mansukhani A.** (1998) FGF signaling activates STAT1 and p21 and inhibits the estrogen response and proliferation of MCF-7 cells. *Oncogene*, **16**: 2647-2656.
- Johnston CL, Cox HC, Gomm JJ, and Coombes RC.** (1995) bFGF and aFGF

J

induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement. *Biochem. J.*, **306**: 609-616.

Johnston CL, Cox HL, Gomm JJ, and Coombes RC. (1995) Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. *J. Biol. Chem.*, **270**: 30643-30650.

Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, and Yolken RH. (2000) Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Mol. Psychiatry*, **5**: 142-149.

Jouanneau J, Plouet J, Moens G, and Thiery JP. (1997) FGF-2 and FGF-1 expressed in rat bladder carcinoma cells have similar angiogenic potential but different tumorigenic properties in vivo. *Oncogene*, **14**: 671-676.

Jungblut PR, Schaibe UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, and Kaufmann SHE. (1999) Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacter bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.*, **33**: 1103-1117.

Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindi-Eberhart E, Stilik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Müller EC, Sokolowka-Köhler W, Grabher G, and Stöffler G. (1999) Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*, **20**: 2100-2110.

Kan M, Huang J, Manson PE, Yasimitsu H, Carr B, and McKeegan WL. (1989) Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 7432-7436.

Kan M, Wang F, Crabb JW, Hou J, and McKeegan WL. (1993) An essential heparin binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science*, **259**: 1918-1921

Kan M, Wang F, To B, Gabriel JL, and McKeegan WL. (1996) Divalent cations and heparin/heparan sulfate cooperate to control assembly and activity of fibroblast growth factor receptor complex. *J. Biol. Chem.*, **271**: 26143-26148.

Kanai M, Göke M, Tsunekawa S, and Podolsky DK. (1997) Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. *J. Biol. Chem.*, **272**: 6621-6628.

Kanda S, Hodgkin MN, Woodfield RJ, Wakelam MJ, Thomas G, and Claesson-Welsh L. (1997) Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 23347-23353.

J
K

- Kanda S, Lerner EC, Tsuda S, Shono T, Kanetake H, and Smithgall TE.** (2000) The non-receptor protein tyrosine-kinase c-Fes is involved in fibroblast growth factor-2-induced chemotaxis of murine brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **275**: 10105-10111.
- Karas M, and Hillenkamp F.** (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, **60**: 2299-2301.
- Karey KP and Sirbasku DA.** (1988) Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 beta-estradiol. *Cancer Res.*, **48**: 4083-4092.
- Kasus-Jacobi A, Perdereau D, Auzan C, Clauser E, Van Obberghen E, Mauvais-Jarvis F, Girard J, and Burnol AF.** (1998) Identification of the rat adapter Grb14 as an inhibitor of insulin actions. *J. Biol. Chem.*, **273**: 26026-26035.
- Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, and Bernfield M.** (1998) Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat. Med.*, **4**: 691-697.
- Kato S and Sekine K.** (1999) FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.* (Noisy-le-grand), **45**: 631-638.
- Kay EP, Park SY, Ko MK, and Lee SC.** (1998) Fibroblast growth factor 2 uses PLC-gamma1 for cell proliferation and PI3-kinase for alteration of cell shape and cell proliferation in corneal endothelial cells. *Mol. Vis.*, **27**: 22.
- Ke Y, Fernig DG, Wilkinson MC, Winstanley JH, Smith JA, Rudland PS, and 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.
- Kebarle P, and Tang L.** (1993) *Anal. Chem.*, **63**: 972-986.
- Kelman Z.** (1998) PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene*, **14**: 629-640.
- Kent KC, Harrington EO, Chang JD, Mallette S, and Ware JA.** (1995) Requirement for protein kinase C activation in basic fibroblast growth factor-induced human endothelial cell proliferation. *Circ. Res.*, **77**: 231-238.
- Kerbel RS.** (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, **21**: 505-515.
- Khanuja PS, Lehr JE, Soule HD, Gehani SK, Noto AC, Choudhury S, Chen R, and Pienta KJ.** (1993) Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. *Cancer Res.*, **53**: 3394-3398.
- Kiefer MC, Stephans JC, Crawford K, Okino K, and Barr PJ.** (1990) Ligand affinity cloning structure of a cell surface heparan sulfate proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 6985-6989.
- Kimelman D, Abraham JA, Haaparanta T, Palisi TM, and Kirschner MW.**

K

(1988) The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: its role as a natural mesoderm inducer. *Science*, **242**: 1387-1394.

Kirikoshi H, Sagara N, Saitoh T, Tanaka K, Sekihara H, Shiokawa K, and Katoh M. (2000) Molecular cloning and characterization of human FGF-20 on chromosome 8p21.3-p22. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274**: 337-343.

Kirjavainen J, Leppa S, Hynes NE, and Jalkanen M. (1993) Translational suppression of syndecan-1 expression in Ha-ras transformed mouse mammary epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **4**: 849-858.

Kjellen L, and Lindahl U. (1991) Proteoglycans: Structure and interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**: 443-475.

Kleef J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Buchler MW, Lander AD, and Korc M. (1998) The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *J. Clin. Invest.*, **102**: 1662-1673.

Klint P, and Claesson-Welsh L. (1999) Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front. Biosci.*, **15**: 165-177.

Klint P, Kanda S, and Claesson-Welsh L. (1995) Shc and a novel 89-kDa component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells. *J. Biol. Chem.*, **270**: 23337-23344.

Klint P, Kanda S, Kloog Y and Claesson-Welsh L. (1999) Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene*, **18**: 3354-3364.

Knabbe C, Lippman MA, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, and Dickson RB. (1987) Evidence that TGF beta is a hormonally regulated negative growth factors in human breast cancer cells. *Cell*, **48**: 417-428.

Knee R, Li AW, and Murphy PR. (1997) Characterization and tissue-specific expression of the rat basic fibroblast growth factor antisense mRNA and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 4943-4947.

Knee RS, Pitcher SE, and Murphy PR. (1994) Basic fibroblast growth factor sense (FGF) and antisense (GFG) RNA transcripts are expressed in unfertilized human oocytes and in differentiated adult tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**: 577-583.

Kobrin MS, Yamanaka Y, Friess H, Lopez ME, and Korc M. (1993) Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res.*, **53**: 4741-4744.

Kohl R, Antoine M, Olwin BB, Dickson C, and Kiefer P. (2000) Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor alters secretion and intracellular routing of fibroblast growth factor-3. *J. Biol. Chem.*, **275**: 15741-15748.

K

- Koibuchi Y, Iino Y, Uchida T, Nagasawa M, and Morishita Y.** (1997) Effects of estrogen and tamoxifen on the MAP kinase cascade in experimental rat breast cancer. *Int. J. Oncology*, **11**: 583-589.
- Korah RM, Sysounthone V, Golowa Y, and Wieder R.** (2000) Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **60**: 733-740.
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, and Schlessinger J.** (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*, **89**: 693-702.
- Kouhara H, Koga M, Kasayama S, Tanaka A, Kishimoto T, and Sato B.** (1994) Transforming activity of a newly cloned androgen-induced growth factor. *Oncogene*, **9**: 455-462.
- Kouhara H, Kurebayashi S, Hashimoto K, Kasayama S, Masafumi K, Kishimoto T, and Sato B.** (1995) Ligand-independent activation of tyrosine-kinase in fibroblast growth factor receptor 1 by fusion with beta-galactosidase. *Oncogene*, **10**: 2315-2322.
- Kremer NE, D'Arcangelo G, Thomas SM, DeMarco M, Brugge JS, and Halegoua S.** (1992) Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of Src and Ras actions. *J. Cell Biol.*, **115**: 809-819.
- Krufka A, Guimond S, and Rapraeger AC.** (1996) Two hierarchies of FGF-2 signaling in heparin: Mitogenic stimulation and high affinity binding/receptor transphosphorylation. *Biochemistry*, **35**: 11131-11141.
- Kumar-Singh S, Jacobs W, Dhaene K, Weyn B, Bogers J, Weyler J, and Van Marck E.** (1998) Syndecan-1 expression in malignant mesothelioma: correlation with cell differentiation, WT1 expression, and clinical outcome. *J. Pathol.*, **186**: 300-305.
- Kumar-Singh S, Weyler J, Martin MJ, Vermeulen PB, and Van Marck E.** (1999) Angiogenic cytokines in mesothelioma: a study of VEGF, FGF-1 and -2, and TGF beta expression. *J. Pathol.*, **189**: 72-78.
- Kuo WL, Chung KC, and Rosner MR.** (1997) Differentiation of central nervous system neuronal cells by fibroblast -derived growth factor requires at least two signaling pathways : roles for Ras and Src. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 4633-4643.
- Kurobe M, Takei Y, Ezawa H, and Hayashi K.** (1993) Increased level of basic fibroblast growth factor (bFGF) in sera of patients with malignant tumors. *Horm. Metab. Res.*, **25**: 395-396.
- Kussmann M, Nordhoff E, Rahbek-Nielsen H, Haebel S, Rossel-Larsen M, Jakobsen L, Gobom J, Mirgorodskaya E, Kroll-Kristensen A, Palm L, and Roepstorff P.** (1997) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass

K

spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.*, **32**: 593-601.

- Landberg G and Roos G.** (1997) The cell cycle in breast cancer. *APMIS*, **105**:575-589.
- Landgren E, Blume-Jensen P, Courtneidge SA, and Claesson-Welsh L.** (1995) Fibroblast growth factor receptor-1 regulation of Src family kinases. *Oncogene*, **10**: 2027-2035.
- Landgren E, Klint P, Yakote K, and Claesson-Welsh L.** (1998) Fibroblast growth factor receptor-1 mediates chemotaxis independently of direct SH2-domain protein binding. *Oncogene*, **17**: 283-291.
- Lange CA, Richer JK, Shen T, and Horwitz KB.** (1998) Convergence of progesterone and epidermal growth factor in breast cancer. *J. Biol. Chem.*, **273**: 31308-31316.
- Langen H, Takacs B, Evers S, Gandt, P, Lahm HW, Wipt B, Gray C, and Fountoulakis M.** (2000) Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis*, **21**: 411-429.
- Larsson H, Klint P, Landgren E, and Claesson-Welsh L.** (1999) Fibroblast growth factor receptor-1-mediated endothelial cell proliferation is dependent of the Src homology (SH) 2/SH3 domain-containing adaptor protein Crk. *J. Biol. Chem.* **274**: 25726-25734.
- LaVallee TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X, and Maciag T.** (1998) **L** Activation of MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *J. Cell Biol.*, **141**: 1647-1658.
- Lawe DC, Hahn C, and Wong AJ.** (1997) The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68. *Oncogene*, **14**: 223-231.
- Le Bourhis X, Toillon RA, Boilly B, and Hondermarck H.** (2000) autocrine and paracrine growth inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, **1722**: 1-8.
- Lebeau J, Le Chalony C, Prosperi MT, and Goubin G.** (1991) Constitutive expression of a 89 kDa heat shock protein gene in the HBL100 human mammary cell line converted to a tumorigenic phenotype by the EJ/T24 Harvey-ras oncogene. *Oncogene*, **6**: 1125-1132.
- Lee J, Wang Z, Luoh SM, Wood WI, and Scadden DT.** (1994) Cloning of FRK, a novel intracellular SRC-like tyrosine kinase-encoding gene. *Gene*, **138**: 247-251.
- Lee KH and Harrington MG.** (1997) The assay development of a molecular marker for transmissible spongiform encephalopathies. *Electrophoresis*, **18**: 502-506.
- Lehmann W, Widmaire R, and Langen P.** (1989) Response of different epithelial cell

- lines to a mammary derived growth inhibitor (MDGI). *Biomed. Biochim. Acta*, **48**: 143-151.
- Lehmann, JM, Riethmuller, G, and Johnson, JP.** (1990) Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 1048.
- Lehtola L, Partanen J, Sistonen L, Korhonen J, Warri A, Harkonen P, Clarke R, and Alitalo K.** (1992) Analysis of tyrosine kinase mRNAs including four FGF receptor mRNAs expressed in MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, **50**: 598-603.
- Lemmon MA, and Schlessinger J.** (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 459-463.
- Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, and Pouyssegur J.** (1998) Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J. Cell Biol.*, **142**: 625-633.
- Lenormand P, Sardet C, Pagès G, L'Allemain G, Brunet A, and Pouyssegur J.** (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **122**: 1079-1088.
- Lewis TS, Shapiro PS, and Ahn NG.** (1998) Signal transduction through MAP Kinase cascades. *Adv. Cancer. Res.*, **74**: 49-139.
- Li AW, Too CK, and Murphy PR.** (1996) The basic fibroblast growth factor (FGF-2) antisense RNA (GFG) is translated into a MutT-related protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **223**: 19-23.
- Li AW, Too CK, Knee R, Wilkinson M, and Murphy PR.** (1997) FGF-2 antisense RNA encodes a nuclear protein with MutT-like antimutator activity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **133**: 177-182.
- Li LY, Safran M, Avizer D, Böhlen P, Seddon AP, and 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 S and Shipley GD.** (1992) Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells in culture. *Cell. Growth Differ.*, **2**: 195-202.
- Li S, Janosch P, Tanji M, Rosenfeld GC, Waymire JC, Mischak H, Kolch W, and Sedivy JM.** (1995) Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *EMBO J.*, **14**: 685-696.
- Li W, Melnick M, and Perrimon N.** (1998) Dual function of Ras in Raf activation. *Development*, **125**: 4999-5008.
- Li Y, Basilico C, and Mansukhani A.** (1994) Cell transformation by fibroblast growth

L

- factor can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 7660-7669.
- Li Y, Mangasarian K, Mansukhani A, and Basilico C.** (1997) Activation of FGF receptors by mutations in the transmembrane domain. *Oncogene*, **14**: 1397-1406.
- Lidereau R, Callahan R, Dickson C, Peters G, Escot C, and Ali IU.** (1988) Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Research*, **2**: 285-291.
- Lim YP, Low BC, Lim J, Wong ESM, and Guy GR.** (1999). Association of atypical protein kinase C isotypes with the docker protein FRS2 in fibroblast growth factor signaling. *J. Biol. Chem.*, **274**: 19025-19034.
- Lin HY, Xu J, Ischenko I, Ornitz DM, Halegoua S, and Hayman MJ.** (1998). Identification of the cytoplasmic regions of fibroblast growth factor receptor 1 which play important roles in induction of neurite outgrowth in PC12 cells by FGF1. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 3762-3770.
- Link A, Eng J, Schieltz D, Carmack E, Mize G, Morris D, Garvik B, and Yates J.** (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, **17**: 676-682.
- Link AJ, Robinson K, and Church GM.** (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis*, **18**: 1259-1313.
- Lippman ME, Dickson RB, Gelmann EP, Rosen N, Knabbe C, Bates S, Bronzert D, Huff K, and Kasid A.** (1988) Growth regulatory peptide production by human breast carcinoma cells. *J. Steroid Biochem.*, **29**: 79-88.
- Liu J, Huang, C, and Zhan, X.** (1999) Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor-1. *Oncogene*, **18**: 6700-6706.
- Liu JF, Chevet E, Kebache S, Lemaitre G, Barritault D, Larose L, and Crépin M.** (1999) Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2-induced DNA synthesis in MCF-7 cells. *Oncogene*, **18**: 6425-6433.
- Liu JF, Issad T, Chevet E, Ledoux D, Courty J, Caruelle JP, Barritault D, Crépin M, and Bertin B.** (1998) Fibroblast growth factor-2 has opposite effects on human breast cancer MCF-7 cell growth depending on the activation level of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Biochem.*, **258**: 271-276.
- Loo JA, DeJohn DE, Du P, Stevenson TI, and Orgorzalek-Loo RR.** (1999) Application of mass spectrometry for target identification and characterization. *Med. Res. Rev.*, **19**: 307-319.
- Lopez ME, and Korc M.** (2000). A novel type I fibroblast growth factor receptor activates mitogenic signaling in the absence of detectable tyrosine phosphorylation of FRS2. *J. Biol. Chem.*, **275**: 15933-15939.

