Journal de la Société de Biologie, 195 (2), 101-106 (2001)

Contrôle de la signalisation intracellulaire induite par les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) sur la prolifération et la survie des cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine : exemple de régulation de la signalisation des facteurs de croissance endogènes à la rétine.

Frédéric Mascarelli, Christiane Hecquet, Xavier Guillonneau et Yves Courtois

INSERM U450, Développement, vieillissement et pathologie de la rétine, Affiliée CNRS, Association Claude Bernard : 29, rue Wilhem, 75016 Paris.

Reçu le 29 janvier 2001

RÉSUMÉ

L'épithélium pigmenté de la rétine (EPR) adulte est un tissu qui ne prolifère pas. De nombreuses pathologies oculaires sont dues à un EPR soit prolifératif soit en voie de dégénérescence. Le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2) est un facteur de croissance impliqué dans la survie des cellules de l'EPR in vitro. Cet effet est dû à l'activation d'une boucle autocrine impliquant la stimulation de l'expression du FGF1 endogène aux cellules de l'EPR et sa sécrétion.

Le FGF2 exogène active ses récepteurs FGFR1 et la protéine de signalisation ERK2 de façon prolongée, ce qui aboutit à l'induction de l'expression prolongée de la protéine anti-apoptotique BcL-x. Puisque le FGF1 ne possède pas de peptide signal lui permettant d'être sécrété par la voie classique golgienne, le rôle de la sécrétion du FGF1 a été étudié dans les phénomène proliferatif et apoptotique de l'EPR in vitro. La sécrétion forcée de FGF1, par l'ajout d'un peptide signal, induit une forte prolifération des cellules de l'EPR, alors que l'expression du FGF1 sans peptide signal n'induit pas la prolifération cellulaire. Par contre, en condition de stress (privation en sérum), les cellules exprimant le FGF1 avec peptide signal n'excrètent plus de FGF1 et meurent par apoptose, alors que les cellules exprimant le FGF1 sans peptide signal commencent à en sécréter et survivent. Cette étude suggère fortement que les activités de prolifération et de survie de l'EPR dépendent de la sécrétion du FGF1 qui est elle-même déterminée par les conditions environnementales de la cellule.

SUMMARY Regulation of proliferation-survival decisions is controlled by FGF1 secretion in retinal pigmented epithelial cells

Retinal pigmented epithelium (RPE) cells are of central importance in the maintenance of neural retinal function. RPE cell apoptosis is responsible for the development of a variety of retinal degeneration. The role of FGF2 was investigated on RPE cell proliferation and apoptosis in vitro. In the absence of serum, RPE cells died by apoptosis, while the addition of FGF2 greatly reduces apoptosis over a 7-day culture period. This is due to an autocrine loop involving secretion of endogenous FGF1 in the mechanism that govern FGF2-induced resistance to apoptosis. FGF2 induces long-term activation of FGFR1 and ERK1/2, and production of the anti-apoptotic protein BcL-x. Because FGF1 has no classical signal sequence to direct its secretion, we investigated the effects of FGF1 secretion on RPE proliferation and apoptosis in the absence of exogenous FGF2. Forced secretion of endogenous FGF1 by adding a signal peptide to the FGF1 molecule induces FGF1 secretion and cell proliferation in the presence of serum, while in FGF1 stops to be secreted and cell die in the absence of serum. Conversely, in cells cultured in the presence of serum, FGF1 without signal peptide is not secreted, but is secreted and rescue RPE cell from apoptosis when cells are cultured without serum. Thus, the proliferation and survival activities of endogenous FGF1depend on the secretion of FGF1 which is determined by the cell environment.

LA RÉTINE ET LES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES

La rétine, tissu d'origine neuroectodermique, est composée de l'épithélium pigmenté de la rétine (EPR) et de la rétine neurale constituée de cellules neuronales, gliales et endothéliales vasculaires (Fig. 1). La rétine neurale différenciée est organisée en couches de neurones et d'interneurones (photorécepteurs, cellules horizontales, bipolaires, amacrines et ganglionnaires). Elle contient

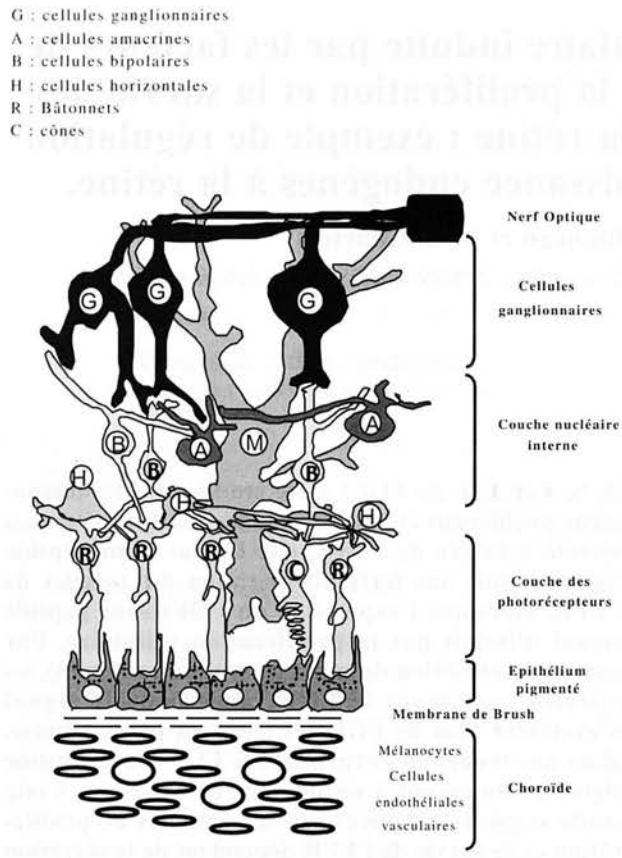

FIG. 1 : Représentation schématique de la rétine de mammifère adulte

des cellules gliales de Müller (RMG) qui traversent toutes les couches neuronales et des astrocytes majoritairement localisés dans la couche des cellules ganglionnaires. La rétine neurale de mammifère est un tissu vascularisé dans sa partie interne. La couche la plus externe de la neurorétine qui perçoit les stimuli lumineux, est composée de photorécepteurs. La lumière absorbée par la rhodospine des segments externes induit un signal qui est transformé en stimuli électriques, transmis par voie nerveuse, des photorécepteurs aux cellules bipolaires et aux cellules horizontales. L'influx nerveux parvient aux cellules horizontales et amacrines qui est transmis aux cellules bipolaires puis ganglionnaires. Les axones des cellules ganglionnaires forment le nerf optique qui achemine le signal hors de l'œil vers le toit optique pour finir dans le cortex. La monocouche des cellules épithéliales de l'EPR est située entre les photorécepteurs et la choroïde qui est le lit vasculaire situé à la partie postérieure de l'oeil. Ces cellules sont polarisées et leur surface apicale interagit avec les photorécepteurs par l'intermédiaire de la matrice interphotorécepteur (IPM). Le côté basal de l'EPR repose sur la membrane de Bruch (BM). L'EPR est essentiel pour le maintien de l'intégrité et des fonctions de la rétine neurale, agissant comme une barrière hémato-oculaire. Il contrôle le transport des ions et des métabolites circulant à travers la rétine. L'EPR phagocyte et dégrade les segments externes et participe de ce fait à la phototransduction.

Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) sont des protéines diffusibles de signalisation, ubiquitaires comprenant 23 membres dont les FGF1 et 2 qui sont les mieux caractérisés. Exprimés dans de nombreux tissus au cours du développement et tout au long de la vie, les FGFs contrôlent la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'angiogenèse (Nugent & Iozzo, 2000). Leurs expressions sont strictement contrôlées en fonction du développement et de l'environnement. Une dérégulation de leur expression peut modifier le devenir cellulaire et provoquer de sévères pathologies. Les FGF1 et 2 ne possèdent pas de séquence codant pour un peptide signal leur permettant d'être sécrété par la voie golgienne classique. La transduction du signal induit par les FGFs implique l'activation de plusieurs étapes de signalisation intracellulaire peu caractérisées, et qui sont médiées par la fixation de 4 récepteurs membranaires de type tyrosine kinase codés par 4 gènes différents *(fgfr 1-fgfr 4)*. La rétine est riche en FGF1 et 2 qui sont synthétisés durant le développement et tout au long de la vie. Les FGFs, leurs récepteurs et les enzymes responsables de différentes cascades d'activations intracellulaires, responsables des différentes activités des FGFs, sont localisés dans les cellules rétiniennes (nerveuses, endothéliales ou gliales). Ainsi, chaque cellule de la rétine possède un système ligand/récepteur/transduction potentiellement fonctionnel pour les FGFs. Par sa relative simplicité structurale, la rétine est un modèle privilégié pour l'étude de la régulation des activités des FGFs dans le système nerveux central. L'existence de modèles murins de dégénérescences rétiniennes mimant des pathologies humaines permet de tester *in vivo* les effets et les régulations induites par les FGFs.