L

- Lorenzi MV, Castagnino P, Chen Q, Chedid M, and Miki T.** (1997) Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptor-2 by carboxy terminal alterations. *Oncogene*, **15**: 817-826.
- Loret C, Sensenbrenner M, and Labourdette G.** (1989) Differential phenotypic expression induced in cultures rat astroblasts by acidic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8319-8327.
- Lottspeich F.** (1999) Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**: 2476-2492.
- Lovec H, Hartung H, Verdier AS, Mattei MG, Birnbaum D, Goldfarb M, and Coulier F.** (1997) Assignment of FGF13 to human chromosome band Xq21 by in situ hybridation. *Cytogenet. Cell Genet.*, **76**: 183-184.
- Lubec G, Nonaka M, Krapfenbauer K, Gratzer M, Cairns N, and Foutoulakis M.** (1999) Expression of the dihydropyriminase related protein-2 (DRP-2) in Down syndrome and Alzheimer's disease brain is downregulated at the mRNA and dysregulated at the protein level. *J. Neural Transm. Suppl.*, **57**: 161-177.
- Lundin L, Larsson H, Kreuger J, Kanda S, Lindahl U, Salmivirta M, and Claesson-Welsh L.** (2000) Selectively desulfated heparin inhibits FGF-induced mitogenicity and angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **275**: 24653-24660.
- Luo Y, Lu W, Mohamedali KA, Jang JH, Jones RB, Gabriel JL, Kan M, and McKeehan WL.** (1998) The glycine box: a determinant of specificity for fibroblast growth factor. *Biochemistry*, **37**: 16506-16513.
- Luqmani YA, Bansal GS, Mortimer C, Buluwela L, and Coombes RC.** (1996) Expression of FGFR2 BEK and K-SAM mRNA variants in normal and malignant human breast. *Eur. J. Cancer*, **32**: 518-524.
- Luqmani YA, Graham M, and Coombes RC.** (1992) Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer*, **66**: 273-280.
- Luqmani YA, Mortimer C, Yiangou C, Johnston CL, Bansal GS, Sinnett D, Law M, and Coombes RC.** (1995) Expression of 2 variants of fibroblast growth factor receptor 1 in human breast. *Int. J. Cancer*, **64**: 274-279.
- MacArthur CA, Lawshe A, Shankar DB, Heikinheimo M, and Shackelford GM.** (1995b) FGF-8 isoforms differ in NIH3T3 cell transforming potential. *Cell Growth Differ.*, **6**: 817-825.
- MacArthur CA, Lawshe A, Xu J, Santos-Ocampo S, Heikinheimo M, Chellaiah AT, and Ornitz DM.** (1995a) FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development*, **121**: 3603-3613.
- Magnaldo I, L'Allemain G, Chambard JC, Moenner M, Barritault D, and**

L
M

- Pouyssegur J.** (1986) The mitogenic signaling pathway of fibroblast growth factor is not mediated through phosphoinositide hydrolysis and protein kinase C activation in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**: 16916-16922.
- Maher P.** (1999) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J. Biol. Chem.*, **274**: 17491-17498.
- Maloney TM, Paine PL, and Russo J.** (1989) Polypeptide composition of normal and neoplastic human breast tissues and cells analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Breast Cancer Res. Treat.*, **14**: 337-348.
- Mandriota SJ, and Pepper MS.** (1997) Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J. Cell Sci.*, **110**: 2293-2302.
- Mann M, Hojrup P, and Roespstorff P.** (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol. Mass Spectrom.*, **22**: 338-345.
- Mansour SL.** (1994) Targeted disruption of int-2 (fgf-3) causes developmental defects in the tail and inner ear. *Mol. Reprod. Dev.*, **39**: 62-68.
- Maret A, Galy B, Arnaud E, Bayard F, and Prats H.** (1995) Inhibition of fibroblast growth factor-2 expression by antisense RNA induced a loss of the transformed phenotype in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.*, **55**: 5075-5079.
- Marics I, Adelaide J, Raybaud F, Mattei MG, Coulier F, Planche J, DeLapeyrière O, and Birnbaum D.** (1989) Characterization of the hst-related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene*, **4**: 335-340.
- Marsh SK, Bansal GS, Zammit C, Barnard R, Coope R, Roberts-Clarke D, Gomm JJ, Coombes RC, and Johnston CL.** (1999) Increased expression of fibroblast growth factor 8 in human breast cancer. *Oncogene*, **18**: 1053-1060.
- Marshall CJ.** (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**: 179-185.
- Martin PM, Dong X, and Berthois Y.** (1994) The role of growth factors in tumor biology. In *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, Ed. Cvitkovic et coll., pp36-49.
- Mathiak M, Yenisey C, Grant DS, Sharma B, and Iozzo RV.** (1997) A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells. *Cancer Res.*, **57**: 2130-2136.
- Matsuda M, Tanaka S, Nagata S, Kojima A, Kurata T, and Shibuya M.** (1992) Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 3482-3489.

M

- Matsui NM, Smith DM, Clauser KR, Fichmann J, Andrews LE, Sullivan CM, Burlingame AL, and Epstein LB.** (1997) Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification of cytokine-regulated proteins in ME-180 cervical carcinoma cells. *Electrophoresis*, **18**: 409-417.
- Matsuo T and Seyama Y.** (2000) Introduction to modern biological mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **35**: 114-130.
- Mattei MG, Penault-Llorca F, Coulier F, and Birnbaum D.** (1995) The human FGF9 gene maps to chromosomal region 13q11-q12. *Genomics*, **29**: 811-812.
- Mayer MP, and Bukau B.** (1999) Molecular chaperones: The busy life of Hsp90. *Current Biol.*, **9**: R322-R325.
- McKeehan WL, and Kan M.** (1994) The heparan sulfate-fibroblast growth factor receptor complex: Structure-function relationships. *Mol. Reprod. Dev.*, **39**:69-81.
- McKeehan WL, Wang F, and Kan M.** (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: Diversity of structure and function. *Prog. Nucl. Acid Res.*, **59**: 135-175.
- McLeskey SW, Ding IYF, Lippman ME, and Kern FG.** (1994) MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res.*, **54**: 523-530.
- McLeskey SW, Kurebayashi J, Honig SF, Zwiebel J, Lippman ME, Dickson RB, and Kern FG.** (1993) Fibroblast growth factor-4 transfection of MCF-7 cells produces cell lines that are tumorigenic and metastatic in ovariectomized or tamoxifen-treated athymic nude mice. *Cancer Res.*, **53**: 2168-2177.
- McLeskey SW, Tobias CA, Vezza PR, Filie AC, Kern FG, and Hanfelt J.** (1998b) Tumor growth of FGF or VEGF transfected MCF-7 breast carcinoma cells correlates with density of specific microvessels independent of the transfected angiogenic factor. *Am. J. Pathol.*, **153**: 1993-2006.
- McLeskey SW, Zhang L, El-Ashry D, Trock BJ, Lopez CA, Kharbanda S, Tobias CA, Lorant LA, Hannum RS, Dickson RB, and Kern FG.** (1998a) Tamoxifen-resistant fibroblast growth factor-transfected MCF-7 cells are cross-resistant in vivo to the antiestrogen ICI 182,780 and two aromatase inhibitors. *Clin. Cancer Res.*, **4**: 697-711.
- McLeskey SW, Zhang L, Kharbanda S, Kurebayashi J, Lippman ME, Dickson RB, and Kern FG.** (1996) Fibroblast growth factor overexpressing breast carcinoma cells as models of angiogenesis and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.*, **39**: 103-117.
- McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, and Murre C.** (1997) A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Development*, **124**: 3221-3232.

M

- Ménoret A, and Chandawarkar RY.** (1998) Heat shock protein-based anticancer immunotherapy, an idea whose time has come. *Semin. Oncol.*, **25**: 654-660.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, and Rao A.** (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*, **278**: 860-866.
- Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, and Shows TB.** (1986) The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**: 644-651.
- Meyers SL and Dudley JP.** (1992) Sequence analysis of the int-2/fgf-3 gene in aggressive human breast carcinomas. *Mol. Carcinog.*, **6**: 243-251.
- Michaud NR, Fabian JR, Mathes KD, and Morrison DK.** (1995) 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 3390-3397.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, and Auricchio F.** (1996) Tyrosine-kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.*, **15**: 1292-1300.
- Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KMV, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lafrancon L, and Pelicci PG.** (1997) Opposite effects of the p52Shc / p46Shc, and p66Shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J.*, **16**: 706-716.
- Miki DP, Bottaro TP, Fleming CL, Smith WH, Burgess A, Chan AM, and Aaronson SA.** (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 246-250.
- Milasincic DJ, Calera MR, Farmer SR, and Pilch PF.** (1996) Stimulation on C2C12 myoblast by basic fibroblast growth factor and insulin growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 5964-5973.
- Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, and Basilico C.** (2000) Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 2260-2268.
- Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring DB, Tarpley JE, DeRose M, and Simonet WS.** (1998) Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless. *Genes Dev.*, **12**: 3156-3161.
- Miralles F, Ron D, Baiget M, Félez J, and Munoz-Canoves P.** (1998) Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by basic

M

fibroblast growth factor and serum in myogenesis. *J. Biol. Chem.*, **273**: 2052-2058.

- Miyake A, Konishi M, Martin FH, Hernday NA, Ozaki K, Yamamoto S, Mikami T, Arakawa T, and Itoh N.** (1998) Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**: 148-152.
- Miyake H, Yoshimura K, Hara I, Eto H, Arakawa S, and Kamidono S.** (1997) Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J. Urol.*, **157**: 2351-2355.
- Moenner M, Magnaldo I, L'Allemain G, Barritault D, and Pouyssegur J.** (1987) Early and late mitogenic events induced by FGF on bovine epithelial lens cells are not triggered by hydrolysis of polyphosphoinositides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**: 32-40.
- Moffett J, Kratz E, Myers J, Stachowiak EK, Florkiewicz RZ, and Stachowiak MK.** (1998) Transcriptional regulation of fibroblast growth factor-2 expression in human astrocytes: implications for cell plasticity. *Mol. Biol. Cell.*, **9**: 2269-2285.
- Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, and Schlessinger J.** (1996a) Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor-1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 977-989.
- Mohammadi M, Dionne CA, Li W, Li N, Spivak T, Honegger AM, Jaye M, and Schlessinger J.** (1992) Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature*, **358**: 681-684.
- Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, Fisher R, Bellot F, Li W, Dionne CA, Jaye M, Rubinstein M, and Schlessinger J.** (1991) A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell. Biol.*, **11**: 5068-5078.
- Mohammadi M, Schlessinger J, and Hubbard SR.** (1996b) Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*, **86**: 577-587.
- Mongiati M, Taylor K, Otto J, Aho S, Uitto J, Whitelock JM, and Iozzo RV.** (2000) The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J. Biol. Chem.*, **275**: 7095-7100.
- Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD, and Hurley MM.** (2000) Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.*, **105**: 1085-1093.

M

- Moon AM, Boulet AM, and Capecchi MR.** (2000) Normal limb development in conditional mutants of *fgf4*. *Development*, **127**: 989-996.
- Moszczynska A, and Opas M.** (1994) Regulation of adhesion-related protein tyrosine kinase during in vitro differentiation of retinal pigment epithelial cells: translocation of pp60-src to the nucleus is accompanied by downregulation of pp125FAK. *Biochem. Cell. Biol.*, **72**: 43-48.
- Motte P, Bidart JM, Delarue JC, Comoy E, Moingeon P and Bohuon C.** (1984) Two-dimensional electrophoretic analysis of cytosols from human breast tumors: optimal migration conditions. *Clin. Chem.*, **30**: 1947-1949.
- Moy FJ, Seddon AP, Böhlen P, and Powers R.** (1996) High-resolution solution structure of basic fibroblast growth factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **35**: 13552-13561.
- Munoz-Sanjuan I, Simandl BK, Fallon JF, and Nathans J.** (1999) Expression of chicken fibroblast growth factor homologous factor (FHF)-1 and of differentially spliced isoforms of FHF-2 during development and involvement of FHF-2 in chicken limb development. *Development*, **126**: 409-421.
- Murphy PR and Knee RS.** (1994) Identification and characterization of an antisense RNA transcript (*gfg*) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol. Endocrinol.*, **8**: 852-859.
- Musgrove EA, and Sutherland RL.** (1993) Acute effects of growth factors on T47D breast cancer cells. *Eur. J. Cancer*, **29A**: 2273-2279.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kishkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME and Dixit VM.** (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**: 817-827.
- Myers TG, Anderson NL, Waltham M, Li G, Buolawini JK, Scudiero DA, Paull KD, Sausville EA, and Weinstein JN.** (1997) A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Electrophoresis*, **18**: 647-653.
- Nanberg E, Morris C, Higgins T, Vara F, and Rozengurt E.** (1990) Fibroblast growth factor stimulates protein kinase C in quiescent 3T3 cells without Calcium mobilization or inositol phosphate accumulation. *J. Cell. Physiol.*, **143**: 232-242.
- Naruo KI, Seko C, Kuroshima KI, Matsutani E, Sasada R, Kondo T, and Kurokawa T.** (1993) Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (Glia-activating factors) involved in glial cell growth. *J. Biol. Chem.*, **268**: 2857-2864.
- Neilson KM, and Friesel R.** (1996) Ligand-independent activation of basic fibroblast growth factor receptors by point mutations in the extracellular, transmembrane, and

M
N

- kinase domains. *J. Biol. Chem.*, **271**: 25049-25057.
- Nelson PS, Han D, Rochom Y, Corthals GL, Lin B, Monson A, Mgyuen V, Franza BR, Plymate SR, Aebersold R, and Hood L.** (2000) Comprehensive analyses of prostate gene expression: convergence of expressed sequence tag databases, transcript profiling and proteomics. *Electrophoresis*, **21**: 1823-1831.
- Nesbit M, Nesbit HK, Bennett J, Andl T, Hsu MY, Dejesus E, McBrian M, Gupta AR, Eck SL, and Herlyn M.** (1999) Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene*, **18**: 6469-6476.
- Neubauer G, and Mann M.** (1999) Mapping of phosphorylation sites of gel-isolated proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry: potentials and limitations. *Anal. Chem.*, **71**: 235-242.
- Neubauer G, Gottschalk A, Fabrizio P, Seraphin B, Luhrmann R, and Mann M.** (1997) Identification of the protein of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 385-390.
- Neufeld G, Mitchell R, Ponte P, and Gospodarowicz D.** (1988) Expression of human basic fibroblast growth factor cDNA in baby hamster kidney-derived cells results in autonomous cell growth. *J. Cell Biol.*, **106**: 1385-1396.
- Nguyen C, Roux D, Mattei MG et al.** (1988) The FGF-related oncogenes *hst* and *int.2*, and the *bcl.1* locus are contained within one megabase in band q13 of chromosome 11, while the *fgf.5* oncogene maps to 4q21. *Oncogene*, **3**: 703-708.
- Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, and Itoh N.** (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**: 203-206.
- Nurcombe V, Smart CE, Chipperfield H, Cool SM, Boilly B, and Hondermarck H.** (2000) The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates. *J. Biol. Chem.*, **275**:30009-30018.
- Nyman TA, Matikainen S, Sareneva T, Julkunen I, and Kalkkinen N.** (2000) Proteome analysis reveals ubiquitin-conjugating enzymes to be a new family of interferon- α -regulated genes. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 4011-4019.
- O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, and Harris AL.** (1997) Two mechanisms of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.*, **57**: 136-140.
- O'Farrell PH.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007-4021.
- Odajima, J, Matsumura, I, Sonoyama, J, Daino, H, Kawasaki, A, Tanaka, H, Inohara, N, Kitamura, T, Downward, J, Nakajima, K, Hirano, T and**

- Kanakura, Y.** (2000) Full oncogenic activities of v-Src are mediated by multiple signaling pathways; Ras as an essential mediator for cell survival. *J. Biol. Chem.*, **275**: 24096-24105
- Ohbayashi N, Hoshikawa M, Kimura S, Yamasaki M, Fukui S, and Itoh N.** (1998) Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF-18. *J. Biol. Chem.*, **173**: 18161-18164.
- Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, Araga A, Ohata T, Ishimaru Y, Yoshioka H, Kuwana T, Nohno T, Yamasaki M, Itoh N, and Noji S.** (1997) The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, **124**: 2235-2244.
- Okazaki K and Sagata N.** (1995) The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J.*, **14**: 5048-5059.
- Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, Linder S, Hirano T, Bergman T, Ebihara Y, Kato H, and Auer G.** (1994) Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **15**: 382-390.
- Olson NE, Kozlowski J, and Reidy MA.** (2000) Proliferation of intimal smooth muscle cells. Attenuation of basic fibroblast growth factor 2-stimulated proliferation is associated with increased expression of cell cycle inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **275**: 11270-11277.
- Ong SH, Goh KC, Lim YP, Low BC, Klint P, Claesson-Welsh L, Cao X, Tan YH, and Guy GR.** (1996) SUC1-associated neurotrophic factor target (SNT) protein is a major FGF-stimulated tyrosine phosphorylated 90-kDa protein which binds to the SH2 domain of Grb2. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **225**: 1021-1026.
- Ong SH, Guy GR, Hadari YR, Laks S, Gotoh N, Schlessinger J, and Lax I.** (2000). FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 979-989.
- Ong SH, Lim YP, Low C, and Guy GR.** (1997). SHP2 associates directly with tyrosine-phosphorylated p90 (SNT) protein in FGF-stimulated cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **238**: 261-266.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, and Goldfarb M.** (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15292-15297.
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, and Leder P.** (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble

receptor and mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 240-247.