L'EPITHELIUM PIGMENTE DE LA RETINE ET LES PATHOLOGIES DEGENERATIVES ET PROLIFERATIVES ASSOCIEES

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) : La DMLA est la 1re cause de cécité non curable dans les pays industrialisés (8 % de la population âgée de plus de 65 ans et 28 % de celle âgée de plus de 75 ans). C'est la principale pathologie dégénérative de la rétine détectée après 65 ans, au cours de laquelle les cellules de l'EPR au niveau de la macula meurent, entraînant une perte de la vision centrale. La DMLA associe des anomalies de l'EPR, de la rétine neurale et de la choroïde. La dégénérescence des cellules de l'EPR entraine la disparition des photorécepteurs sus-jacents. Les formes néovasculaires sont responsables de 50 % des cas de cécité au cours de l'affection. La survenue d'une néovascularisation choroïdienne est un tournant évolutif crucial dans l'évolution de la DMLA. Les cellules endothéliales vasculaires de la choroïde (CEC), proliférant et migrant à travers la BM et l'EPR, forment, en association avec les cellules de l'EPR, des membranes néovasculaires cho-

roïdiennes et induisent un décollement séreux du neuroépithélium. Dans les régions de forte néovascularisation de ces membranes, de nombreuses cellules de l'EPR meurent par apoptose (Hinton *et al.*, 1998). Aucune thérapeutique n'existe actuellement pour empêcher l'apparition, freiner l'évolution et l'extension des formes atrophiques, et pour prévenir ou ralentir la survenue des complications graves de la DMLA. Seules les formes néovasculaires peuvent bénéficier d'une thérapeutique (photocoagulation au laser), mais la fréquence des récidives souligne que ce traitement n'est que palliatif. De plus, aucun modèle animal entièrement satisfaisant de DMLA n'existe actuellement, ce qui rend les approches méthodologiques de recherche plus délicates.

Le décollement de la rétine compliqué de prolifération vitréorétinienne (PVR) : Chez l'adulte, dans les conditions physiologiques, les cellules de l'EPR ne prolifèrent pas. Par contre, en cas de décollement rhégmatogène causé par la présence de déhiscences dans le neuroépithélium, les cellules de l'EPR migrent dans la cavité vitréenne et prolifèrent. Elles prolifèrent également dans les zones de non-décollement de l'épithélium et participent à la formation de PVR. La PVR est la principale cause d'échec du traitement chirurgical lors du décollement de la rétine. Les cellules de l'EPR subissent une "transdifférenciation" (perte du phénotype épithéloïde et acquisition d'un phénotype mesenchymateux) et sont retrouvées dans les membranes épirétiniennes qui se développent sur et sous le neuroépithélium entraînant la formation de plis fixés et la perte fonctionnelle de la rétine.

LA RETINE PATHOLOGIQUE ET LES FGFS

L'étude des facteurs de croissance dans la rétine a pris ces dernières années une grande importance à cause de la part prise par ces molécules, soit dans le développement de pathologies rétiniennes, soit au contraire dans la stratégie thérapeutique mise en place pour contrecarrer ces pathologies. En effet, les FGF1 et 2 sont des agents causals de pathologies proliferatives rétiniennes, mais également sont, comme d'autres facteurs de croissance (CNTF, BDNF, GDNF), des facteurs anti-dégénératifs pour le système nerveux central et pourraient être utilisés comme agents thérapeutiques. Chez l'adulte, en dehors de toute pathologie, ni les cellules de l'EPR, ni celles de la rétine neurale qui produisent les FGF1 et 2 ne prolifèrent. Par contre, les FGF1 et 2 sont fortement exprimés dans les membranes épirétiniennes (Hueber *et al.*, 1997), suggérant l'implication des FGFs endogènes dans les pathologies proliferatives de la rétine. Par contre, dans des modèles murins de dégénérescence rétiniennes héréditaires (rat RCS) ou induites (modèle de phototoxicité), au cours duquel les photorécepteurs meurent par apoptose, on observe une forte augmentation de l'expression des FGF1 et 2 endogènes sans que les photorécepteurs ne soient sauvegardés (Fig. 2). Or, l'injection d'une dose unique de FGF1 ou 2, entre l'EPR et la

Malgré l'augmentation de l'expression de FGF2 au cours de la dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière (A), seul le FGF2 exogène induit la survie des photorécepteurs (B).

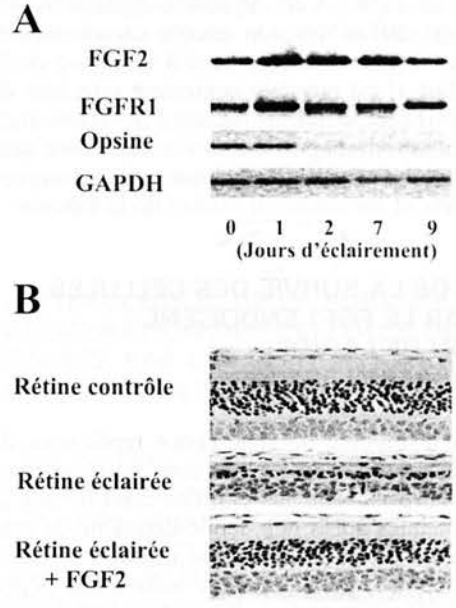

FIG 2 : Variation de l'expression des ARNm du FGF2, du FGFR1 et de l'opsine au cours de la dégénérescence des photorécepteurs dans le modèle murin de phototoxicité et effets de l'injection sous-rétinienne de FGF2 sur la survie des photorécepteurs.

rétine neurale, inhibe la dégénérescence pendant plusieurs mois, indiquant cette fois un rôle protecteur des FGFs exogènes (Faktorovich *et al.*, 1990). L'ensemble de ces études semblait indiquer que soit 1- *in vivo*, les FGFs endogènes possèdent des activités différentes de celle des FGFs exogènes soit 2- les activités biologiques des FGFs endogènes sont rigoureusement contrôlées : inhibées en absence de pathologie et activées lors de processus pathologiques. Il était donc primordial de comprendre parfaitement les différents mécanismes d'action mis en jeu par les FGFs pour induire un effet biologique (délétère ou thérapeutique) bien précis, qui peut varier suivant le type cellulaire cible et l'état dans lequel se trouve la cellule. Ceci, soit pour inhiber l'effet délétère, soit au contraire pour stimuler l'effet curatif et mettre en œuvre une réponse thérapeutique à ces pathologies proliferatives et dégénératives. L'originalité de nos travaux effectués depuis plusieurs années a été de mettre en évidence les activités proliferatives et surtout anti-apoptotiques des FGFs, et de démontrer que les deux hypothèses précédemment émises semblent être justes : suivant que les cellules sont saines ou dans un état de stress, les FGFs induisent des effets biologiques différents car leurs modes et mécanismes d'action vont être régulés de façon différente ; de plus, la rétine exprime des

inhibiteurs de FGFs. Plus récemment, le fait que la co-culture de bâtonnets provenant de rétines saines avec des cônes provenant de souris dystrophiques augmente la survie de ces cônes (Mohand-Said *et al.*, 1998) et que le FGF2 stimule directement la survie des photorécepteurs *in vitro* (Fontaine *et al.*, 1998) confirme le rôle de facteur de survie du FGF2. Ceci démontre également que d'autres facteurs diffusibles non encore caractérisés et sécrétés par les bâtonnets participent à la survie de la rétine. De ce fait, il est possible également que, lors de DMLA, les FGFs et d'autres facteurs de croissance (connus ou à caractériser) puissent être utilisés pour sauvegarder les cellules de l'EPR ainsi que les photorécepteurs à bâtonnets et les cônes au niveau de la macula.

CONTRÔLE DE LA SURVIE DES CELLULES DE L'EPR PAR LE FGF1 ENDOGENE : IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION ERK