Ortega S, Ittman M, Tsang SH, Ehrlich M, and Basilico C. (1998) Neuronal defects and delay wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 5672-5677.

Osada T, Sakamoto M, Ino Y, Iwamatsu A, Matsuno Y, Muto T, and Hirohashi S. (1996) E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **24**: 1460-1467.

Osborne CK, Coronado EB, Kitten LJ, Arteaga CI, Fuqua SAW, Ramasharma K, Marshall M, and Li CH. (1989) Insulin-like growth factor-II (IGF-II) : a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol. Endocrinol.*, **3**: 1701-1709.

Osborne CK, Hobbs K, and Trent JM. (1987) Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res. Treat.*, **9**: 111-121.

Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Orntoft TF, Wolf H, and Celis JE. (1997) Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res.*, **57**: 4111-4117.

Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, Beurden van EACM, Hennipman A, Maichels AA, and Staal GEJ. (1992) Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer; involvement of Src family of tyrosine kinases. *Cancer Res.*, **52**: 4773-4778.

Padera R, Venkataraman G, Berry D, Godavarti R, and Sasisekharan R. (1999) FGF-2/ fibroblast growth factor receptor/heparin-like glycosaminoglycan interactions: a compensation model for FGF-2 signaling. *FASEB J.*, **13**: 1677-1387.

Page MJ, Amess B, Rohlf C, Stubberfield C, and Parekh R. (1999b) Proteomics: a major new technology for the drug discovery process. *Drug Discov. Today*, **4**: 55-62.

Page MJ, Amess B, Townsend RR, Parekh R, Herath A, Brusten L, Zvelebil MJ, Stein RC, Waterfield MD, Davies SC and O'Hare MJ. (1999a) Proteomic definition of normal luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 12589-12594.

Paine E, Palmantier R, Akiyama SK, Olden K, and Roberts JD. (2000) Arachidonic acid activates mitogen-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**: 11284-11290.

Palmero I, Holder A, Sinclair AJ, Dickson C, and Peters G. (1993) Cyclins D1 and D2 are differentially expressed in human B-lymphoid cell lines. *Oncogene*, **8**:

O
P

1049-1054.

- Pandey A, Podtelejnikov AV, Blagoev B, Bustelo XR, and Mann M.** (2000) Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: Identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 179-184.
- Panek RL, Lu GH, Dahring TK, Batley BL, Connolly C, Hamby JM, and Brown KJ.** (1998) In vitro biological characterization and antiangiogenic effects of PD166866, a selective inhibitor of the FGF-1 receptor tyrosine kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**: 569-577.
- Pantoliano MW, Horlick RA, Springer BA, Van Dyk DE, Tobery T, Westmore DR, Lear JD, Nahapetian AT, Bradley JD, and Sisk WP.** (1994) Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry*, **33**: 10229-10248.
- Park SY, Barron, E, Suh PG, Ryu SH, and Kay EP.** (1999) FGF-2 facilitates binding of SH3 domain of PLC-gamma1 to vinculin and SH2 domains to FGF receptor in corneal endothelial cells. *Mol. Vis.*, **5**: 18.
- Partridge CR, Hawker JR, and Forough R.** (2000) Overexpression of a secretory form of FGF-1 promotes MMP-1-mediated endothelial cell migration. *J. Cell. Biochemistry*, **78**: 487-499.
- Patel VB, Corbett JM, Dunn MJ, Winrow VRT, Portmann B, Richardson PJ, and Preedy VR.** (1997) Protein profiling in cardiac tissue in response to the chronic effects of alcohol. *Electrophoresis*, **18**: 2788-2794.
- Paterno GD, Gillespie LL, Dixon MS, Slack JMW, and Heath JK.** (1989) Mesoderm inducing properties of int-2 and KFGF: two oncogenes encoded growth factors related to FGF. *Development*, **106**: 79-83.
- Payson RA, Wu J, Liu Y, and Chiu IM.** (1996) The human FGF8 gene localizes on chromosome 10q24 and is subjected to induction by androgen in breast cancer cells. *Oncogene*, **13**: 47-53.
- Pedchenko VK and Imagawa W.** (2000) Pattern of expression of the KGF receptor and its ligands KGF and FGF-10 during post-natal mouse mammary gland development. *Mol. Reprod. Dev.*, **56**: 441-447.
- Penault-Llorca F, Bertucci F, Adelaide J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D, and deLapeyrière O.** (1995) Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, **61**, 170-176.
- Pennington SR, Wilkins MR, Hochstrasser DF, and Dunn MJ.** (1997) Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends Cell Biol.*, **7**: 168-173.

P

- Peters KG, Marie J, Wilson E, Ives HE, Escobedo J, Del Rosario M, Mirza D and Williams LT.** (1992) Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and calcium flux but not mitogenesis. *Nature*, **358**: 678-681.
- Peyrat JP, Bonnetterre J, Hecquet B, Vennin PH, Louchez MM, Fournier C, Lefevre J, and Demaille A.** (1993) Plasma Insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in human breast cancer. *Eur. J. Cancer*, **29**: 492-497.
- Peyrat JP, Bonnetterre J, Hondermarck H, Hecquet B, Adenis A, Louchez MM, Lefebvre J, Boilly B, and Demaille A.** (1992) Basic fibroblast growth factor (bFGF): mitogenic activity and binding sites in human breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **43**: 87-94.
- Peyrat JP, Bonnetterre J, Vennin PH, Jammes H, Beuscart R, Hecquet B, Djiane J, Lefevre J, and Demaille A.** (1990) Insulin-like growth factor-I receptors (IGF-I-R) and IGF-I in human breast tumors. *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **37**: 823-827.
- Peyrat JP, Hondermarck H, Louchez MM, and Boilly B.** (1991) Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer Commun.*, **3**: 323-329.
- Pizette S, Batoz M, Prats H, Birnbaum D, and Coulier F.** (1991) Production and functional characterization of human recombinant FGF-6 protein. *Cell Growth Differ.*, **2**: 561-566.
- Pizette S, Coulier F, DeLapeyrière O, and Birnbaum D.** (1996) FGF6 modulates the expression of fibroblast growth factor receptors and myogenic genes in muscle cells. *Exp. Cell. Res.*, **224**: 143-151.
- Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, and Mohammadi M.** (2000) Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*, **101**: 413-424.
- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, and Mohammadi M.** (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*, **98**: 641-650.
- Pomerance M, Gavaret JM, Breton M and Pierre M.** (1994) Growth factor-regulated phosphatidylinositol 3-kinase in astrocytes. Involvement of pp60c-src. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **40**: 653-664.
- Porras A, Alvarez AM, Valladares A, and Benito M.** (1998) p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation is required for the insulin-like growth factor-I/insulin induced proliferation, but inhibits differentiation, in rat fetal brown adipocytes. *Mol. Endocrinol.*, **12**: 825-834.
- Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Almaric F, Smith JA, and Caput D.** (1989) High molecular

P

mass from basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1836-1840.

- Pratt WP.** (1998) The hsp90-based chaperone system: Involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **217**: 420-434.
- Presta M, Maier JA, and Ragnotti G.** (1989) The mitogenic signaling pathway but not the plasminogen activator-inducing pathway of basic fibroblast growth factor is mediated through protein kinase C in fetal bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Sci.*, **109**: 1877-1884.
- Presta M, Statuto M, Isacchi A, Caccia P, Pozzi A, Gualandris A, Rusnati M, Bergonzini L, and Sarmientos P.** (1992) Structure-function relationship of basic fibroblast growth factor: site-directed mutagenesis of a putative heparin-binding and receptor-binding region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**: 1098-1107.
- Pretrelski SJ, Fox GM, and Arakawa T.** (1992) Binding of heparin to basic fibroblast growth factor induces a conformational change. *Arch. Biochem. Biophys.*, **293**: 314-319.
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, and Woodgett JR.** (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**: 670-674.
- Pursiheimo JP, Jalkanen M, Tasken K, and Jaakkola P.** (2000) Involvement of protein kinase A in fibroblast growth factor-2-activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 168-173.
- Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, and Gallagher JT.** (1998) Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfatation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.*, **273**: 22936-22942.
- Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckman JF, Schwartz ML, and Vaccarino FM.** (2000) Basic fibroblast growth factor (FGF2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **20**: 5012-5023.
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, and Lunardi J.** (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**: 307-316.
- Rabilloud T, and Charmont S.** (2000) Proteome research: Two-dimensional electrophoresis and identification methods. in *Rabilloud T (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New-York*: 107-126.
- Rabin SJ, Cleghon V, and Kaplan DR.** (1993) SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 2203-2213.
- Radhakrishna M, and Almazan G.** (1994) Protein kinases mediate basic fibroblast growth factor's stimulation of proliferation and c-fos induction in oligodendrocytes

progenitors. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **24**: 118-128.

- Raffioni S, and Bradshaw RA.** (1992) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 9121-9125.
- Raffioni S, Thomas D, Foehr E, Thompson LM, and Bradshaw RA.** (1999) Comparison of the intracellular signaling responses by three chimeric fibroblast growth factor receptors in PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 7178-7183.
- Rahmoune H, Chen HL, Gallagher JT, Rudland PS, and Fernig DG.** (1998) Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **273**: 7303-7310.
- Rao SS and Kohtz DS.** (1995) Positive and negative regulation of D-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. A role for cyclin D1 in control of myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.*, **270**: 4093-4100.
- Rasmussen HH, Van Damme J, Puype M, Gesser B, Celis JE, and Vandekerckhove J.** (1992) Microsequences of 145 proteins recorded on the two-dimensional gel protein database of normal human epidermal keratinocytes. *Electrophoresis*, **13**: 960-969.
- Rasmussen RK, Ji H, Eddes JS, Moritz RL, Reid GE, Simpson RJ, and Dorow DS.** (1997) Two-dimensional electrophoresis analysis of human breast carcinoma proteins: Mapping of proteins that bind to the SH36 domain of mixed lineage kinase MLK2. *Electrophoresis*, **18**: 588-598.
- Reddy KB, Krueger JS, Kondapaka SB, and Diglio CA.** (1999) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int. J. Cancer*, **82**: 268-273.
- Reichman CT, Mayer BJ, Keshav S, and Hanafusa H.** (1992) The product of the cellular *crk* gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ.*, **3**: 451-460.
- Reilly JF, Mickey G, and Maher PA.** (2000) Association of fibroblast growth factor receptor 1 with the adaptor protein Grb14. *J. Biol. Chem.*, **275**: 7771-7778.
- Relf M, Lejeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, and Harris AL.** (1997) Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, platelet-derived endothelial growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.*, **57**: 963-969.
- Renaud F, El Yazidi I, Boilly-Marer Y, Courtois Y, and Laurent M.** (1996)

R

Expression and regulation by serum of multiple FGF1 mRNA in normal transformed, and malignant human mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**: 679-685.

Resh MD. (1994) Myristoylation and palmitoylation of src members: the fats of the matter. *Cell*, **76**: 411-413.

Revest JM, DeMoerlooze L, and Dickson C. (2000) Fibroblast growth factor-9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J. Biol. Chem.*, **275**: 8083-8090.

Révillion F, Bonnetterre J, and Peyrat JP. (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur. J. Cancer*, **34**: 791-808.

Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, and Anderton BH. (2000) Phosphorylation sites on Tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-jun N-terminal kinase and p38, and glycogen synthase kinase-3 β . *J. Neurochem.*, **74**: 1587-1595.

Ribatti D, Leali D, Vacca A, Giuliani R, Gualandris A, Roncali L, Nolli ML, and Presta M. (1999) In vivo angiogenic activity of urokinase: role of endogenous fibroblast growth factor-2. *J. Cell Sci.*, **112**: 4213-4221.

Richards W. (1997) *Saccharomyces sapiens*. *Trends Genet.*, **13**: 49-50.

Roche S, McGlade J, Jones M, Gish GD, Pawson T, and Courtneidge SA. (1996) Requirement of phospholipase C gamma, the tyrosine phosphatase Syp and the adaptor proteins Shc and Nck for PGF-induced DNA synthesis: evidence for the existence of Ras-dependent and Ras-independent pathways. *EMBO J.*, **15**: 4940-4948.

Rockow S, Tang J, Xiong W, and Li W. (1996) Nck inhibits NGF and basic FGF induced PC12 cells differentiation via mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Oncogene*, **12**: 2351-2359.

Roghani M, Mansukhani A, Dell'Era P, Bellosta P, Basilico C, Rifkin DB, and 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.

Roghani M, Mohammadi M, Schlessinger J, and Moscatelli D. (1996) Induction of urokinase-type plasminogen activator by fibroblast growth factor (FGF)-2 is dependent on expression of FGF receptors and does not require activation of phospholipase C gamma 1. *J. Biol. Chem.*, **271**: 31154-31159.

Rohiff C. (2000) Proteomics in molecular medicine: applications in central nervous system disorders. *Electrophoresis*, **21**: 1227-1234.

Ropiquet F, Huguenin S, Villette JM, Ronfle V, Le Brun G, Maitland NJ, Cussenot O, Fiet J, and Berthon P. (1999) FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostatic epithelial PNT1A cells.

R

Int. J. Cancer, **82**: 237-243.

Roussel M. (1998) Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv. Cancer Res.*, **74**: 1-24.

Rowe JM, Kasper S, Shine RPC, and Friesen HG. (1986) Purification and characterization of a human mammary tumor-derived growth factor. *Cancer Res.*, **46**: 1408-1412.

Rozakis-Adcock M, van der Geer P, Mbamalu G, and Pawson T. (1995) MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene*, **11**: 1417-1426.

Rudland PS, Barraclough R, Fernig DG and Smith JA. (1996) in *Stem Cells and Cancer*, Academic Press, London, 147-232.

Sa G, Murugesan G, Jaye M, Ivashchenko Y, and Fox PL. (1995) Activation of cytosolic phospholipase A₂ by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **270**: 2360-2366.

Sage-Ono K, Ono M, Harada H, and Kamada H. (1998) Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*. *Plant Cell. Physiol.*, **39**: 357-360.

Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, and Rifkin DB. (1988) Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects its from proteolytic degradation. *J. Cell Biol.*, 107-743-751.

Salcini AE, McGlade J, Pelicci G, Nicoletti I, Pawson T, and Pelicci PG. (1994) Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene*, **9**: 2827-2836.

Samuel SK, Minish TM and Davie JR. (1997) Nuclear matrix proteins in well and poorly differentiated human breast cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.*, **66**: 6-15.

Sanchez JC, Schaller D, Ravier F, Golaz O, Jaccoud S, Belet M, Wilkins MR, James R, Deshusses J, and Hochstrasser D. (1997) Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several non tumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis*, **18**: 150-155.

Santoni V, Molloy M, and Rabilloud T. (2000) membrane proteins and proteomics: un amour impossible. *Electrophoresis*, **21**: 1054-1070.

Santos-Ocampo S, Colvin JS, Chellaiah A, and Ornitz DM. (1996) Expression and biological activity of mouse fibroblast growth factor-9. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1726-1731.

Sarcevic B, Lilischkis R, and Sutherland RL. (1997) Differential phosphorylation of T-47D human breast cancer cell substrates by D1-, D3-, E-, and A-type cyclin-CDK complexes. *J. Biol. Chem.*, **272**: 33327-33337.

**R
S**

- Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, Giannone D, Frutigiers S, Golaz O, Wilkins MR, Doro G, Cappellano F, Hughes G, Hochstrasser DF, and Mocarelli P.** (1997) Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis*, **18**: 599-604.
- Savage MP and Fallon JF.** (1995) FGF-2 mRNA and its antisense are expressed in a developmentally specific manner in the chick limb bud and mesonephros. *Dev. Dyn.*, **202**: 343-353.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, and van der Geer P.** (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**: 786-791.
- Schlaepfer DD, Jones KC, and Hunter T.** (1998) Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: Summation of both c-Src and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 2571-2585.
- Schmidt A, Sindermann J, Peyman A, Uhlmann E, Will DW, Müller JG, Breithardt G, and Buddecke E.** (1997) Sequence-specific antiproliferative effects of antisense and end-capping-modified antisense oligodeoxynucleotides targeted against the 5'-terminus of basic fibroblast growth factor mRNA in coronary smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.*, **248**: 543-549.
- Schwartz CFW.** (1993) Insulin regulation of protein phosphorylation in H4 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **268**: 14450-14460.
- Schwartzberg PL.** (1998) The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene*, **17**: 1463-1468.
- Schweppe RE, Frazer-Abel A, Gutierrez-Hartmann A, and Bradford AP.** (1997) Functional components of fibroblast growth factor (FGF) signal transduction in pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 30852-30859.
- Scotet E, and Houssaint E.** (1995) The choice between alternative IIIb and IIIc exons of the FGFR3 gene is not strictly tissue-specific. *Biochem. Biophys. Acta*, **1264**: 238-242.
- Segev O, Chumakov I, Nevo Z, Givol D, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Weinreb M, and Yayon A.** (2000) Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3 (G380R) transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **9**: 249-258.
- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, and Mignatti P.** (1998) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.*, **141**: 1659-1673.

S

- Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, and Kato S.** (1999) Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.*, **21**: 138-141.
- Seno M, Sasada R, Iwane M, Sudo K, Kurokawa T, Ito K, and Igarashi K.** (1988) Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**: 701-708.
- Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, and Kitchen P.** (1993) Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.*, **11**: 1936-1942.
- Seth A, Gonzales FA, Gupta S, Raden DL, and Davis RJ.** (1992) Signal transcription within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **267**: 24796-24804.
- Sharma B, Handler M, Eichstetter I, Whitelock JM, Nugent MA, and Iozzo RV.** (1998) Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.*, **102**: 1599-1608.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, and Mann M.** (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 14440-14445.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, and Mann M.** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**: 850-8580.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, Shevchenko A, Mortensen P, and Mann M.** (1996) A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**: 893-900.
- Shi A, Kan M, Xu J, Wang F, Hou J, and McKeegan WL.** (1993) Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 3907-3918.
- Shibata F, Baird A, and Florkiewicz RZ.** (1991) Functional characterization of the human basic fibroblast growth factor gene promoter. *Growth Factors*, **4**: 277-287.
- Shimazu A, Nah HD, Kirsch T, Koyama E, Leatherman JL, Golden EB, Kosher RA, and Pacifici M.** (1996) Syndecan-3 and the control of chondrocyte proliferation during endochondral ossification. *Exp. Cell. Res.*, **229**: 126-136.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, and Weinberg RA.** (1996) Cyclin D2 is an FSH-responsive gene

S

involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, **384**: 470-474.

- Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazell A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, and Weinberg RA.** (1995) Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*, **82**: 621-630.
- Sivaraman VS, Wang HY, Nuovo GJ, and Malbon CC.** (1997) Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J. Clin. Invest.*, **99**: 1478-1483.
- Slack JMW, Darlington BG, Heath JK, and Godsave SF.** (1987) Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature*, **326**: 197-200.
- Sliutz G, Tempfer C, Obermair A, Dadak C, and Kainz C.** (1995) Serum evaluation of basic FGF in breast cancer patients. *Anticancer Res.*, **15**: 2675-2677.
- Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SHC, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, and Nathans J.** (1996) Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9850-9857.
- Smith J, Yelland A, Baillie R, and Coombes RC.** (1994) Acidic and basic fibroblast growth factors in human breast tissue. *Eur. J. Cancer*, **30**, 496-503.
- Smith K, Fox SB, Whitehouse R, Taylor M, Greenall M, Clarke J, and Harris AL.** (1999) Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann. Oncol.*, **10**: 707-713.
- Smith PD, and Crompton MR.** (1998) Expression of v-Src in mammary epithelial cells induce transcription via STAT3. *Biochem. J.*, **331**: 381-385.
- Sorokin A, Mohammadi M, Huang J, and Schlessinger J.** (1994) Internalization of fibroblast growth factor receptor is inhibited by a point mutation at tyrosine 766. *J. Biol. Chem.*, **269**: 17056-17061.
- Soskic V, Görlach M, Poznanovic S, Boehmer FD, and Godovac-Zimmermann J.** (1999) Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor β receptor. *Biochemistry*, **38**: 1757-1764.
- Souttou B, Ahmad S, Riegel AT and Wellstein A.** (1997) Signal transduction involved in the mitogenic activity of pleiotropin. Implication of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, **272**: 19588-19593.
- Souttou B, Gamby C, Crépin M, and Hamelin R.** (1996) Tumoral progression of human breast epithelial cells secreting FGF2 and FGF4. *Int. J. Cancer*, **68**: 675-681.
- Souttou B, Hamelin R, and Crépin M.** (1994) FGF2 as an autocrine growth factor for

S

immortal human breast epithelial cells. *Cell. Growth Differ.*, **5**: 615-623.

Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, and Lax I. (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*, **79**: 1015-1024.

Spivak-Kroizman T, Mohammadi M, Hu P, Jaye M, Schlessinger J, and Lax I. (1994) Point mutation in the fibroblast growth factor receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 14419-14423.

Springer BA, Pantoliano MW, Barbera FA, Gunyuzlu PL, Thompson LD, Herblin WF, Rosenfeld SA, and Book GW. (1994) Identification and concerted function of two receptor binding surfaces on basic fibroblast growth factor required for mitogenesis. *J. Biol. Chem.*, **269**: 26879-26884. F

Stanley MJ, Stanley MW, Sanderson RD, and Zera R. (1999) Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, **112**: 377-383.

Stastny J, Prasad R and Fosslien E. (1984) Tissue proteins in breast cancer, as studied by use of two-dimensional electrophoresis. *Clin. Chem.*, **30**: 1914-1918.

Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, and Pavletich NP. (1997) Crystal structure of an hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, **89**: 239-250.

Stegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, and Vestweber D. (1997) The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J. Cell Sci.*, **110**: 687-694.

Steinberg TH, Haugland RP, and Singer VL. (1996) Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains. *Anal. Biochem.*, **239**: 238-245.

Steiner S and Anderson NL. (2000) Expression profiling in toxicology: potentials and limitations. *Toxicol. Lett.*, **112-113**: 467-471.

Steiner S, Aicher L, Raymackers J, Meheus L, Esquer-Blasco R, Anderson NL, and Cordier A. (1996) Cyclosporine A decreases the protein level of the calcium-binding protein calbindin-D 28 kDa in rat kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **51**: 253-258.

Steinfeld R, Van Den Berghe H, and David G. (1996) Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface associated syndecans and glypican. *J. Cell Biol.*, **133**: 405-416.

Stewart AJ, Westley BR, and May EE. (1992) Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br. J. Cancer*, **66**: 640-648.

S

- Stockoe, D, and McCormick, F.** (1997) Activation of c-Raf-1 and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J.*, **16**: 2384-2396.
- Stulik J, Kovarova H, Macela A, Bures J, Jandik P, Langr F, Otto A, Thiede B, and Jungblut P.** (1997) Overexpression of calcium-binding protein calgranulin B in colonic mucosal diseases. *Clin. Chim. Acta*, **265**: 41-55.
- Suen KL, Bustelo XR, and Barbacid M.** (1995) Lack of evidence for the activation of the Ras/Raf mitogenic pathway by 14-3-3 proteins in mammalian cells. *Oncogene*, **11**: 825-831.
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, and Martin GR.** (1999) Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryos. *Genes Dev.*, **13**: 1834-1846.
- Sutherland RL, Watts CKW, and Musgrove E.** (1993) Cyclin gene expression and growth control in normal and neoplasia human breast epithelium. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **47**: 99-106.
- Sweeney KJ, Sarcevic B, Sutherland RL, and Musgrove E.** (1997) Cyclin D2 activates in preference Cdk4 in human breast epithelial cells. *Oncogene*, **14**: 1329-1340.
- Takahashi K, Suzuki K, Kawahara S, and 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.
- Takaishi S, Sawada M, Morita Y, Seno H, Fukuzawa H, and Chiba T.** (2000) Identification of a novel alternative splicing of human FGF receptor 4: soluble-form splice variant expressed in human gastrointestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**: 658-662.
- Takei Y, Kurobe M, Uchida A, and Hayashi K.** (1994) Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in breast cancer. *Clin. Chem.*, **40**: 1980-1981.
- Talarico D, and Basilico C.** (1991) The K-fgf/hst oncogene induces transformation through an autocrine mechanism that requires extracellular stimulation of the mitogenic pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 1138-1145.
- Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, and Srivastava PK.** (1997) Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, **278**: 117-120.
- Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, and Comb MJ.** (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.*, **15**: 4629-4642.
- Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, Hanai N, Kuriki K, Kamiakito T, Kobayashi Y, Yoshida H, Koike M, and Fukayama M.** (1998) High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers

and breast tissues, immuno-histochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF8. *Cancer Res.*, **58**: 2053-2056.

Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, and Matsumoto K. (1992) Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8928-8932.

Tanaka K, Abe M, and Sato Y. (1999) Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J. Cancer Res.*, **90**: 647-654.

Tanaka S, Gately S, Neville ME, Herblin WF, Gross JL, Engelhard H, Perricone M, Eidsvoog K, and Brem S. (1994) Suramin, an anticancer and angiostatic agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Res.*, **54**: 2654-2660.

Teruel T, Valverde AM, Benito M, and Lorenzo M. (1996) Transforming growth factor beta 1 induces mitogenesis in fetal rat brown adipocytes. *J. Cell. Physiol.*, **166**: 577-584.

Theillet C, Adelaide J, Louason G, Bonnet-Dorion F, Jacquemier J, Adnane J, Longy M, Katsaros D, Sismondi P, Gaudray P et al. (1993) FGFR1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, **7**: 219-226.

Theillet C, Le Roy X, De Lapeyrière O, Grosgeorges J, Adnane J, Raynaud SD, Simony-Lafontaine J, Goldfarb M, Escot C, Birnbaum D, and Gaudray P (1989) Amplification of FGF-related genes in human tumors: possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene*, **4**: 915-922.

Thiele H, Berger M, Lenzner C, Kuhn H, and Thiele BJ. (1998) Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. *Eur. J. Biochem.*, **257**: 62-68.

Thomas JJ, Bakhtiar R, and Siuzdak G. (2000) Mass Spectrometry in viral proteomics. *Acc. Chem., Res.*, **33**: 179-187.

Thomas KA, Gimenez-Gallego G, DiSalvo J, Linemeyer D, Kelly L, Menke J, Mellin T, and Busch R. (1987) Structure and activity of acidic fibroblast growth factor. *in* Angiogenesis mechanisms and pathobiology. *Current communications in molecular biology*. Ed. Rifkin DB, Klagsburn M, Cold Spring Harbor, New-York, pp 9-12.

Thompson LD, Pantoliano MW, and Springer BA. (1994). Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification

T

of the heparin binding domain. *Biochem.* **33**: 3831-3840.

Thorson JA, Yu LWK, Hsu AL, Shih NY, Graves PR, Tanner JW, Allen PM, Piwnica-Worms H, and Shaw AS. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 5229-5238.

Toker A. (1998) Signaling through Protein Kinase C. *Front. Biosci.*, **3**: d1134-147.

Tombes RM, Auer KL, Mikkelsen R, Valeris K, Wymann MP, Marshall CJ, McMahan M, and Dent P. (1998) The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic. *Biochem. J.*, **330**: 1451-1460.

Tonella L, Walsh BJ, Sanchez JC, Ou K, Wilkins M, Tyler R, Frutiger S, Gooley AA, Pescaru I, Appel RD, et al. (1998) '98 Escherichia coli SWISS-2DPAGE database update. *Electrophoresis*, **19**: 1960-1971.

Trask DK, Band V, Zajchowski DA, Yaswen P, Suh T, and Sager R. (1990) Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2319-2323.

Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, and Cohen P. (1992) Sustained activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem. J.*, **288**: 351-355.

Trudel S, Paquet MR, and Grinstein S. (1991) Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cells. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem. J.*, **276**: 611-619.

Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, and Gallagher JT. (1992) Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **267**: 10337-10341.

Turnova S, Woods A, and Couchman JR. (2000) Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**: 269-288.

Tzivion G, Luo Z, and Avruch J. (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, **394**: 88-92.

Ullrich A and Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine-kinase activity. *Cell*, **61**: 203-212.

Unlu M, de Lange RP, de Silva R, Kalaria R, and St Clair D. (2000) Detection on complement factor B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy disease using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Neurosci. Lett.*, **282**:

149-152.