En utilisant le modèle de sénéscence réplicative de Hayflick sur les cellules de l'EPR, nous nous sommes aperçus avec surprise que les cellules confluentes et quiescentes obtenues après une demie-douzaine de passages et cultivées jusqu'au douzième passage (cellules âgées), résistaient à la mort cellulaire suite à une déprivation en sérum du milieu de culture. Au contraire, les cellules provenant de cultures primaires et cultivées jusqu'au second passage (cellules jeunes) mouraient par apoptose très rapidement. Puisqu'il avait été montré *in vivo,* dans différents modèles murins que les FGFs possédaient une activité trophique sur les photorécepteurs, la question était de savoir si les FGF1 ou 2 pouvaient être également impliqués dans la survie des cellules de l'EPR. Après avoir montré que les cellules mourraient par apoptose plus rapidement dans les cultures de cellules jeunes que dans celles de cellules âgées, et que les cellules âgées plus résistantes à l'apoptose produisaient et sécrétaient plus de FGF1, Il fallait démontrer par quels mécanismes, le FGF1 pouvait activer un processus anti-apoptotique. Ni la synthèse de *novo* des FGFR ni la production des FGFR ne changeaient au cours du vieillissement des cellules. Par contre, l'activation des FGFR montre que les cellules âgées possèdent des FGFR fortement activés au contraire des cellules jeunes. Pour démontrer l'implication du FGF1 endogène sécrété dans l'activation des FGFR, nous avons employé un anticorps anti-FGF1 immunoneutralisant dans le milieu de culture des cellules âgées. Ce traitement entraîne une inhibition de la phosphorylation des FGFR, démontrant ainsi que c'est bien le FGF1 sécrété qui est responsable de l'activation des FGFR. Par gel shift, il a été montré que ERK1 et ERK2 sont continuellement activées au cours de la cinétique de 7 jours de culture sans sérum, alors qu'elles ne le sont pas dans les cultures de cellules jeunes. L'inhibition pharmacologique de Mek1, l'activateur de ERK1/2, bloque l'activation de ERK et induit rapidement la mort par apoptose des cellules âgées. Ceci indique que la voie ERK1/2 est nécessaire à la survie des cellules de l'EPR. De plus, l'addition d'anticorps anti-FGF1 immunoneutralisant et anti-FGFR1 immunobloquant, inhibe également l'activation de ERK1/2, démontrant que l'effet anti-apoptotique du FGF1 endogène sécrété passe bien par une boucle paracrine via l'activation de la voie ERK (Fig. 3).

En conclusion, en condition de stress (déplétion de sérum), le rôle anti-apoptotique du FGF1 endogène a été démontré alors qu'en condition optimale de culture (en présence de sérum) le FGF1 exogène stimule cette voie de signalisation pour induire la prolifération cellulaire (Fig. 3).

CONTRÔLE DE LA SURVIE DES CELLULES DE L'EPR PAR LE FGF2 EXOGENE : IMPLICATION DU FGF1 ENDOGENE ET DE LA PROTEINE ANTI-APOPTOTIQUE BCL-X

L'addition de FGF2 exogène au milieu de culture de cellules de l'EPR confluentes et quiescentes déprimées en sérum, induit la survie cellulaire. Le FGF1 endogène

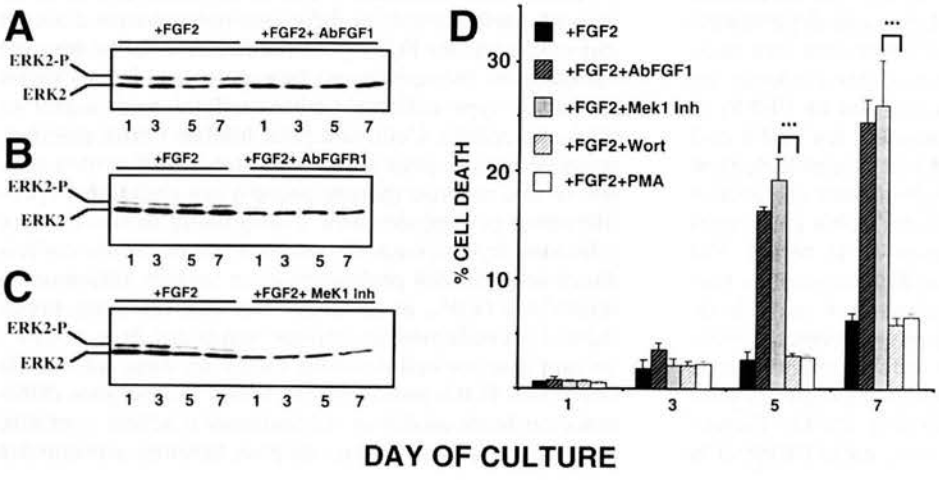

FIG 3 : L'immunoneutralisation du FGF1 (A), l'immunobloquage de FGFR1 (B) et l'inhibition de l'activation de Mek1 (C), inhibe l'activation de ERK2 et induit rapidement la mort des cellules de l'EPR (D). L'inhibition de la PI 3 kinase par la wortmannin et celle de la PKC par l'ester de phorbol PMA n'ont aucun effet sur la mort cellulaire (D).

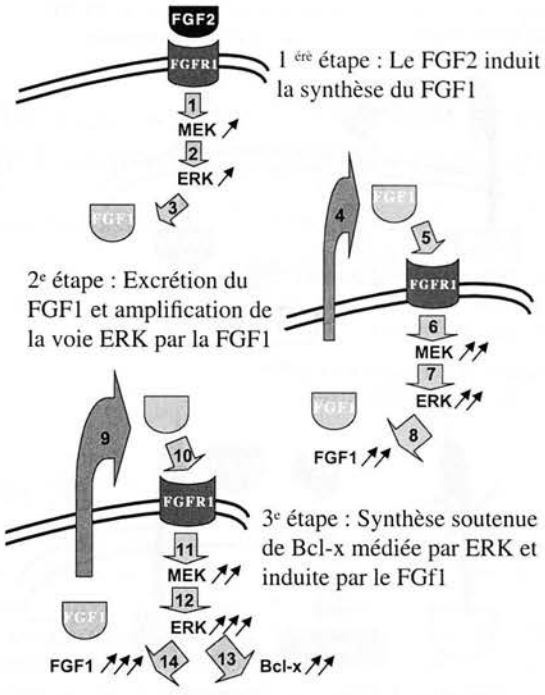

FIG 4 : Représentation schématique de la boucle d'activation anti-apoptotique du FGF2 dans les cellules de l'EPR *in vitro*.

est-il également impliqué dans l'effet anti-apoptotique du FGF2 exogène ? Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé une stratégie antisens dirigée contre le FGF1. Après avoir contrôlé que l'oligonucléotide (ODN) anti-sens anti FGF1 (AS-FGF1) inhibe bien la synthèse de *novo* du FGF1 endogène, nous montrons que le traitement avec l'AS-FGF1, de cellules de l'EPR stimulées avec le FGF2 exogène induit rapidement la mort des cellules. L'ODN sens FGF1 n'a aucun effet. Mais quelle est la voie de signalisation activée par le FGF1 endogène et stimulée par le FGF2 exogène ?

Afin de visualiser la signalisation du FGF2 exogène médiée par le FGF1 endogène, nous avons étudié l'activation des FGFR et de ERK1/2. Le FGF2 induit l'activation soutenue des FGFR, qui est inhibée par l'addition de l'anticorps anti-FGF1 immunoneutralisant dans le milieu de culture de cellules stimulées par le FGF2 exogène. De même, on observe une stimulation soutenue de ERK2 qui est inhibée par l'addition de l'anticorps anti-FGF1 immunoneutralisant dans le milieu de culture, indiquant que l'effet du FGF1 sécrété est médié par la voie ERK. Avec un anticorps anti-FGFR bloquant la fixation de FGF1 sur FGFR, nous obtenons le même effet qu'avec l'anticorps anti-FGF1. La protéine Bcl-x existe sous 2 formes, l'une longue Bcl-xL qui est anti-apoptotique, l, autre courte Bcl-xs qui est pro-apoptotique. Bcl-x peut-elle être impliquée dans l'effet anti-apoptotique du FGF2 ? La stimulation des cellules de l'EPR par le FGF2 exogène induit la production de la forme Bcl-xL. L'incubation des cellules avec l'inhibiteur de la voie ERK (PD98059) inhibe la production de Bcl-xL et induit rapidement la mort par apoptose des cellules stimulées par le FGF2. La stratégie antisens dirigée contre Bcl-x montre que, lorsque les cellules stimulées par le FGF2 n'expriment plus Bcl-x, les cellules meurent également rapidement, démontrant que Bcl-x est une protéine pivot dans l'effet anti-apoptotique du FGF2 exogène.

En conclusion, par des moyens pharmacologiques et immunologiques pour bloquer la voie de signalisation induite par les FGF, et en utilisant des stratégies antisens contre des protéines cibles de cette signalisation, nous démontrons que l'effet anti-apoptotique du FGF2 exogène est médié par le FGF1 sécrété qui stimule la production de la protéine anti-apoptotique via l'activation de la voie ERK (Fig. 4).