- Unwin RD, Knowles MA, Selby PJ, and Banks RE.** (1999) Urological malignancies and the proteomic-genomic interface. *Electrophoresis*, **20**: 3629-3637.
- Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, Doetschman T, Coffin JD, Wyland JJ, and Hung YT.** (1999) Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat. Neurosci.*, **2**: 246-253.
- Vainikka S, Joukov V, Wennström S, Bergman M, Pelicci PG, and Alitalo K.** (1994) Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). Comparison with FGFR1. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18320-18326.
- Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Birbaum D, Basilico C, Jaye M, and Alitalo K.** (1992) Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J.*, **11**, 4273-4280.
- van Puijenbroek AAFL, van Weering DAJ, van den Brink CE, Bos JL, van der Saag PT, de Laat SW, and den Hertog J.** (1997) Cell scattering of SK-N-MC neuroepithelioma cells in response to Ret and FGF receptor tyrosine kinase activation is correlated with sustained ERK2 activation. *Oncogene*, **14**: 1147-1157.
- van Roozendaal KE, Klijn JG, van Ooijen B, Claasen C, Eggermont AM, Henzen-Logmans SC, and Foekens JA.** (1996) Differential regulation of breast tumor cell proliferation by stromal fibroblasts of various breast tissue sources. *Int. J. Cancer*, **65**: 120-125.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, and Waterfield MD.** (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.*, **22**: 267-272.
- Venkataraman G, Raman R, Sasisekharan V, and Sasisekharan R.** (1999) Molecular characteristics of fibroblast growth factor- fibroblast growth factor receptor-heparin-like glycosaminoglycan complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 3658-3663.
- Verbeek BS, Vroom TM, Adriaansen-Slot SS, Ottenhoff-Kalff AE, Geertzema JGN, Hennipman A, and Rijksen G.** (1996) c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *J. Pathol.*, **180**: 383-388.
- Verdier AS, Mattei MG, Lovec H, Hartung H, Goldfarb M, Birnbaum D, and Coulier F.** (1997) Chromosomal mapping of two novel human FGF genes, FGF11 and FGF12. *Genomics*, **40**: 151-154.
- Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Sasse J, and Klagsbrun M.** (1987) Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor : synthesis and deposition

U
V

- into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2292-2296.
- Volk R, Koster M, Poting A, Hartmann L, and Knochel W.** (1989) An antisense from the *Xenopus laevis* bFGF gene coding for an evolutionarily conserved 24 kd protein. *EMBO J.*, **8**: 2983-2988.
- Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, and Simons M.** (1999) The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **274**: 24417-24424.
- Vonderhaar BK.** (1987) Local effect of EGF, a-TGF, and EGF-like growth factors on lobuloalveolar development of the mouse mammary gland *in vivo*. *J. Cell. Physiol.*, **132**: 581-584.
- Wang F, Kan M, McKeehan K, Jang JH, Feng S, and McKeehan WL.** (1997) A homeo-interaction sequence in the ectodomain of the fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**: 23887-23895.
- Wang F, Kan M, Xu JM, Yan G, and McKeehan WL.** (1995b) Ligand-specific structural domains in the fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**: 10222-10230.
- Wang F, Kan M, Yan G, Xu JM, and McKeehan WL.** (1995a) Alternatively spliced NH-terminal immunoglobulin-like loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J. Biol. Chem.*, **270**: 10231-10235.
- Wang F, Lu W, McKeehan K, Mohamedali K, Gabriel JL, Kan M, and McKeehan WL.** (1999) Common and specific determinants for fibroblast growth factors in the ectodomain of the receptor kinase complex. *Biochemistry*, **38**: 160-171.
- Wang G, and Thomas KA.** (1994) Purification and characterization of a functional soluble fibroblast growth factor receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 1781-1788.
- Wang H, Rubin M, Fenig E, DeBlasio A, Mendelsohn J, Yahalom J, and Wieder R.** (1997) Basic fibroblast growth factor causes growth arrest in MCF-7 human breast cancer cells while inducing both mitogenic and inhibitory G1 events. *Cancer Res.*, **57**: 1750-1757.
- Wang JF, Shen M, Fong GH, and Hill DJ.** (2000) A soluble fibroblast growth factor receptor is released from HL-60 promyelocytic leukemia cells: implications for paracrine growth control. *Growth Factors*, **17**: 203-214.
- Wang JK, Gao G, and Goldfarb M.** (1994) Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 181-188.
- Wang JK, Xu H, Li HC, and Goldfarb M.** (1996a) Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to the activators of Ras. *Oncogene*, **13**: 721-729.

- Wang LY, Edenson SP, Yu YL, Senderowicz L, and Turck CW.** (1996b) A natural kinase-deficient variant of fibroblast growth factor receptor 1. *Biochemistry*, **35**: 10134-10142.
- Wang Q, McEwen DG, and Ornitz DM.** (2000) Subcellular and developmental expression of alternatively spliced form of fibroblast growth factor 14. *Mech. Dev.*, **90**: 283-287.
- Wang X, Weng LP, and Yu Q.** (2000) Specific inhibition of FGF-induced MAPK activation by the receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR. *Oncogene*, **19**: 2346-2353.
- Wang W, Smith R, Burghardt R, and Safe SH.** (1997) 17 beta-estradiol-mediated growth inhibition of MDA-MB-468 cells stably transfected with the estrogen receptor: cell cycle effects. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **133**: 49-62.
- Wang Y, and Becker D.** (1997) Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.*, **3**: 887-893.
- Ward CW, Gough KH, Rashke M, Wan SS, Tribbick G, and Wang J.** (1996) Systematic mapping of potential binding sites for Shc and Grb2 SH2 domains on insulin receptor substrate-1 and the receptors for insulin, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.*, **271**: 5603-5609.
- Wasinger VC, Pollack JD, and Humphery-Smith I.** (2000) The proteome of *Mycoplasma genitalium*. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 1571-1582.
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, and Cooper JA.** (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.*, **16**: 1909-1920.
- Wasylyk B, Hagman J, and Gutierrez-Hartmann A.** (1998) Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *TIBS*, **23**: 213-216.
- Webster MA, Cardiff RD, and Muller WJ.** (1995) Induction of mammary epithelial hyperplasias and mammary tumors in transgenic mice expressing a murine mammary tumor virus/activated c-Src fusion gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7849-7853.
- Webster MK and Donoghue DJ.** (1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.*, **15**: 520-527.
- Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, and Donoghue DJ.** (1996) Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia II. *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 4081-4087.

W

- Weijland A, Neubauer G, Courtneidge SA, Mann M, Wierenga RK, and Superti-Furga G.** (1996) The purification and characterization of the catalytic domain of Src expressed in *Schizosaccharomyces pombe*. Comparison of unphosphorylated and tyrosine phosphorylated species. *Eur. J. Biochem.*, **240**: 756-764.
- Werner S, Duan DS, de Vries C, Peters KG, Johnson DE, and Williams LT.** (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.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, and Underwood PA.** (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.*, **271**: 10079-10086.
- Wieder R, Fenig E, Wang H, Wang Q, Paglin S, Menzel T, Gabrilove J, Fuks Z, and Yahalom J.** (1998) Overexpression of basic fibroblast growth factor in MCF-7 cells: Lack of correlation between inhibition of cell growth and MAP kinase activation. *J. Cell. Physiol.*, **177**: 411-425.
- Williams K, Chubb C, Huberman E, and Giometti CS.** (1998) Analysis of differential protein expression in normal and neoplastic human breast epithelial cell lines. *Electrophoresis*, **19**: 333-343.
- Wimmer K, Kuick R, Thoraval D, and Hanash SM.** (1996) Two-dimensional separations of the genome and proteome of neuroblastoma cells. *Electrophoresis*, **17**: 1741-1751.
- Wirth PJ.** (1989) Specific polypeptide differences in normal versus malignant breast tissue by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **10**: 543-554.
- Wolf C, Rouyer N, Lutz Y, Adida C, Loriot M, Bellocq JP, Chambon P, and Basset P.** (1993) Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 1843-1847.
- Woodward TL, Xie JW, and Haslam SZ.** (1998) The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, **3**: 117-131.
- Wu BJ, and Morimoto RI.** (1985) Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6070-6074.
- Wu BJ, Williams GT, and Morimoto RI.** (1987) Detection of three protein binding sites in the serum-regulated promoter of the human gene encoding the 70-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2203-2207.
- Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, Wang**

- D, Warren RS, and Donner DB.** (2000) Utilization of distinct signaling pathways for receptors for vascular endothelial growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, **275**: 5096-5103.
- Xie MH, Holcomb I, Deuel B, Dowd P, Huang A, Vagts A, Foster J, Liang J, Brush J, Gu Q, Hillan K, Goddard A, and Gurney AL.** (1999) FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine*, **11**: 729-735.
- Xu B, Wilsbacher JL, Collisson T, and Cobb MH.** (1999) The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 *in vitro* and ERK activation *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **274**: 34029-34035.
- Xu H, Lee KW, and Goldfarb M.** (1998) Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17987-17990.
- Xu J, Lawshe A, MacArthur CA, and Ornitz DM.** (1999) Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17. *Mech. Dev.*, **83**: 165-178.
- Xu J, Nakahara M, Crabb JW, Shi E, Matuo Y, Fraser M, Kan M, Hou J, and McKeehan WL.** (1992) Expression and immunochemical analysis of rat and human fibroblast growth factor receptor (flg) isoforms. *J. Biol. Chem.*, **267**: 17792-17803.
- Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DZ, Leder P, and Deng C.** (1998) Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*, **125**: 753-765.
- Xue L, Shireman PK, Hampton B, Burgess WH, and Greisler HP.** (2000) The cysteine-free fibroblast growth factor-1 mutant induces heparin-independent proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells. *J. Surg. Res.*, **92**: 255-260.
- Yamaguchi F, saya H, Bruner JM, and Morrison RS.** (1994) Differential expression of two fibroblast growth factor receptors genes is associated with malignant progression in human astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 484-488.
- Yamaguchi TP, Harpai K, Henkemeyer M, and Rossant J.** (1994) Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.*, **8**: 3032-3044.
- Yamamori B, Kuroda S, Shimizu K, Fukui K, Ohtsuka T, and Takai Y.** (1995) Purification of a Ras dependent mitogen-activated protein kinase kinase kinase from bovine brain cytosol and its identification as a complex of B-Raf and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.*, **270**: 11723-11726.
- Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, and McKeehan WL.**

- (1993b) Exon switching and activation of stromal and embryonic FGF-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 4513-4522.
- Yan G, McBride G, and McKeegan WL.** (1993a) Exon skipping causes alteration of the COOH-terminus and deletion of the phospholipase C gamma 1 interaction site in the FGF receptor 2 kinase in normal prostate epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**: 512-518.
- Yan G, Wang F, Fukabori Y, Sussman D, Hou JZ, and McKeegan WL.** (1992) Expression and transforming activity of a variant of 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.
- Yanagida M, Miura Y, Yagasaki K, Taoka M, Isobe T and Takahashi N.** (2000) Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry analysis of proteins detected by anti-phosphotyrosine antibody on two-dimensional gels of fibroblast cell lysates after tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Electrophoresis*, **21**: 1890-1898.
- Yang J, and Kornbluth S.** (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol.*, **9**: 207-210.
- Yayon A, Aviezer D, Safran M, Gross JL, Heldman Y, Cabilly S, Givol D, and Katchalski-Katzir E.** (1993) Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 10643-10647.
- Yayon A, Ma YS, Safran M, Klagsburn M, and Halaban R.** (1997) Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase deficient FGF receptor-1: evidence for the involvement of Src-family kinases. *Oncogene*, **14**: 2999-3009.
- Yedavelli SP, Guo L, Daou ME, Srivastava PK, Mittelman A, and Tiwari RK.** (1999) Preventive and therapeutic effect of tumor derived heat shock protein, gp96, in an experimental prostate cancer model. *Int. J. Mol. Med.*, **3**: 243-248.
- Yee D, Paik S, Lebovic GS, Marcus RR, Favoni RE, Cullen KJ, Lippman ME and Rosen N.** (1989) Analysis of insulin-like growth factor-I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, **3**: 509-517.
- Yenofski R, Cereghini S, Krowczynska A, and Brawerman G.** (1983) Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 1197-1203.
- Yiangou C, Cox H, Bansal GS, Coope R, Gomm JJ, Barnard R, Walters J, Groome N, Shousha S, Coombes RC, and Johnston CL.** (1997b) Down-

regulation of a novel form of fibroblast growth factor receptor 1 in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, **76**: 1419-1427.

- Yiangou C, Gomm JJ, Coope R, Law M, Luqmani YA, Shousha S, Coombes RC, and Johnston CL.** (1997a) Fibroblast growth factor-2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance. *Br. J. Cancer*, **75**: 28-33.
- Yokote K, Hellman U, Ekman S, Saito Y, Ronnstrand L, Saito Y, Heldin CH, and Mori S.** (1998) Identification of Tyr-762 in the platelet-derived growth factor alpha-receptor as the binding site for Crk proteins. *Oncogene*, **16**: 1229-1239.
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, and Stork PJ.** (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392**: 622-666.
- Yoshida M, Wada M, Satoh H, Yoshida T, Sakamoto H, Miyagawa K, Yokota J, Koda T, Kakimuna M, Sugimura T, and Terada M.** (1988) Human HST1 (HSTF-1) maps to chromosome band 11q13 and coamplifies with the INT2 gene in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 4861-4864.
- Yoshida T, Ishimura K, Sakamoto H, Yakota J, Hirohashi S, Igarashi K, Sudo K, and Terada M.** (1994) Angiogenic activity of the recombinant hst-1 protein. *Cancer Lett.*, **83**: 261-268.
- Yoshimura N, Sano H, Hashiramoto A, Yamada R, Nakajima H, Kondo M, and Oka T.** (1998) The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF1) and FGF receptor-1 (FGFR1) in breast cancer. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **89**: 28-34.
- Zachariae W, Shevchenko A, Andrews PD, Ciosk R, Galova M, Stark MJ, Mann M, and Nasmyth K.** (1998) Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science*, **279**: 1216-1219.
- Zalcman G, Closson V, Honoré N, Olofsson B, and Tavitian A.** (1995) Participation de la cascade des protéines Rho à la régulation du cytosquelette: rôle possible dans les mécanismes d'oncogénèse. *m/s*, **11**: 1551-1556.
- Zang Q, Lu Z, Curto M, Barile N, Shalloway D, and Foster DA.** (1997) Association between v-Src and protein kinase C delta in v-Src-transformed fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **272**: 13275-13280.
- Zhan X, Bates B, Hu X, and Golfarb M.** (1988) The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Cell*, **50**: 729-737.
- Zhan X, Hu X, Friesel R, and Maciag T.** (1993) Long term growth factor exposure and differential phosphorylation are required for DNA synthesis in BALB/c 3T3. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9611-9620.
- Zhan X, Plourde C, Hu X, Friesel R, and Maciag T.** (1994) Association of

Y
Z

fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and Cortactin. *J. Biol. Chem.*, **269**: 20221-20224.

Zhang JD, Cousens LS, Barr PJ, and Sprang SR. (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structure homolog of interleukin 1beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 3446-3450.

Zhang L, Kharbanda S, Chen D, Bullocks J, Miller DL, Ding IY, Hanfelt J, McLeskey SW, and Kern FG. (1997) MCF-7 breast carcinoma cells overexpressing FGF-1 form vascularized, metastatic tumors in ovariectomized or tamoxifen-treated nude mice. *Oncogene*, **15**: 2093-2108.

Zhang L, Kharbanda S, Hanfelt J, and Kern FG. (1998) Both autocrine and paracrine effects of transfected acidic fibroblast growth factor are involved in the estrogen-independent and antiestrogen-resistant growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, **58**: 362-361.

Zhang L, Kharbanda S, McLeskey SW, and Kern FG. (1999) Overexpression of fibroblast growth factor-1 in MCF-7 breast cancer cells facilitates tumor cell dissemination but does not support the development of macrometastases in the lungs or lymph nodes. *Cancer Res.*, **59**: 5023-5029.

Zhang Y, Turkson J, Carter-Su C, Smithgall T, Levitzki A, Kraker A, Krolewski JJ, Medveczky P, and Jove R. (2000) Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **275**: 24935-24944.

Zhao Y, Sudol M, Hanafusa H, and Krueger J. (1992) Increased tyrosine kinase activity of c-Src during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8293-8302.

Zhou FY, Owens RT, Hermonen J, Jalkanen M, and Hook M. (1997) Is the sensitivity of cells for FGF-1 and FGF-2 regulated by cell surface heparan sulfate proteoglycans? *Eur. J. Cell Biol.*, **73**: 166-174.

Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, Yin M, Coffin JD, Kong L, Kranias EG, Luo W, Boivin GP, Duffy JJ, Pawlowski SA, and Doetschman T. (1999) Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat. Med.*, **4**: 201-207.

Zhou Z, Zuber ME, Burrus LW, and Olwin BB. (1997) Identification and characterization of fibroblast growth factor (FGF) binding domain in the cysteine-rich FGF receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**: 5167-5174.