LA STIMULATION DE LA SURVIE ET DE LA PROLIFERATION DES CELLULES DE L'EPR EST REGULEE PAR LA CELLULE QUI CONTRÔLE LA SECRETION DU FGF1

Afin de mieux comprendre le rôle de la sécrétion du FGF1 endogène dans la physiologie des cellules de l'EPR, notre stratégie a été d'utiliser des cultures primaires de cellules de l'EPR, qui ne produisent ni ne sécrètent pas de FGF1, et de surexprimer le FGF1 par transfection transitoire. Les cellules de l'EPR ont été transfectées avec l'ADNc du FGF1 auquel on a ajouté ou non, la séquence peptide signal (SP) de l'hormone de croissance pour leur faire activement sécréter de grandes quantités de FGF1, via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ainsi, grâce à cette méthode, on peut mieux contrôler les niveaux de production et de sécrétion du FGF1 dans notre système de culture. Après avoir contrôlé que les cellules cultivées en présence de sérum, transfectées avec le FGF1 (EPR-FGF1) et avec le SP-FGF1 (EPR-SP-FGF1) expriment et produisent de fortes quantités de FGF1, et que seules les cellules EPR-SP-FGF1 sécrètent de façon continue de grandes quantités de FGF1 dans le milieu extracellulaire, nous avons examiné la capacité de prolifération des cellules. Les cellules EPR témoins non transfectées et EPR-FGF1 prolifèrent à la même vitesse, alors que les cellules EPR-SP-FGF1 prolifèrent 2 fois plus vite. Une fois de plus, l'utilisation de l'anticorps anti-FGF1 immunoneutralisant, qui inhibe le FGF1 sécrété, démontre que la stimulation de la prolifération des cellules EPR-SP-FGF1 est bien due au FGF1 sécrété. L'analyse de la cinétique de phosphorylation de FGFR et de ERK1/2 montre également une corrélation entre le niveau de l'activation de ces molécules de signalisation, le niveau de sécrétion du FGF1 et celui de la stimulation de la prolifération dans les cellules EPR-SP-FGF1. La neutralisation du FGF1 sécrété et de la voie ERK par le PD98059 inhibe également la prolifération des cellules EPR-SP-FGF1.

Qu'en est-il de l'effet de la surexpression du FGF1 et de la présence d'une séquence de sécrétion sur la survie des cellules cultivées en absence de sérum ? Par la méthode TUNEL, nous montrons d'une façon surpre-

nante que ce sont les cellules EPR-FGF1, qui théoriquement ne sécrètent pas de FGF1, qui résistent le mieux à l'apoptose induite par la déprivation en sérum. Par contre, les cellules EPR-SP-FGF1 meurent plus rapidement que les cellules contrôles non transfectées.

Que se passe-t-il au niveau de la sécrétion du FGF1 ? les cellules EPR-SP-FGF1 ne sécrètent plus de FGF1 après 4 jours de culture, alors que ce sont les cellules EPR-FGF1 qui ne sécrétaient pas de FGF1 en présence de sérum qui, maintenant, stressées par la déplétion en sérum, sécrètent du FGF1.

Le FGF1 sécrété est-il responsable de la survie cellulaire ? La neutralisation du FGF1 sécrété par les cellules EPR-FGF1 induit rapidement la mort des cellules, suggérant que la survie est due au FGF1 sécrété et que lorsque les cellules ne sécrètent plus de FGF1 en absence de sérum, elles meurent.

Pour bien comprendre ce phénomène, il faut analyser la signalisation induite lors de l'apoptose. Les cinétiques et les niveaux d'activation des FGFR sont identiques dans les cellules EPR-FGF1 et EPR-SP-FGF1, suggérant que ce n'est pas à ce niveau que se fait la régulation de l'effet anti-apoptotique. Par contre, l'analyse de l'activation de ERK2 montre que seules les cellules EPR-FGF1 qui sécrètent d'une façon continue du FGF1, montrent une cinétique soutenue de la phosphorylation de ERK2. L'inhibition du FGF1 sécrété par l'anticorps immunoneutralisant inhibe la phosphorylation de ERK2 et induit rapidement la mort par apoptose, démontrant que l'effet anti-apoptotique du FGF1 est médiée par la voie ERK2 dans les cellules EPR-FGF1.