Zhu H, Anchin J, Ramnarayan K, Zheng J, Kawai T, Mong S, and Wolff ME. (1997) Analysis of high-affinity binding determinants in the receptor binding epitope of basic fibroblast growth factor. *Protein Eng.*, **10**: 417-421.

Zhu H, Ramnarayan K, Anchin J, Miao WY, Sereno A, Millman L, Zheng J,

- Balaji VN, and Wolff ME.** (1995) Glu-96 of basic fibroblast growth factor is essential for high affinity receptor binding. Identification by structure-based site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **270**: 21869-21874.
- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, and Rees DC.** (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*, **251**: 90-93.
- Zuber ME, Zhou Z, Burrus LW, and Olwin BB.** (1997) Cysteine-rich FGF receptor regulates intracellular FGF-1 and FGF-2 levels. *J. Cell. Physiol.*, **170**: 217-227.
- Zugmaler G, Ennis BW, Deschauer B, Katz D, Knabbe C, Wilding C, Daly P, Lippman ME, and Dickson RB.** (1989) Transforming growth factor type β 1 and β 2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, **141**: 353-361.

ANNEXES

ANNEXE 1

I/ ANNEXE 1

“FGF signals for cell proliferation and migration through different pathway”

Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, and Le Bourhis X.

Revue publiée dans *Cytokine and Growth Factor Review*, 11: pp295-302 (2000).



Mini Review

FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways

B. Boilly^{a,*}, A.S. Vercoutter-Edouart^a, H. Hondermarck^a, V. Nurcombe^b,
X. Le Bourhis^a

^a*Equipe Facteurs de Croissance (UPRES 1033), Bât SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

^b*Department of Anatomical Sciences, University of Queensland, 4072, Australia*

Abstract

FGFs are pleiotropic growth factors that control cell proliferation, migration and differentiation. However, FGF transduction studies have so far focused primarily on the mitogenic effect of this growth factor family and it has been difficult to assess if the described intracellular signaling pathways are dedicated solely to cell proliferation, or whether they are equally important for the migratory activity often seen in responsive cells. We review here papers in which the migratory effects of this growth factor family were clearly discriminated from proliferative effects. In toto, these studies suggest that cells use different signaling pathways for migration, such as Src and p38 MAP kinase, from those for proliferation, which tend to upregulate the ERKs. Which signaling pathway a cell uses for proliferation or migration appears to depend on many factors, including the structure and the quantity of available FGF trapped in the basal lamina by heparan sulfate co-factors, the disposition of cognate high affinity receptors and the general environment of the cell. Thus the density of the cell population, the state of the cell cycle, the presence of other factors or receptors will modulate the migratory response of cells to FGF. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: FGF; Receptor; Signaling pathway; Migration; Proliferation

1. Introduction

The family of heparin-binding Fibroblast Growth Factors (FGFs) are ubiquitously distributed throughout tissues, and are involved in both development and adult tissue homeostasis. FGFs also promote cancer progression, not only because of their mitogenic and angiogenic effects, but also tumor metastasis, because of their migratory effects on tumor and endothelial cells. Their action on cells is mediated by high affinity tyrosine kinase receptors (FGFRs) and a class of low affinity receptors, the heparan sulfate proteoglycans (HSPGs). Over 20 FGF homologues [1,2] have been

described, as well as four FGFRs, reviewed in Ref. [3]. FGF binding to the cell surface induces FGFR dimerisation, and subsequent activation of receptor tyrosine kinases and autophosphorylation of the cytoplasmic domains of the cognate receptors, reviewed in Ref. [4] (Fig. 1). The phosphorylated tyrosines are then recognised by SH2 domain-containing signal transducers. Target enzymes such as PLC γ and Src bind to the tyrosine autophosphorylation sites and themselves become phosphorylated. The autophosphorylation sites also serve as binding sites for adaptor proteins such as Grb2 and Shc. Grb2 binds to the Ras guanine nucleotide-releasing factor Sos through its SH3 domains. The formation of the Grb2–Sos complex results in the recruitment of the oncogene Ras in the plasma membrane, and its further activation by the exchange of GDP for GTP by Sos. It is now well

* Corresponding author. Tel.: +33-3-2043-4060; fax: +33-3-2043-4038.

E-mail address: benoni.boilly@univ-lille1.fr (B. Boilly).

established that the Ras signaling pathway is crucial for the FGF-induced proliferation of many cell types. Indeed, activated Ras leads to activation of a signaling cascade involving the Ser/Thr kinase Raf, the dual specificity MAP kinase (MEK), and MAP kinase (ERK1/2 isoforms, reviewed in Ref. [5]). More recently, a membrane-associated 90 kDa-protein, dubbed FRS2 (FGF receptor substrate 2), has been found to be tyrosine phosphorylated in response to FGF-2 stimulation, although whether it binds directly to FGFR is not clear. However, the role of kinases such as Src, PKC or P13-kinase seems to depend on cell type, even though the final effect of the FGF-2-induced signal is to promote cellular proliferation.

Activation of FGFRs by their ligands elicits a diverse set of cellular responses, including proliferation, migration and differentiation. However, the preponderance of research has focused mainly on proliferation, and almost all our knowledge about FGF transduction concerns this event. However, this growth factor is known to induce more than one biological effect on the same cell type. One of the best studied models is angiogenesis, reviewed in Ref. [6], where FGF stimulates both endothelial cell proliferation and migration [7]; other pertinent models of the migratory function of FGF concern early development [2,8,9], wound healing [10,11], migration of embryonic mesoderm [12,13] and as well as tracheal branching in *Drosophila melanogaster* [14,15], and sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans* [16,17]. During these complex events, cells both proliferate and migrate under the influence of FGF; however, it is difficult to know if the same cell uses FGF to generate two different pathways within itself that lead to both proliferation and migration, or whether a cell generates a single intracellular pathway able to trigger both responses. This review deals with recent data related to

the mechanism of FGF action underlying the cell migration response, independent of its function on cell proliferation.

Cell migration has been studied directly in cell scattering models such as the epithelial to fibroblastoid transition [18] and the phagokinetic track assay [19], as well as by two in vitro experimental procedures. The first involves healing of a confluent cell monolayer wounded linearly with a needle or a razor blade; it is known that cells close to the wound migrate in order to “heal” it. The second exploits the Boyden chamber with micropore nitrocellulose filters coated with extracellular matrix components, most often collagen. Cells are cultured in the upper chamber (on the filter), with the experimental growth factor in the lower chamber [20]; in this case the effect of the growth factor is estimated by counting cells on the lower part of the filter, that is, cells which had migrated through that filter.

The act of cell migration requires a complicated set of coordinated behaviours before movement can be effected. Because an in vivo cell must disengage both from its cellular neighbours, and readjust its relationship with the surrounding extracellular matrix, the secretion of proteolytic enzymes has long been thought to be a prerequisite for the “loosening” a cell must undergo before movement can take place. A complicated set of intercellular bonds must be broken, and it has been generally assumed that specific enzymes must be secreted by a cell before this can happen. However, despite a plethora of in vitro data, convincing in vivo data for this process is still lacking. The migration effects of FGF have been approached by measuring cultured cell production of urokinase type plasminogen activator (uPA), a proteolytic enzyme upregulated with FGF stimulation [21]. uPA, a key molecule involved in extracellular matrix breakdown, is required for cell migration in such different processes as development, angiogenesis and cancer [22–24].

The above in vitro systems have been used to explore different experimental conditions for FGF signaling, including the manipulation of FGF, its receptors, and of the transduction pathways which respond to it.

2. Manipulation of FGF

It has been shown that various FGF-2 mutants, although unable to upregulate uPA production, still retain full mitotic activity. Thus the deletion of the six amino acid residues 27–32 of the recombinant 155 amino acid form of human FGF-2 strongly decreased (by 100 times) the production of uPA by endothelial cells, but did not modify the proliferative response [25], even though this FGF deletion mutant was able to bind to and activate FGF receptors. Similar results

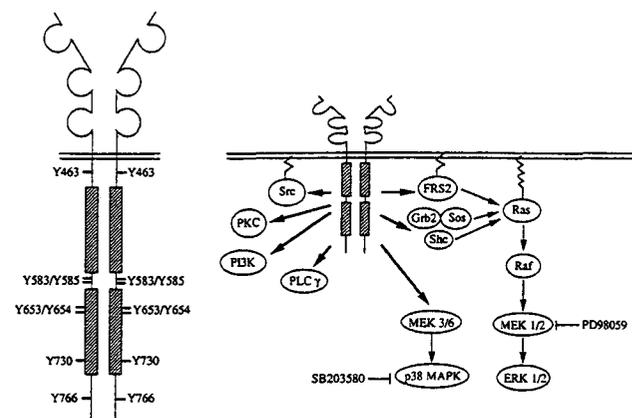


Fig. 1. FGF signaling pathways. Left: FGFR dimerisation with tyrosine phosphorylation sites. Right: FGFR signal transduction molecules PD98059 and SB203580 are specific inhibitors of MEK 1/2 and p38 MAP kinase, respectively. (See text for details).

were obtained by changing basic residues (Arg-118, Lys-119, Lys-128; Arg-129) [26], or residues 27–31 (Lys-Asp-Pro-Lys-Arg) [27] to neutral glutamine residue by site-directed mutagenesis of FGF-2. Conversely, the synthetic peptide FGF-2 (112–155) could not block uPA activity at concentrations that affected mitogenic activity in bovine aortic endothelial cells. The peptide 130–155 blocked neither uPA nor mitogenic activity [28]; moreover, experiments using liposome encapsulated FGF-2 indicated that the interaction of this growth factor with its receptors differs according to the induced biological response. Dissociation of FGF-induced cell migration from proliferation has also been obtained in a wound-healing assay of endothelial cells [29]. In this work, it was shown that recombinant high molecular weight FGF-2 (HMW FGF-2; 24 kDa = 18 kDa + 55 amino acid N terminal) inhibits the migration of endothelial cells and of MCF-7 breast cancer cells. However, although it had no effect on growth of endothelial cells, it stimulated the proliferation of MCF-7 cells at least as well as 18 kDa FGF-2. Blocking antibodies indicated that the inhibition of motility and stimulation of growth are localised to different parts of HMW FGF-2: the growth-promoting activity is localised in the 18 kDa part of the 24 kDa FGF-2, and the migration-inhibiting activity in the N-terminal 55 amino acids. Although nothing is known about the signaling pathway of HMW FGF-2, the authors proposed that this factor could be the “predominant” one in regulating cell migration, especially in the presence of 17 β oestradiol and the enhancement of HSP27, two conditions known to increase the secretion of this factor [30]. The role of the 18 kDa versus high molecular forms of FGF-2 on migration has already been pointed out by Bikfalvi et al. [19], who transfected cells with different molecular weight forms of FGF-2. These workers showed that 18 kDa FGF-2-transfected NIH 3T3 cells exhibited increased migration rates but lower rates of growth compared to parental cells transfected with the vector alone or HMW FGF-2 (22, 22.5 and 24 kDa).

Another manipulation of the ligand allowing discrimination between FGF-induced cell migration as opposed to cell proliferation was presented recently by Lavallée et al. [31]. These authors reported that in a wound healing model using Balb/c 3T3 cells, transient exposure of the cells to FGF-1 (as little as 90 min) is sufficient to induce a migratory response without cell proliferation. Indeed, FGF-1 withdrawal during the G1 phase pushed the cells to return to a state similar to quiescence by reversing tyrosine phosphorylation of FGFR-1. This decreased activity of p44 and p42 MAP kinase accompanied the attenuation of DNA synthesis. In contrast, transient exposure of the cells to FGF-1 induced a continual activation of the Src pathway, which in turn induced a high level of Myc mRNA,

tyrosine phosphorylation of cortactin and redistribution of F actin to the periphery of the cell, thus confirming the migratory potential of the stimulated cell. The requirement of Src for cell migration in a wound model assay was recently demonstrated by Liu et al. [32]; using embryonic fibroblasts derived from Src knockout mice, they showed that lack of Src did not affect FRS2 tyrosine phosphorylation or cell proliferation, but did impair the FGF-induced tyrosine phosphorylation of cortactin and cell migration. Interestingly, FGF-1-induced neurite outgrowth (which is not dependent of cell proliferation) also involves Src [33], suggesting that transient exposure to FGF-1 plays a role in lamellipodial formation.

It has long been established that the half-life of secreted members of the FGF family is extended by interactions with HSPGs, molecules which are integral to the extracellular matrix [3]. FGFs bind to the HS glycosaminoglycan sidechains of these complexes, and this binding protects them from heat, pH and proteolytic degradation. Furthermore, it has been shown that HS is necessary for the FGF to successfully dock with its cognate receptors. However, it remains a controversial question as to whether the HS induces some sort of conformational change in the bound FGF, which then alters its binding characteristics to its high affinity receptor. It has yet to be convincingly demonstrated that binding to HS radically affects the intracellular pathways triggered by that particular FGF isoform.

3. Manipulation of FGFRs

FGFRs have been shown to be critical for cell migration in several models. For example, dominant negative FGFR-1-transfected oligodendrocyte progenitors were unable to migrate when transplanted into neonatal rat brains [34]. In the same way, sex myoblast migration of *Caenorhabditis elegans* is dependent on an FGFR-like tyrosine kinase [35]. Similar results have been obtained for such complex patterns of cell migration as branching morphogenesis. Dominant negative mutation of FGFR2 blocked airway branching during mouse lung development [36], a result which was also obtained using antisense FGFR2 oligonucleotides in rat embryos [37]. Genetic approaches have also shown the role of an FGFR homologue (*breathless*) in tracheal branching during *Drosophila melanogaster* development, reviewed in Refs. [38,39].

The function of FGFR in cell migration, as opposed to proliferation, has been studied with targeted tyrosine mutations in the intracytoplasmic domain of FGFRs. Landgren et al. [40] reported that truncated FGFR-1 lacking 63 amino acid residues of the C-terminal tail (from amino acid 759 in the FGFR-1 sequence) failed to stimulate chemotaxis in porcine en-

dothelial cells, but was capable of mediating proliferation. Conversely, migration and proliferation were possible with truncated FGFR-1 lacking 48 amino acid residues (from amino acid 774) of the C-terminal tail. Interestingly, point mutation of FGFR-1 at Y766, which left it unable to activate either phospholipase C gamma 1 (PLC γ 1) or phospholipase A2 (PLA2), had no effect on cell migration and proliferation.

Nevertheless, FGFR phosphorylation requirements are different for FGF-2-induced uPA upregulation. It was thus shown recently on L6 cells [41] that single point mutations in the autophosphorylation sites Y653 or Y654 impaired uPA upregulation after FGF-2 stimulation, while point mutations in Y463, Y583, Y585, Y583/Y585F, or Y730 were without effect. Moreover, uPA upregulation by FGF-2 was hampered in cells transfected with the FGFR-1-Y463/583/585/730F as well as with the FGFR-1-Y463/730F mutants. In contrast, the FGFR-1-Y463/583/585F and the FGFR-1-Y583/585/730F mutants were still able to upregulate uPA. This demonstrated the necessity of Y463 or Y730 for FGF-2-mediated uPA induction. Interestingly, as these non-FGF-2 responsive mutants for uPA upregulation still retained full mitogenic capacity, it can be concluded that Y463 and Y730 are dispensable for mitogenic signaling. Indeed, as in the chemotaxis of endothelial cells, PLC γ activation is not required for induction of uPA by FGF-2 [41,42]. These data indicate that the interaction of FGF-2 with FGFR-1 differs according to the response induced, that is, mitogenicity or uPA activity. However, it can also be quantitatively different, as FGF-2 antagonists such as suramin, protamine sulfate, heparin, the synthetic peptide FGF-2 (112–155) and a soluble form of FGFR-1 did not inhibit FGF-2-induced uPA upregulation at concentrations that did affect the binding of FGF-2 to cell surface receptors and mitogenic activity [28].