Le niveau de la protéine ERK2 régule-t-il la survie cellulaire ? La surexpression de ERK2 par transfection de l'ADNc de ERK2 n'induit pas la survie des cellules EPR. Par contre, l'inhibition de la synthèse de ERK2 par la stratégie antisens induit rapidement la mort par apoptose des cellules FGF1-EPR.

Quelles sont les protéines cibles nécessaires à l'effet anti-apoptotique du FGF1 ? L'analyse par western blotting de la production de Bcl-x montre que les cellules EPR-FGF1 produisent d'une façon soutenue la forme longue de la protéine anti-apoptotique, au contraire des cellules EPR-SP-FGF1. L'inhibition de la voie ERK par le composé PD98059, inhibe la production de Bcl-xL. L'inhibition de la synthèse de Bcl-x par la stratégie antisens, démontre que Bcl-x est une protéine pivot dans la voie anti-apoptotique du FGF1 médiée par ERK2.

En conclusion, nous montrons que bien que ce soient les cellules EPR-SP-FGF1 qui produisent du FGF1 et possèdent la capacité de sécréter le FGF1 (présence d'une séquence peptide signal pour le FGF1) en condition optimale de culture, elles ne le sécrètent pas dans des conditions de stress (déplétion en sérum) et donc ne peuvent pas activer la voie anti-apoptotique dépendante du FGF1. Au contraire, les cellules EPR-FGF1 qui ne sécrètent pas de FGF1 en condition normale de culture, lorsqu'elles sont soumises au stress de la déplétion en sérum, répondent à ce stress en activant un processus de sécrétion du FGF1, indépendant du système réticulum-Golgi. Cette sécrétion de FGF1 stimule, par une boucle paracrine, une signalisation anti-apoptotique activée par la voie de transduction ERK2 qui aboutit à la production de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, nécessaire à la survie cellulaire (Fig. 5).

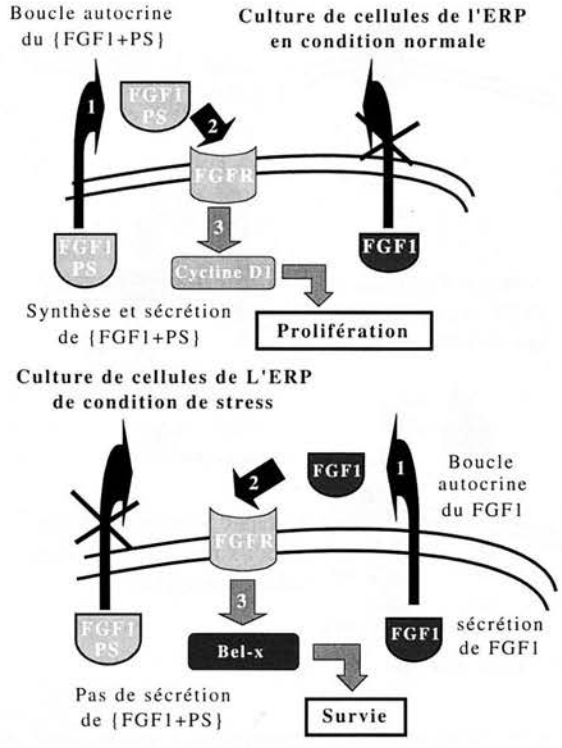

FIG 5 : Représentation schématique des effets mitogéniques et anti-apoptotiques du FGF1 et du SP-FGF1 sur les cellules de l'EPR en condition normale et de stress

BIBLIOGRAPHIE

Faktorovich E., Steinberg R., Yasuruma D., Matthes M. & LaVail M., Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by bFGF. Nature, 19990, *634*, 83-86.

Fontaine V., Kinkl N., Sahel J. & Hicks D. Survival of purified rat photoreptor in vitro directly by FGF2. J. *Neutosci.*, 1998, *18*, 9662-9672.

Hinton D., He S & Lopez P., Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. Arch. *Ophthalmol.*, 1998, *116*, 203-210.

Hueber A., Wiedemann P., Esser P. and Heimann K, basic FGF mRNA, bFGF peptide & FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative diorders (PVE and PDR). *Int. Ophthalmol.*, 1997, *20*, 345-50.

Nugent M.A. and IozzoR.V., Fibroblast growth factors. Int. J. *Biochem Cell Biol.*, 2000, *32*, 115-120.

Mohand-Said S., Deudon-Combe A., Hicks D., Simonutti M., Forster V., Fintz A., Leveillard T., Dreyfus H. & Sahel J. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, *95*, 8357-8362.