4. Manipulation of FGF transduction pathways

The mitogenic activity of FGF and its migration activity have been pharmacologically dissociated with drugs targeted to various components in the transduction pathways. The dual signaling pathway of FGF was first shown by Presta's group, who examined the regulation of plasminogen activation (uPA) in fetal bovine aortic endothelial cells [43]. Using 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and the PKC inhibitor H7, they showed that PKC activation underlies FGF-2-induced proliferation, but that PA activity was independent of this kinase. Additionally, EGTA could prevent both ⁴⁵Ca influx and the increase of PA activity without affecting the mitogenic activity of FGF-2. The signaling pathway leading to uPA upregulation

was more carefully dissected in FGF-2-stimulated NIH 3T3 fibroblasts, which activate the Ras/Raf1/ERK2/Jun D pathway [44]. Indeed, as these cells also proliferate under the influence of FGF-2, it remains unclear as to which part of this pathway is specifically devoted to uPA induction, as opposed to proliferation. As Dell'Era et al. [41] showed that ERK2 and Jun D were activated in wt-FGFR-1 L6 myoblasts (which show FGF-2-induced uPA upregulation) as well as in FGFR-1-Y463/583/585/730F mutants (which are unable to upregulate uPA but capable of proliferating in the presence of FGF-2), this pathway seems to be insufficient for uPA induction. Nevertheless it is necessary, because blocking ERK2 activation with PD 098059 hampered uPA upregulation in FGF-2-stimulated wt-FGFR-1 cells [41]. A similar result was also reported for FGF-2-induced scattering of epithelioma cells which required sustained, rather than transient ERK2 activation [45].

In contrast with experiments involving uPA upregulation, PKC was equally activated in FGF-2-stimulated capillary endothelial cells undergoing cell migration, as down-regulation of PKC by prolonged treatment with phorbol esters or staurosporine prevented both the mitogenic and the chemotaxis effect of FGF-2 [46]. On the other hand, in vascular endothelial cells, pertussis toxin, a peptide which stimulates a GTP-binding protein that activates adenylate cyclase, reduced FGF-2-induced migration by 80%, without inhibiting cell proliferation [47]. In this model, migratory responses to FGF-2 appear to be mediated by a G-protein-coupled phospholipase A2 activity involving arachidonic acid release. In NBT-II, a rat bladder carcinoma cell line, pertussis toxin, as well as other cAMP-elevating agents such as 8-bromo cAMP, dibutyl cAMP and forskolin, also inhibited cell mobility in the presence of FGF-1 while the mitogenic response to this factor was increased [48]. Complicating this distinction between PKC and cAMP, it has also been recently shown that PKA-activating agents can inhibit hepatocyte migration [49].

At the present time there is still a great deal of data about the intracellular signals generated from FGFRs that defies simple and clear rationalisation. For example, site-directed mutation of FGFRs at residue Y766 does not hamper chemotaxis following ligand stimulation, demonstrating that the ability of FGF to promote chemotaxis is not dependent on either increased activation of PLC γ and phospholipase A2, increased hydrolysis of phosphatidylinositol or increased mobilization of Ca⁺⁺ [40,50]. On the other hand, migration of porcine aortic endothelial cells in Boyden chambers requires activation of a Wortmannin-sensitive enzyme, possibly P13K, even though it is inefficiently activated by wt-FGFR-1 [40]. In wound healing, cell migration appears to involve the Src path-

way [31,32] and activation of ERK and p38 MAP kinase. This pathway activates the AP-1 driven FGF-inducible responsive element of the syndecan 1 gene, an element induced selectively in migrating but not proliferating keratinocytes [51]. Sustained activation of pp60c-Src, not observed during FGF-1-induced proliferation, has also been described during the cell scattering induced by this growth factor [52]. Activation of ERK1/2 by FGF-2 has also been shown during endothelial repair after wounding by balloon angioplasty [53]. Similar results were also obtained in an *in vitro* angiogenesis model of murine endothelial cells by Tanaka et al. [54], who showed that the three kinase homologues ERK, JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) and p38 MAP kinase were activated by FGF-2, with the last one being more specifically involved in cell migration. They concluded this because SB203580, an inhibitor of p38 MAP kinase, inhibited actin reorganisation and vincullin assembly in the focal adhesion plaque while PD98059, an inhibitor of the ERK1/2 pathway, did not. It was also shown recently that FGF2-induced chemotaxis of endothelial cells is under the control of c-Fes [55], although it did not appear to involve uPA secretion in these cells. On the other hand, it does not appear to be strongly linked to mitogenesis. Taken together, all these data reinforce the idea that FGFs are able to induce proliferation or movement through separable pathways.

5. Discussion and conclusion

Both proliferation and migration are often induced by FGF in the same cell type during development, angiogenesis, regeneration and cancer. These two events are linked by the fact that daughter cells have to move from the site of cell division in order to build organ rudiments, construct blood vessels, close wounds or to metastasise. It is now clear that the same FGF receptor can be involved in both mitogenesis and cell mobility, as it is possible to obtain these two effects in wt FGFR-transfected cells. The problem is to explain how the same receptor can produce different biological effects. It has been shown that some modifications of the ligand (deletion or addition of certain amino acid residues) can direct the cell response toward proliferation or migration [25–29]. Little is known about the mechanism by which such a modification of the ligand can instruct cells to proliferate instead of migrating. Different transduction pathways can be activated by changing the duration of FGF exposure to the cell; transient FGF stimulation can activate the Src pathway leading to a migratory phenotype, while sustained stimulation appears to correlate with cell proliferation through MAP kinase activation [31]. This dual transduction pathway for FGF, leading either to prolifer-

ation or migration, is supported by different studies in which modification of the FGFR [40,41,50] or alteration of some transduction pathways by specific inhibitors [41,43,47,54] allow the expression of only one of these biological responses. Despite these results, however, we still do not have a comprehensive view of the transduction pathways in FGF-induced cell migration, not only because the complete dissection of these pathways is yet to be done, but also because the cells and the experimental procedures that have been used were so different. What seems to be clear from several papers (see Table 1) is that PLC γ is not involved in this process [40–42]. FGF-induced cell migration involves either the Src pathway [31,32,52,56] or the MAP kinase pathway via ERK [41,51] or p38 MAP kinase [51,54]. Some clues as to a way around this conflicting data may be provided by some recent data. The p38 MAP kinase, a stress-activated protein kinase [57], is also involved in collagenase-1 and stromelysin-1 production by the growth factor IL-1 [58]; these enzymes are known to play a role in the migration process. Additionally, FAK, a serine-threonine kinase which plays a critical role in cell adhesion and migration in relation with Src (by virtue of its role in the assembly of focal adhesion plaques), is also phosphorylated by FGF [56,59].

The existence of a dual transduction pathway, leading either to migration or to proliferation, poses the problem of how a cell can use its transduction pathways to respond to FGF in an appropriate context. As these differing actions of FGF have not yet been observed simultaneously on the same cell, Boyer et al. [48] concluded that the dual action of FGF-1 reflects a bifurcation in the transduction pathways for this growth factor. It is difficult to know which signaling pathway is actually activated, because few studies have been concerned with FGF-induced proliferation and migration on the same cell at the same time. However, we can tentatively conclude that the Src pathway and the MAP kinase pathway via p38 are probably more specific for cell migration, while the MAP kinase pathway via ERK is used more for cell proliferation. However, problematical data which confuse this relatively simple idea abound; for example, Src was recently shown to be involved in the FGF-2 induced differentiation of endothelial cells, leading to tube formation [60]. It is also clear that p38 MAP kinase is required for FGF-2 induced fibroblast proliferation, but not differentiation, of PC12 cells [61].

The activation of one particular transduction pathway could depend on the phase of cell cycle, the position of the cell within the population or the general level of confluency of this population. In cultured NBT-II rat bladder carcinoma cells, the G1 phase is critical for FGF-1-induced cell migration [62]. Peripheral cells disperse in response to FGF-1

Table 1
Transduction pathways in FGF-induced cell migration

Biological model	Not involved	Involved
Cell scattering	-	cAMP (inhibition effect) [48] ^a Src [52] ^a
Wound-healing	-	cAMP (inhibition effect) [47] ^a PLA2 [47] ^a Src [31,33] ^a ERK, p38 MAP kinase [51] ^a p38 MAP kinase [54] ^a
Migration in Boyden chamber	PLC γ , phosphatidylinositol hydrolysis, Ca ⁺⁺ mobilisation [50] ^a PLC γ , PLA2 [40] ^a	Wortmaninn-sensitive enzyme [40] ^a
uPA upregulation	PLC γ [42] ^a PKC [43] ^a	Ca ⁺⁺ influx [43] ^a ERK2 [41] ^a

^a References [bracketed] concern only works in which FGF-induced migration was discriminated from FGF-induced proliferation.

while inner cells proliferate; in low density cell culture, FGF-1 promotes migration during epithelium-mesenchyme transition and growth arrest, while in high density cultures it only stimulates DNA synthesis [63]. Such a difference in the response of cells to FGF might be related to a change in the rate of FGF binding to the cell [64] as well as to a switch in autocrine FGF production during cell culture. In breast cancer cells we have shown that migration depends preferentially on how FGF-1 associates with its cognate heparan sulfate [56].

It is also possible that the type of FGF response reflects the level of activation of FGFR, as suggested by Rusnati et al. [28]. The duration of receptor activation [31] as well as the quantity and the quality of the available ligand [25–27,65,66], seems to have important repercussions for the type of cell response observed. Bioavailability of the ligand during culture, especially at confluency, could also modify the activation of FGFR, the binding capacities of which might be also changed.

Cross-talk with other factors or signaling molecules might also interfere with the FGF-cell response. For example, it has been shown that in cultured NBT-II cells, TGF β suppresses FGF-1-induced cell proliferation although its dissociation effect is not modified [67]. In a similar manner, cAMP can decrease FGF-induced migration while either having no effect on cell proliferation [47], or even increasing it [48]. Receptors other than the FGFRs, such as heparan sulfate [56,68] and the integrins [69,70] as well as the mechanical properties of the extracellular microenvironment [71], can also modulate the migratory response of cells to FGF.

What is clear from this review is that not only is the plethora of conflicting data hard to rationalise, but the lack of a unifying hypothesis or principle to direct future work is a major problem. The establishment of

a cellular model in which both proliferation and migration can be separated, yet simultaneously assessed, would seem to be a major priority.

References

- [1] Xie MH, Holcomb I, Deul B, Dowd P, Huang A, Vagts A, Foster J, Liang J, Brush J, Gu Q, Hillan K, Goddard A, Gurney AL. FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine* 1999;11:729–35.
- [2] Koga C, Adati N, Nakata K, Mikoshiba K, Furuhashi Y, Sato S, Tei H, Sakaki Y, Kurokawa T, Shiokawa K, Yokoyama KK. Characterization of a novel member of the FGF family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:56–765.
- [3] McKeehan WL, Wang F, Kan M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucl Acid Res* 1998;59:135–75.
- [4] Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci* 1999;4:165–77.
- [5] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998;74:49–139.
- [6] Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995;73:333–46.
- [7] Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB. Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol* 1990;110:511–7.
- [8] Li S, Muneoka K. Cell migration and chick limb development: chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Dev Biol* 1999;211:335–47.
- [9] Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 1999;13:1834–46.
- [10] Robinson CJ. Growth factors: therapeutic advances in wound healing. *Ann Med* 1993;25:535–8.
- [11] Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:153–65.
- [12] Beiman M, Shilo BZ, Volk T. *Heartless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* 1996;10:2993–3002.

- [13] Gisselbrecht S, Skeath JB, Doe CQ, Michelson AM. *Heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1996;10:3003–17.
- [14] Glazer L, Shilo BZ. The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* 1991;5:697–705.
- [15] Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow M. *Branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 1996;87:1091–101.
- [16] Belloch R, Newman C, Kimble J. Control of cell migration during *Caenorhabditis elegans* development. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:608–13.
- [17] Montell DJ. The genetics of cell migration in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* development. *Development* 1999;126:3035–46.
- [18] Boyer B, Tucker GC, Valles AM, Franke WW, Thierry JP. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *J Cell Biol* 1989;109:1495–509.
- [19] Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Quarto N, Mignatti P, Rifkin DB. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J Cell Biol* 1995;129:233–43.
- [20] Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther* 1991;51:1–11.
- [21] Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB. Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulate capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis and migration. *Mol Cell Biol* 1986;6:4060–6.
- [22] Kwaan HC. The plasminogen–plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis* 1992;11:291–311.
- [23] Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:714–24.
- [24] Kitange G, Shibata S, Tokunaga Y, Yagi N, Yasunaga A, Kishikawa M, Naito S. Ets-1 transcription factor-mediated urokinase-type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells stimulated by serum and basic fibroblast growth factors. *Lab Invest* 1999;79:407–16.
- [25] Isacchi A, Statuto M, Chiesa R, Bergonzoni L, Rusnati M, Sarmientos P, Ragnotti G, Presta M. A six-amino acid deletion in basic fibroblast growth factor dissociates its mitogenic activity from its plasminogen activator-inducing capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2628–32.
- [26] Presta M, Statuto M, Isacchi A, Caccia P, Pozzi A, Gualandris A, Rusnati M, Bergonzoni L, Sarmientos P. Structure-function relationship of basic fibroblast growth factor: site-directed mutagenesis of a putative heparin-binding and receptor-binding region. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:1098–107.
- [27] Presta M, Gualandris A, Urbinati C, Rusnati M, Coltrini D, Isacchi A, Caccia P, Bergonzoni L. Subcellular localization and biological activity of M(r) 18,000 basic fibroblast growth factor: site-directed mutagenesis of a putative nuclear translocation sequence. *Growth factors* 1993;9:269–78.
- [28] Rustani M, Dell'Era P, Urbinati C, Tanghetti E, Massardi ML, Nagamine Y, Monti E, Presta M. A distinct basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGF receptor interaction distinguishes urokinase-type plasminogen activator induction from mitogenicity in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 1996;7:369–81.
- [29] Piotrowicz RS, Maher PA, Levin EG. Dual activities of 22–24 kDa basic fibroblast growth factor: inhibition of migration and stimulation of proliferation. *J Cell Physiol* 1999;178:144–53.
- [30] Piotrowicz RS, Martin JL, Dillmann WH, Levin EG. The 27-kDa heat shock protein facilitates basic fibroblast growth factor release from endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:7042–7.
- [31] La Vallée TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X, Maciag T. Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *J Cell Biol* 1998;141:1647–58.
- [32] Liu J, Huang C, Zhan X. Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* 1999;18:6700–6.
- [33] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 1996;273:510–3.
- [34] Osterhout DJ, Ebner S, Xu J, Ornitz DM, Zazanis GA, McKinnon RD. Transplanted oligodendrocyte progenitor cells expressing a dominant negative FGF receptor transgene fail to migrate in vivo. *J Neurosci* 1997;17:9122–32.
- [35] DeVore DL, Horwitz HR, Stern MJ. An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migrations of the sex myoblasts in *C. elegans* hermaphrodites. *Cell* 1995;83:611–20.
- [36] Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, Williams L. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J* 1994;13:3296–301.
- [37] Post M, Souza P, Liu J, Tseu I, Wang J, Kuliszewski M, Tanswell AK. Keratinocyte growth factor and its receptor are involved in regulating early lung branching. *Development* 1996;122:3107–15.
- [38] Montell DJ. Moving right along: regulation of cell migration during *Drosophila* development. *Trends Genet* 1994;10:59–62.
- [39] Skaer H. FGF branches out. *Current Biol* 1997;7:R238–R241.
- [40] Landgren E, Klint P, Yokote K, Claesson-Welsh L. Fibroblast growth factor receptor-1 mediates chemotaxis independently of direct SH2-domain protein binding. *Oncogene* 1998;17:283–91.
- [41] Dell'Era P, Mohammadi M, Presta M. Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Mol Biol Cell* 1999;10:23–33.
- [42] Roghani M, Mohammadi M, Schlessinger J, Moscatelli D. Induction of urokinase-type plasminogen activator by fibroblast growth factor (FGF)-2 is dependent on expression of FGF receptors and does not require activation of phospholipase C gamma 1. *J Biol Chem* 1996;271:31154–9.
- [43] Presta M, Maier JAM, Ragnotti G. The mitogenic signaling pathway but not the plasminogen activator-inducing pathway of basic fibroblast growth factor is mediated through protein kinase C in fetal bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biol* 1989;109:1877–84.
- [44] Besser D, Presta M, Nagamine Y. Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth Differentiation* 1995;6:1009–17.
- [45] van Puijnenbroek AA, van Weering DH, van den Brink CE, Bos JL, van der Saag PT, de Laat SW, den Hertog J. Cell scattering of SK-N-MC neuroepithelioma cells in response to Ret and FGF receptor tyrosine kinase activation is correlated with sustained ERK2 activation. *Oncogene* 1997;14:1147–57.
- [46] Daviet I, Herbert JM, Maffrand JP. Involvement of protein kinase C in the mitogenic and chemotaxis effects of basic fibroblast growth factor on bovine cerebral cortex capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 1990;259:315–7.
- [47] Sa G, Fox PL. Basic fibroblast growth factor-stimulated endothelial cell movement is mediated by a pertussis toxin-sensitive pathway regulating phospholipase A2 activity. *J Biol Chem* 1994;269:3219–25.

- [48] Boyer B, Valles AM, Jouanneau J, Delouvee A, Thiery JP. Implication of scatter/growth factors in tumor progression. In: Princess Takamatsu Symp. vol. 24, 1994, p. 233–42.
- [49] Ma TY, Kikuchi M, Sarfeh IJ, Shimada H, Hoa NT, Tarnawski AS. Basic fibroblast growth factor stimulates repair of wounded hepatocyte monolayer: modulatory role of protein kinase A and extracellular matrix. *J Lab Clin Med* 1999;134:363–71.
- [50] Clyman RI, Peters KG, Chen YQ, Escobedo J, Williams LT, Ives HE, Wilson E. Phospholipase C gamma activation, phosphatidylinositol hydrolysis, and calcium mobilization are not required for FGF receptor-mediated chemotaxis. *Cell Adhes Commun* 1994;1:333–42.
- [51] Jaakkola P, Kontusaari S, Kauppi T, Maata A, Jalkanen M. Wound reepithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. *FASEB J* 1998;12:959–69.
- [52] Rodier JM, Valles AM, Denoyelle M, Thiery JP, Boyer B. pp60c-Src is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line. *J Cell Biol* 1995;131:761–73.
- [53] Pintucci G, Steinberg BM, Seghezzi G, Yun J, Apazidis A, Baumann FG, Grossi EA, Colvin SB, Mignatti P, Galloway AC. Mechanical endothelial damage results in basic fibroblast growth factor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases. *Surgery* 1999;126:422–7.
- [54] Tanaka K, Abe M, Sato Y. Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:647–54.
- [55] Kanda S, Lerner EC, Tsuda S, Shono T, Kanetake H, Smithgall TE. The nonreceptor protein-tyrosine kinase c-Fes is involved in fibroblast growth factor-2-induced chemotaxis of murine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:10105–11.
- [56] Nurcombe V, Bosworth KJ, Boilly B, Hondermarck H. The proliferation and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by specific heparan sulfates. *J Biol Chem*, in press.
- [57] Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends in Cell Biol* 1997;7:353–61.
- [58] Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997;158:3165–73.
- [59] Hatai M, Hashi H, Mogi A, Soga H, Yokota J, Yaoi Y. Stimulation sine-and serine-phosphorylation of focal adhesion kinase in mouse 3T3 cells by fibronectin and fibroblast growth factor. *FEBS Lett* 1994;350:113–6.
- [60] Klint P, Kanda S, Kloog Y, Claesson-Welsh L. Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene* 1999;18:3354–64.
- [61] Maher P. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J Biol Chem* 1999;274:17491–8.
- [62] Bonneton C, Sibarita J, Thiery JP. Relationship between cell migration and cell cycle during the initiation of epithelial to fibroblastoid transition. *Cell Motil Cytoskeleton* 1999;43:288–95.
- [63] Valles AM, Tucker GC, Thiery JP, Boyer B. Alternative patterns of mitogenesis and cell scattering induced by acidic FGF as a function of cell density in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Regul* 1990;1:975–88.
- [64] Richardson TP, Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate. *J Biol Chem* 1999;274:13534–40.
- [65] Schofield PN, Granerus M, Lee A, Ektrom TJ, Engstrom W. Concentration-dependent modulation of basic fibroblast growth factor action on multiplication and locomotion of human teratocarcinoma cells. *FEBS Lett* 1992;24:154–8.
- [66] Granerus M, Welin A, Lundh B, Schofield PN, Ekstrom TJ, Engstrom W. Heparin binding growth factors and the control of teratoma cell proliferation. *Eur Urol* 1993;23:76–81.
- [67] Boyer B, Thiery JP. Cyclic AMP distinguishes between two functions of acidic FGF in a rat bladder carcinoma cell line. *J Cell Biol* 1993;120:767–76.
- [68] Volk R, Schwartz JJ, Rosenberg RD, Simons M. The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:24417–24.
- [69] Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996;135:1633–42.
- [70] Kanda S, Tomasini-Johansson B, Klint P, Dixelius J, Rubin K, Claesson-Welsh L. Signaling via fibroblast growth factor receptor-1 is dependent on extracellular matrix in capillary endothelial cell differentiation. *Exp Cell Res* 1999;248:203–13.
- [71] Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989;109:317–30.

ANNEXE 2

II/ ANNEXE 2

Caractéristiques des protéines de cellules épithéliales mammaires identifiées par spectrométrie de masse

Protein Identified	Accession Number	MW (kDa) / pI	Molecular ion masses used for identification
14-3-3 alpha/beta	P31946	27.7 / 4.79	669.80 / 691.63 / 816.75 / 1016.34 / 1040.03 / 1109.13 / 1206.29 / 1420.47 / 1549.57
14-3-3 sigma	P31947	27.7 / 4.65	669.76 / 729.68 / 816.69 / 1055.14 / 1071.19 / 1122.98 / 1190.34 / 1206.28 / 1547.72
14-3-3 zeta/delta	P29312	27.7 / 4.78	669.73 / 691.63 / 760.70 / 816.75 / 908.00 / 1017.96 / 1125.43 / 1206.25 / 1305.28 / 1433.51 / 1549.40 / 2042.06
Actine	P02570	41.7 / 4.95-5.22	976.8 / 1133.10 / 1355.60 / 1517.40 / 1792.20 / 1955.56 / 2216.40
Alpha Actinine	P12814	102.9 / 5.22	993.80 / 1189.40 / 1216.50 / 1387.80 / 1422.80 / 1576.90 / 1755.10 / 2810.30
Alpha Enolase	P06733	52 / 7-7.5	1143.40 / 1425.70 / 1540.90 / 1556.40 / 1648.1 / 1805.0 / 1908.20 / 1924.20 / 2510.0
Annexine I	P04083	38.8 / 6.6	1263.31 / 1551.89 / 1606.80 / 1679.78 / 1704.02 / 1740.80 / 2142.39
Annexine III	P12429	33.6 / 5.63	930.03 / 968.10 / 1018.89 / 1074.05 / 1223.05 / 1674.90 / 1714.81 / 1898.76
Annexine V	P08758	31 / 4.94	593.50 / 744.60 / 1002.10 / 1107.20 / 1235.40 / 1705.80
Beta Tubuline	P07437	54.8 / 4.85	1040.50 / 1131.43 / 1160.38 / 1246.62 / 1259.52 / 1621.65 / 1637.97 / 1698.00 / 2043.18 / 2088.42 / 2740.02
Calnexine	P27824	79.3 / 4.6	1062.30 / 1300.50 / 1457.50 / 1617.80 / 1771.90 / 1865.00 / 2476.60
Calréticuline	P27797	55 / 4.30	772.70 / 975.90 / 1019.90 / 1220.50 / 1411.20 / 1491.40
Cytokératine 7	P08729	45.8 / 5.05-5.2	932.80 / 992.90 / 1105.00 / 1243.40 / 1407.60 / 1419.60 / 1454.90
Cytokératine 14	P02533	51 / 4.87	807.88 / 841.98 / 1091.22 / 1123.25 / 1168.33 / 1362.47
Cytokératine 17	Q04695	48.6 / 4.85-4.90	767.70 / 807.70 / 994.90 / 1145.00 / 1187.10 / 1223.50 / 1402.20 / 1887.80 / 2105.20
Cytokératine 18	P05783	44.4 / 5.3	634.8 / 653.9 / 759.1 / 808.00 / 838.20 / 966.30 / 976.30 / 1066.50 / 1240.50 / 1293.70 / 1508.00
G3PDH	P04406	37.5 / 8.2	473.90 / 829.70 / 1412.80 / 1545.60 / 1764.70
GRP 58	P30101	56.8 / 5.90-5.98	996.10 / 1192.20 / 1278.20 / 1371.40 / 2576.80
GRP 78	P11021	76 / 4.9	1229.40 / 1461.70 / 1567.80 / 1589.80 / 1817.10 / 1889.10 / 1935.00 / 2000.30 / 2166.01
GRP 94	P14625	92.5 / 4.76	409.30 / 515.70 / 678.0 / 877.10 / 1032.10 / 1082.50 / 1151.40 / 1188.70 / 1279.60 / 1486.50 / 1516.80 / 1630.90 / 1787.10 / 2261.70 / 2248.0
GST	P09211	24.2 / 5.6	604.50 / 752.0 / 1151.60 / 1277.70 / 1535.80 / 1735.20 / 1885.30 / 1894.70 / 1905.40 / 2033.60 / 2065.50 / 2118.50 / 2127.70
HSP 27	P04792	27.1 / 5.8-6.6	597.90 / 832.20 / 961.90 / 1076.40 / 1164.30 / 1906.70
HSP 60	P10809	61.0 / 5.5	942.40 / 1345.70 / 1390.80 / 1700.00 / 1920.30 / 2296.60 / 2366.60 / 2561.50
HSP 71	P11142	70.9 / 5.38	1200.38 / 1229.33 / 1254.38 / 1458.75 / 1488.59 / 1633.85 / 1692.69 / 1789.08 / 1823.03 / 1839.10 / 1983.18

HSP 90	P08238	87.2 / 4.85	730.90 / 830.20 / 902.20 / 1142.30 / 1237.11 / 1250.20 / 1349.40 / 1514.40 / 1783.80
LDH	P07195	37.7 / 5.65	742.70 / 914.00 / 1177.40 / 1263.20 / 1696.00 / 1933.20 / 1988.30
Maspine	P36952	42.1 / 5.72	722.60 / 945.0 / 980.90 / 1032.0 / 1102.60 / 1199.25 / 1221.90 / 1294.90 / 1427.80 / 1716.90 / 1872.30 / 2032.20 / 2347.30
Numatrine	P06748	38.5 / 4.8	610.80 / 784.0 / 1024.0 / 1569.60 / 1836.80 / 2146.30 / 2244.50
PCNA	P12004	32 / 4.57	653.90 / 858.0 / 895.10 / 911.10 / 974.90 / 1276.60 / 2076.60 / 2320.80 / 2480.30 / 3340.22
PDI	P07237	57.1 / 4.77	870.95 / 977.36 / 1003.39 / 1203.87 / 1425.86 / 1452.71 / 1730.94 / 1782.05 / 1834.9 / 1966.25
PGM	P18669	28.6 / 6.9	1151.40 / 1313.60 / 1884.20 / 1981.10 / 2116.70 / 2418.70 / 2434.90
Rho GDI	P52565	27.6 / 4.9	752.90 / 950.30 / 981.00 / 1246.30 / 1262.50 / 1618.90 / 1752.70 / 1918.90 / 2365.80
Superoxyde Dismutase	P04179	22 / 6.75-7.4	1028.98 / 1425.39 / 1745.08 / 2036.25
TCTP	P13693	24 / 4.84	1057.15 / 1061.32 / 1242.18 / 1420.70 / 1436.75 / 1447.67 / 1729.90
Thioredoxine Peroxydase	P32119	22.5 / 5.6	637.70 / 673.70 / 789.90 / 863.0 / 925.10 / 972.90 / 1024.20 / 1180.50 / 1212.30 / 1736.0 / 1864.10 / 2714.70
Tropomyosine 3	P09494	32.9 / 4.8	603.50 / 722.78 / 895.30 / 916.19 / 926.91 / 989.0 / 1074.10 / 1187.60 / 1244.30 / 1302.65 / 1315.85 / 1333.40 / 1315.30 / 1598.70
Tropomyosine 30	P12324	30.6 / 4.75	631.0 / 722.80 / 776.10 / 894.90 / 941.20 / 1087.10 / 1157.49 / 1201.38 / 1244.30 / 1285.57 / 1317.40 / 1400.80 / 1473.80 / 1643.60 / 1771.70
Vimentine	P08670	56 / 4.90-4.95	1047.00 / 1094.00 / 1116.20 / 1131.1 / 1255.20 / 1324.10 / 1429.30 / 1495.80

Tableau 11 : Caractéristiques des protéines de cellules épithéliales mammaires identifiées par spectrométrie de masse. G3PDH, Glycero-3 phosphate déshydrogénase; GRP, Glucose Related Protein; GST, Glutathion S-Transférase; HSP, Heat Shock Protein; LDH, Lactate déshydrogénase; PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen, PDI, Protein Disulfide Isomérase; PGM, Phosphoglycérate Mutase; Rho GDI, Rho GTP-dissociation Inhibitor-1.

ANNEXE 3

III/ ANNEXE 3

LISTE DES ACIDES AMINES ESSENTIELS

NOM	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V



CONTRIBUTION OF PROTEOMIC ANALYSIS TO THE STUDY OF THE INTRACELLULAR SIGNALLING PATHWAYS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 IN BREAST CANCER CELLS

We have studied the Fibroblast Growth Factor-2 mitogenic signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells by proteomic analysis, based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (MALDI-TOF and MS-MS).

Using pharmacological inhibitors and antibodies, we have shown that stimulation of MCF-7 cells by FGF-2 increased the tyrosine-phosphorylation of the FGF receptor, FGF receptor substrate-2, Src kinase, p42/44 Mitogen-activated protein kinases, and a 30-kDa protein. By MALDI-TOF mass spectrometry, we have identified this 30-kDa protein as cyclin D2, a key regulator of the cell cycle. Our results also suggest that cyclin D2 tyrosine phosphorylation requires Src, but not MAPK activation. We have then investigated changes in protein synthesis induced by FGF-2 stimulation after incorporation of ³⁵S-labelled amino acids. We have shown an increase of synthesis of four proteins (Heat Shock Proteins HSP90 and HSP70, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Transcriptionally Controlled Tumor Protein (TCTP)) identified by mass spectrometric analysis (MALDI-TOF and MS-MS). Moreover these four proteins were found to be constitutively up-regulated in *ras*-transfected MCF-7 cells. The inhibition of the FGF-2-induced proliferation by geldanamycin indicated the crucial role played by HSP90 in the control of breast cancer cell growth and its relevance as a potential therapeutic target. Finally, proteomic analysis of breast cancer cells allowed us to show for the first time that 14-3-3 sigma is strongly down-regulated in cancerous cells as compared to normal mammary cells. By virtue of its negative role in the control of cell cycle progression, our data support the idea that 14-3-3 sigma may constitute a new marker of cancerisation of breast epithelial cells.

This study contribute to a better understanding of the signaling pathway for FGF-2 in human breast cancer cells, and shows that proteomic analysis is a powerful approach for the study of signaling pathways and more generally, for the biomedical research.

Key words : Growth factor, breast cancer, signalling pathway, tyrosine phosphorylation, proteomic analysis, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry