

## Le proto-oncogène *c-fos* : un « entremetteur » moléculaire

Le proto-oncogène *c-fos* code pour un facteur de transcription qui appartient à un groupe de gènes dits « de réponse précoce », qui sont induits très rapidement, de façon transitoire, par de très nombreux *stimuli* et cela dans un grand nombre de types cellulaires. Le gène *fos* est actuellement décrit comme un « commutateur général » qui permet à la cellule d'intégrer de nombreuses voies de transmission des signaux qui pourraient aller jusqu'à la formation de la mémoire. C'est, paradoxalement, l'un des oncogènes les plus étudiés alors qu'au contraire des gènes *ras* ou *myc*, pour ne citer que ceux-là, il ne semble que très rarement impliqué dans la genèse de tumeurs spontanées. Toutefois, de par l'écheveau très complexe des contrôles qui se tissent autour de ce proto-oncogène et par la propriété remarquable qu'a sa protéine de s'associer à de nombreux partenaires, il constitue un paradigme fantastique pour l'étude du contrôle des gènes eucaryotes.

---

Jean-Marie Blanchard

---

**F**ort curieusement, l'oncogène *fos* est l'une des retombées indirectes du projet Manhattan. Le groupe de biologistes de l'Argonne National Laboratory, dont l'une des tâches consistait à évaluer les risques associés aux radionucléides utilisés au cours de la mise au point de la bombe atomique, isola deux rétrovirus responsables de l'apparition d'ostéosarcomes chez la souris. Ces virus, le FBJ-MSV (pour *Finkel-Biskis-Jinkins*) et le FBR-MSV (pour *Finkel-Biskis-Reilly*) ont pour caractéristique principale de conduire uniquement à des tumeurs osseuses qui naissent du périoste mais qui, au contraire des tumeurs très agressives que sont les ostéosarcomes humains, ne forment pas de métastases. Les

deux virus sont capables de transformer *in vitro* de nombreuses lignées cellulaires, le FBR-MSV étant de loin le plus efficace pour ce faire et le seul à produire des cellules capables d'induire des tumeurs chez un animal syngénique [1-3]. Plus récemment, un groupe japonais a caractérisé un virus aviaire, le NK24, capable d'induire des néphroblastomes chez le poulet et qui contient également un gène du type *v-fos* [3].

**Pour devenir un oncogène, *c-fos* doit subir plusieurs mutilations**

Dans tous les cas, le virus a récupéré un gène cellulaire, le gène *fos*, dont il a altéré la structure comme cela est montré sur la *figure 1*, page 456. Il en

---

### ADRESSE ET TIRÉS À PART

---

J.-M. Blanchard : directeur de recherche au Cnrs. Laboratoire de biologie moléculaire, URA Cnrs 1191, université de Montpellier-II, place E.-Bataillon, CP101, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

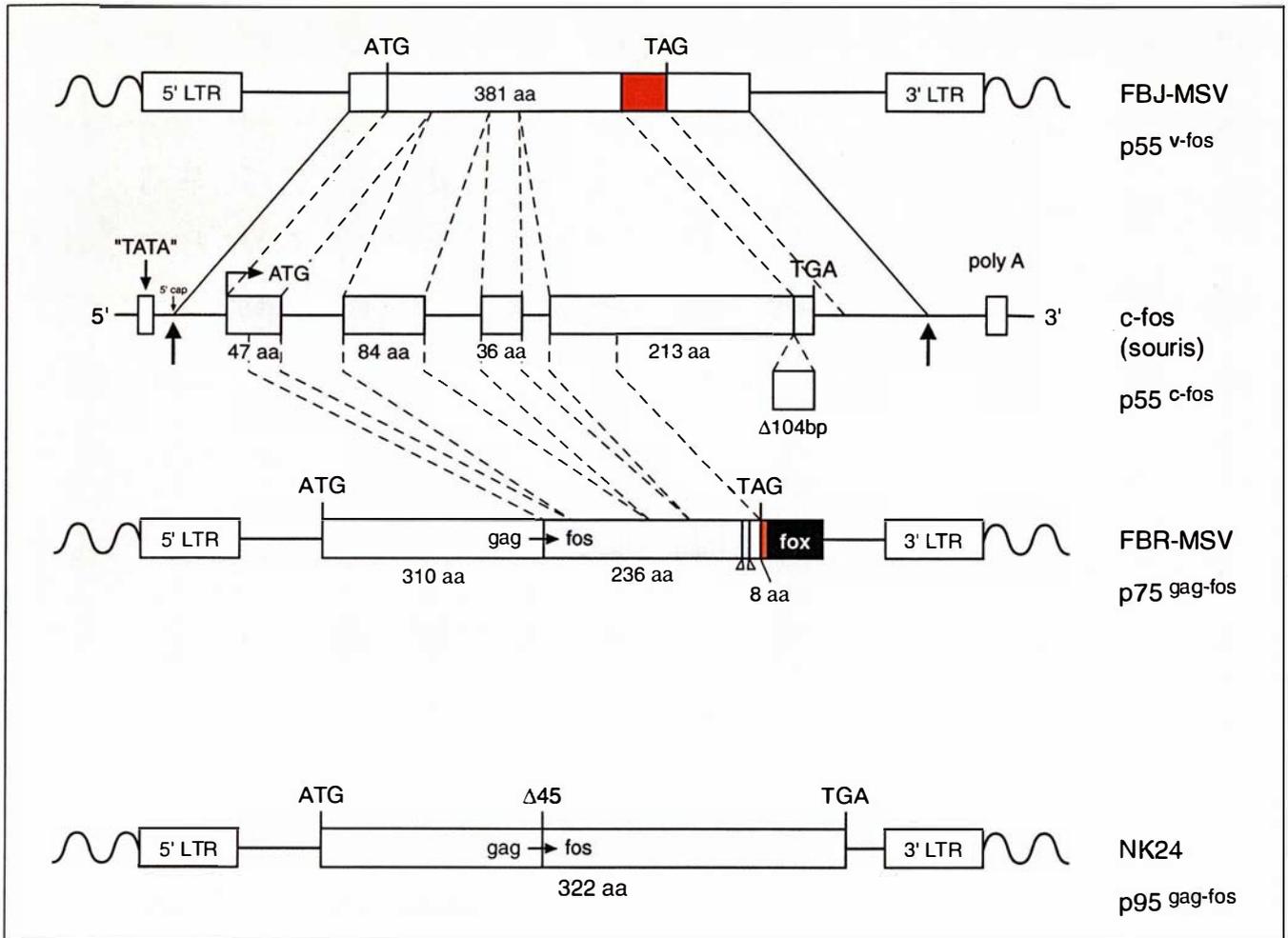


Figure 1. **Structure du gène *c-fos* et de ses avatars viraux.** Les provirus, représentés de part et d'autre du gène cellulaire, montrent les points de recombinaison (flèches) et les différentes parties de ce dernier qui ont été récupérées (pointillés). A cause d'une délétion de 104 pb, les 49 acides aminés carboxyterminaux de FBJ-MSV (rectangle rouge) sont codés dans une phase différente. Quant au FBR-MSV, un événement de recombinaison supplémentaire a fait intervenir un autre locus cellulaire, *fox* (partie noire et rouge). Les triangles représentent de petites délétions, les traits des introns et les rectangles des exons. Le nombre d'acides aminés (aa) est indiqué pour chaque région. Le provirus aviaire NK24, quant à lui, a éliminé les 45 premiers acides aminés en les fusionnant à gag, et une partie de la région 3' non codante.

résulte une protéine virale qui diffère de la protéine cellulaire, d'une part, dans sa partie N-terminale, dans le cas du FBR-MSV ou du NK24, et, d'autre part, dans sa partie C-terminale, dans le cas des FBJ et FBR-MSV. Du côté N-terminal, après une troncature de 24 ou 45 acides aminés, la protéine est fusionnée à la protéine gag du virus. Du côté carboxy-terminal, une délétion de 104 pb, intervenue dans le provirus du FBJ-MSV, a introduit un changement de phase qui modifie les 48 derniers acides aminés. Quant à la partie carboxy-terminale du

FBR-MSV, elle résulte de la troncature des 98 derniers acides aminés et de l'addition de huit acides aminés codés par un autre locus (*fox*). La protéine du FBJ-MSV diffère en outre de la protéine cellulaire par cinq mutations ponctuelles faux-sens et celle du FBR-MSV contient deux délétions de 13 et 9 acides aminés. De façon fort étonnante, le gène *c-fos* dans sa version non mutée ne peut être transformant *in vitro* que si deux modifications sont introduites : d'une part, le promoteur doit être rendu constitutif et, d'autre part, soit la partie carboxy-terminale de la protéine, soit la partie 3' non codante de l'ARNm doivent être retirées [1-3].

Nous reviendrons plus loin sur cette observation qui suggère que la protéine normale est capable de transformer des cellules *in vitro* à la condition d'altérer la régulation de son expression. Si l'on met à part les ostéosarcomes, le proto-oncogène *c-fos* n'est que très rarement associé à des tumeurs humaines, ce qui laisse présumer là encore l'existence de nombreux verrous qui contrôlent l'expression de ce gène.

L'expression ectopique de *fos* dans des souris transgéniques n'a, tout

d'abord, curieusement pas conduit à l'apparition de tumeurs, mais principalement à des malformations osseuses comme le montre la *figure 2* [4]. Cependant, 15 % des animaux ont ensuite développé des tumeurs osseuses avec une latence dépassant les dix mois. Ces tumeurs font penser de façon troublante à celles qui compliquent parfois, chez l'homme, l'évolution de la maladie de Paget. E. Wagner a réanalysé ce phénomène en utilisant cette fois des cellules ES qui permettaient l'expression du transgène au cours de l'embryogenèse précoce : les souris qui naissent normales ont développé des tumeurs cartilagineuses avec une très grande fréquence [5]. Là encore, l'ablation de la région 3' non codante normale de l'ARN messager de *c-fos* est nécessaire à l'obtention de tumeurs !

### Fos : une phosphoprotéine nucléaire ubiquitaire

La protéine Fos est constituée de 380 acides aminés, se trouve localisée dans le noyau et subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, presque essentiellement des phosphorylations, qui sont, pour beaucoup, localisées dans la partie carboxy-terminale. Elle a une vitesse de renouvellement rapide, avec des durées de vie qui varient de 30 minutes pour la protéine cellulaire à quelques heures pour les formes virales [6], mais, bien que l'on trouve, comme dans de nombreuses protéines labiles, les fameuses séquences PEST\*, le rôle de ces dernières est loin d'être établi. Des résultats récents suggèrent l'intervention de protéases stimulées par le calcium comme les calpaïnes. Finalement, et comme nous le verrons plus loin, Fos peut s'associer à de nombreuses protéines.

Le gène *c-fos* appartient à la classe des gènes dits de réponse précoce. L'on entend en cela qu'il est parmi les premiers gènes qui s'expriment quand une cellule, placée préalablement en l'état G<sub>0</sub> (pratiquement : la cellule est rendue quiescente par culture en faible concentration de sérum pendant un temps suffisamment long pour que les cellules engagées dans le cycle cellulaire puissent terminer leur mitose), est stimulée par l'addition de

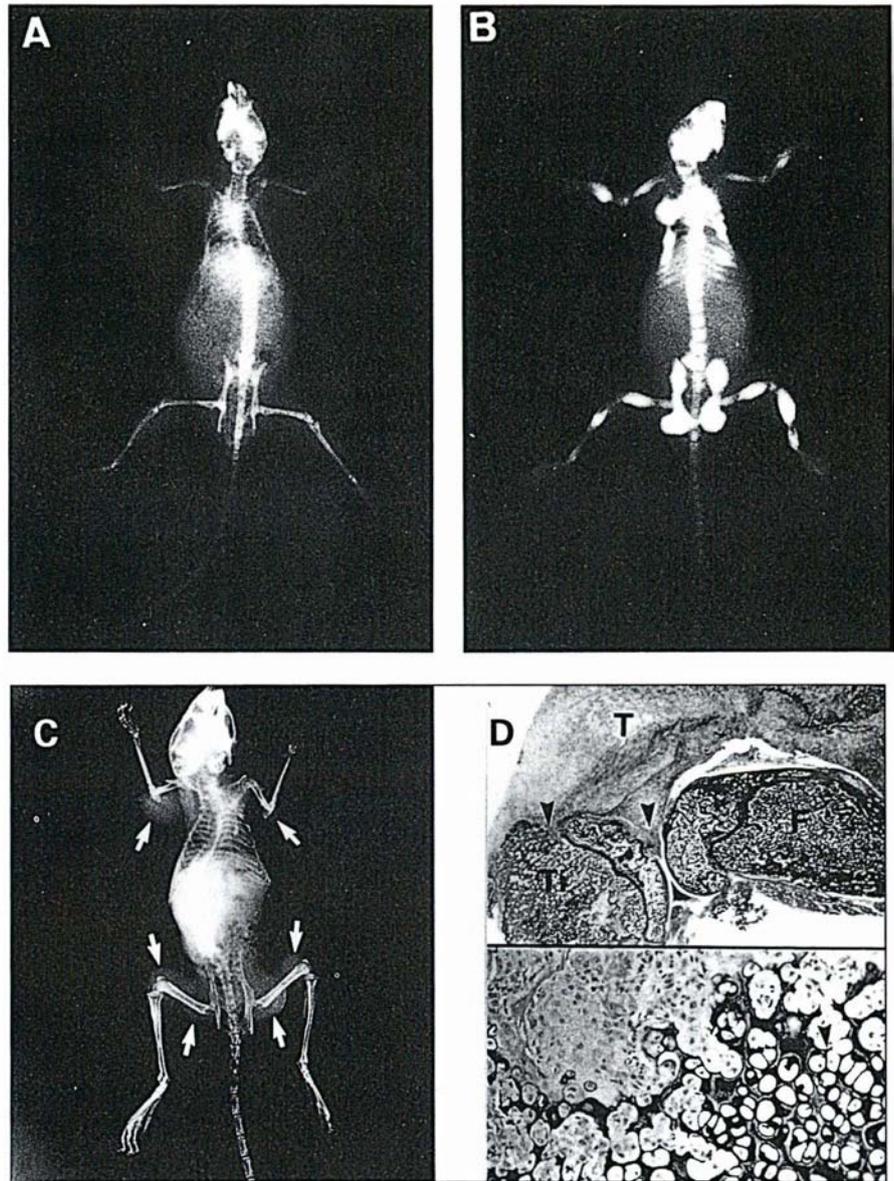


Figure 2. **Radiographies X de souris transgéniques qui expriment *c-fos* de façon constitutive.** Partie supérieure : souris présentant des malformations osseuses (B) après introduction d'un gène *c-fos* sous le contrôle du promoteur du gène métallothionéine IIa humain. Une souris témoin est montrée en (A). Partie inférieure. C : souris présentant de nombreuses tumeurs le long de l'épine dorsale et à presque toutes les articulations. D, haut, tumeur au niveau du genou (T : tumeur, Ti : tibia, F : fémur) ; bas : agrandissement au niveau de la tumeur montrant après coloration plusieurs chondrocytes différenciés (document donné par E. Wagner).

\* PEST : représentation utilisant le code à une lettre des acides aminés de la séquence peptidique, Proline-Glutamine-Sérine-Thréonine, que l'on retrouve fréquemment dans des protéines à *turn over* rapide et qui est rare dans les protéines stables. Pour certains auteurs, ce serait des signaux conditionnels de protéolyse [39].

sérum ou de facteurs de croissance isolés. De nombreuses études ont été ainsi conduites sur des lignées fibroblastiques comme, par exemple, la cellule NIH3T3, mais certaines cellules comme les lymphocytes sont naturellement en G<sub>0</sub>. L'induction est très rapide (souvent détectable dans les dix minutes qui suivent le *stimulus*), transitoire, de nature transcriptionnelle, et ne nécessite pas de néosynthèse protéique [1-3]. La production de l'ARNm et de la protéine est également transitoire, et l'on peut voir sur la *figure 3* ce qu'il en est de la protéine dans des cellules embryonnaires de rat.

Le gène s'exprime normalement chez les individus sains : l'expression de son ARN messager peut ainsi être détectée au tout début du développement embryonnaire de la souris, dans le placenta puis, plus tard, au niveau des zones de croissance des os fœtaux

et de la peau. A la naissance, le gène est exprimé à des degrés divers dans pratiquement tous les tissus avec un très fort niveau dans la peau et dans l'os [1]. Chez l'adulte, les cellules hématopoïétiques comme les macrophages, les granulocytes ou les mégacaryocytes l'expriment fortement à l'instar de la peau qui, à ce titre et de par sa surface, constitue un compartiment très important. Ce dernier aspect est illustré sur la *figure 4* où l'on a représenté une hybridation *in situ* réalisée sur une biopsie de peau humaine normale. De façon fort intéressante, les signaux ne semblent pas restreints à la couche basale proliférative mais débordent sur le compartiment des kératinocytes des couches les plus superficielles qui ont déjà entamé un processus de différenciation. Cela laisse présumer un rôle de *fos* dans le contrôle du programme de différenciation de ces cellules [7]. Fos

peut également être induit dans des tissus normaux qui ne l'expriment pas ou très faiblement. C'est le cas du foie en hypertrophie compensatrice qui voit s'exprimer de nombreuses fonctions liées à la prolifération. C'est également celui des lymphocytes qui, naturellement en G<sub>0</sub>, sont activés au cours de la réponse immunitaire.

Dans les trois cas cités plus haut d'une expression à un niveau élevé, apparemment constitutif, signalons toutefois que la mise en culture des cellules (cellules amniotiques, kératinocytes ou macrophages) voit s'éteindre progressivement l'expression de *fos* ! Ce dernier reste stimulant, ce qui suggère qu'il est maintenu actif *in vivo* grâce à des *stimuli* qui restent encore à définir.

Plus récemment, T. Curran et ses collaborateurs ont évalué l'expression de *fos in vivo* dans des souris transgé-

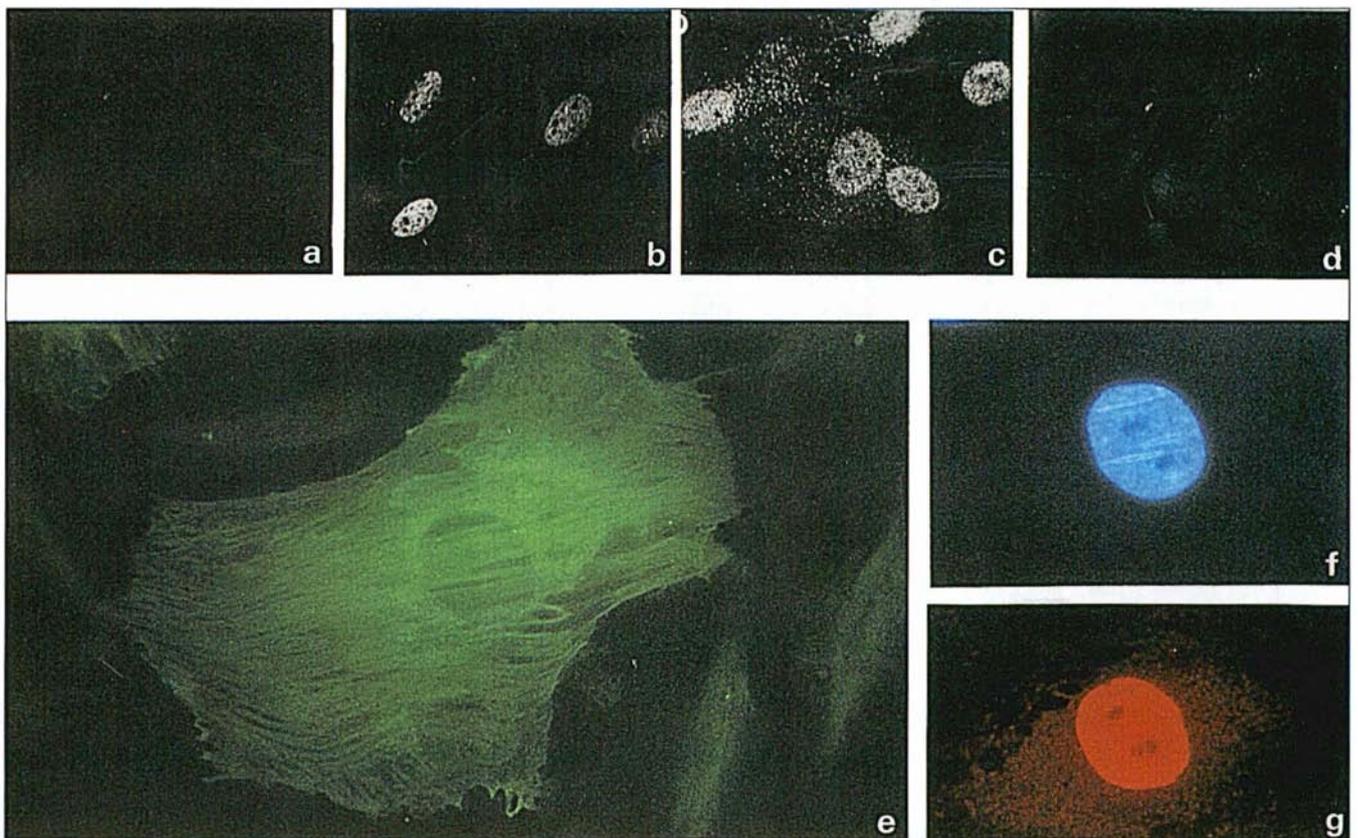


Figure 3. **Induction transitoire de la protéine c-Fos dans des cellules embryonnaires de rat (REF52) par le sérum après une carence de 24 heures et visualisée par immunofluorescence.** (a : 0 ; b : 45 min ; c : 90 min ; d : 120 min après addition du sérum). e : cellule révélée par micro-injection d'un anticorps marqué par la fluorescéine ; f : noyau de la même cellule marqué par le réactif de Hoecht ; g : protéine Fos révélée par un anticorps marqué par le rouge Texas.

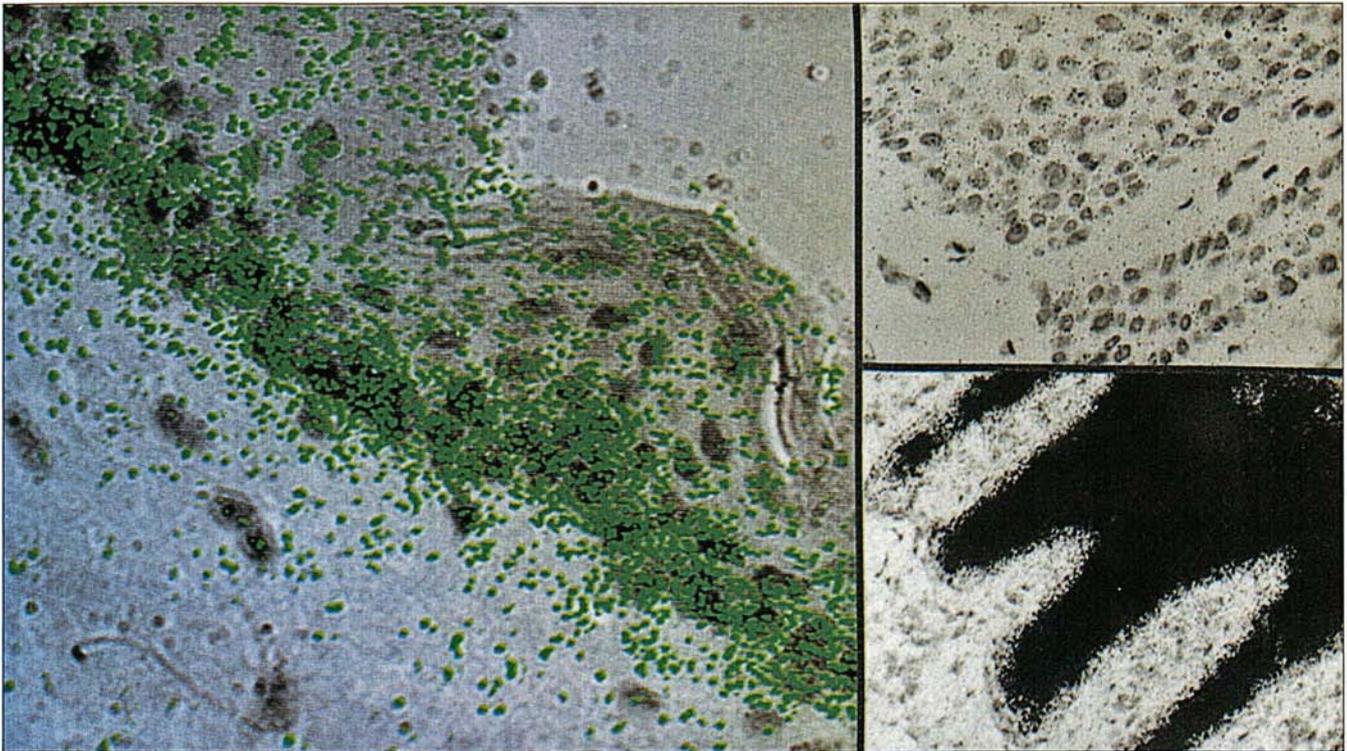


Figure 4. **Hybridation in situ réalisée avec une sonde c-fos sur une biopsie de peau humaine normale.** Les signaux (grains verts), accumulés au voisinage de la membrane basale, débordent largement dans la partie supérieure, non proliférative, de l'épiderme. La partie droite montre la réduction du signal observée dans une affection comme le psoriasis (haut), réduction qui ne met pas en cause l'intégrité des ARN comme le montre une hybridation réalisée sur la même biopsie avec une sonde kératine (bas) (document monté et donné par N. Basset-Seguin, fait référence au travail exposé dans [7] auquel J.M. Blanchard est associé).

niques au moyen d'une construction qui permet de suivre la protéine grâce à son couplage à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase révélée par une réaction colorée (figure 5). Outre les sites déjà décrits comme la peau ou les os, le système nerveux central (raphé, bulbes olfactifs, cortex, hippocampe) montre une expression de *fos*, et, dans le cas des noyaux suprachiasmatiques, cette dernière semble liée au nyctémère (figure 5) ! Des agents épiléptogènes comme l'acide kaïnique ou le penténylène tétrazole peuvent également y produire de très fortes inductions [8] de même que dans la glande corticosurrénale comme le montre la figure 5.

### **Fos est l'un des composants du facteur de transcription AP1**

La fonction de la protéine Fos, présente à la suite d'expériences de

transfection (la protéine virale est capable de transactiver le promoteur du gène du collagène  $\alpha 1$ (III), [9]), a été confirmée grâce à des travaux réalisés sur un autre proto-oncogène : *c-jun*. Le produit de ce dernier a en effet été identifié à une protéine de 39 kDa qui était fréquemment associée à Fos. L'on a pu montrer qu'il est l'un des composants du complexe transcriptionnel AP1, initialement caractérisé grâce à son interaction avec la séquence TGACTCA, présente dans le promoteur du virus SV40 [3, 10]. L'hétérodimère Fos-Jun est ainsi un facteur de transcription qui reconnaît une séquence présente dans de nombreux gènes dont l'expression est activée par les esters de phorbol. Fos seul ne se fixe pas à l'ADN de façon spécifique alors que Jun le peut sous forme d'un homodimère ; toutefois, l'hétérodimère Fos-Jun a une affinité considérablement supérieure à celle de

l'homodimère et les deux protéines contactent l'ADN, introduisant ainsi une asymétrie au niveau de l'interaction.

L'une des raisons invoquées, qui empêcheraient Fos de former des complexes à haute affinité avec la séquence TGACTCA, est son incapacité à dimériser. Les travaux de l'équipe de McKnight sur un autre facteur de transcription : C/EBP, ont fourni un modèle très élégant pour la formation des dimères Jun-Fos, qui est illustré sur la figure 6, p. 461. Les deux protéines interagissent de façon parallèle *via* une région en hélice  $\alpha$  avec une leucine (L dans le code à une lettre) qui revient chaque sept acides aminés. Les leucines sont alignées le long de la génératrice du cylindre auquel on peut assimiler l'hélice et se font face dans le dimère, ce qui a fait proposer le nom de « glissière à leucine » (*leucine zipper*) à ce type d'organisation [10]. Cepen-

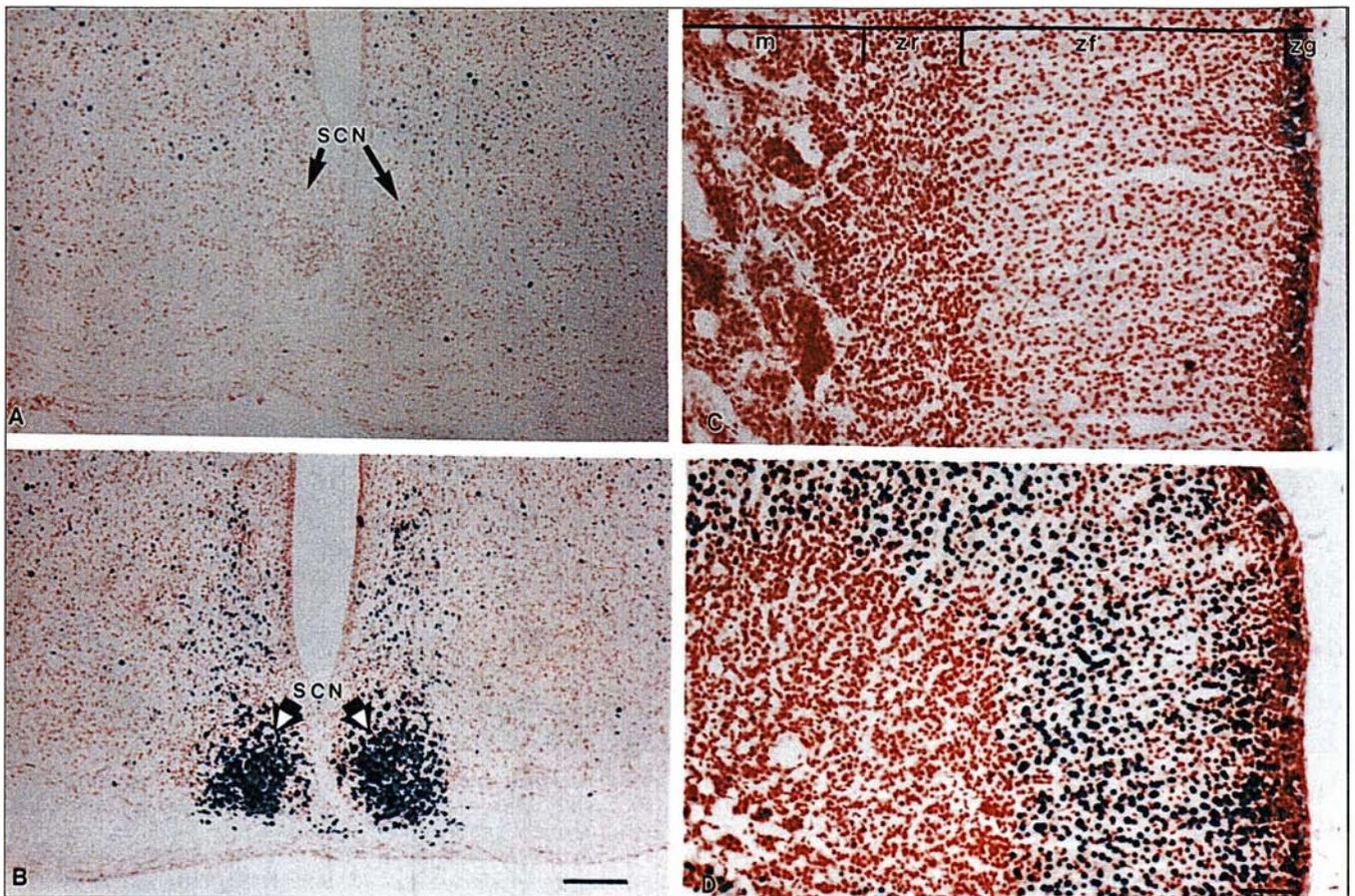


Figure 5. **Induction de c-fos dans l'hypothalamus (gauche) et les glandes surrénales (droite) visualisée dans une souris transgénique où c-fos a été fusionné à la  $\beta$ -galactosidase.** La protéine accumulée quand l'animal est gardé à l'obscurité (A) ou après avoir été transféré à la lumière au bout de 4 heures (B), est détectée au moyen d'une réaction colorée. La coloration peut également être visualisée dans le cortex de la glande surrénale après un embrassement provoqué par le penténylène tétrazole (D). Le contrôle avant traitement est illustré en (C). m : medulla ; zr : zona reticularis ; zf : zona fasciculata ; zg : zona glomerulosa. Les traits horizontaux représentent respectivement 130  $\mu$ m (A, B) et 60  $\mu$ m (C, D) (document donné par T. Curran, relatif à un travail publié dans [8]).

dant, il n'y a vraisemblablement pas d'interdigitation des leucines et les deux hélices s'enroulent l'une autour de l'autre comme une tresse (*coiled coil*). La présence d'acides aminés chargés au voisinage de la zone d'interaction dans Fos empêcherait cette dernière de former des homodimères qui ne sont stables qu'à pH très acide. Le remplacement ponctuel des leucines par d'autres acides aminés hydrophobes est toléré, ce qui n'est pas le cas du remplacement de toutes les leucines.

Les mutations qui touchent à la région ci-dessus et qui empêchent la dimérisation diminuent la fixation à la cible et, en conséquence, l'activa-

tion transcriptionnelle associée. Une autre région, adjacente à la précédente, est également nécessaire pour la fixation à l'ADN : c'est la région basique, riche en acides aminés comme la lysine ou l'arginine. Elle contient également une série d'alanines qui sont absolument requises pour une interaction forte avec l'ADN mais qui influencent également la dimérisation. Également essentielle, la cystéine qui précède ces alanines est conservée (*figure 7, p. 462*), et son état de réduction, dont dépend l'affinité du dimère pour l'ADN, semble contrôlé par une protéine ubiquitaire dont l'ADNc vient tout juste d'être isolé [11].

Kerppola et Curran ont très récem-

ment montré que Fos et Jun induisent, en se fixant à l'ADN, une courbure dont l'orientation dépend de la nature du dimère comme cela est représenté sur la *figure 8, p. 463* [12]. Cette observation très intéressante montre comment des protéines régulatrices différentes, qui reconnaissent la même séquence, peuvent introduire des changements subtils dans la structure d'un complexe d'initiation. Cet effet variera aussi en fonction du contexte dans lequel est placée la séquence reconnue, ce qui pourrait en partie expliquer que les mêmes protéines puissent se comporter tantôt comme des activateurs, tantôt comme des répresseurs.

Cette polyvalence du complexe AP1

est accrue par la possibilité qu'a Fos, tout comme Jun, d'être phosphorylée *in vitro* sur des sérines et des thréonines par de nombreuses kinases. Ces phosphorylations sont concentrées dans deux régions [6, 13] qui modulent l'activité transcriptionnelle de Fos *in vitro* mais n'affectent pas sa fixation à l'ADN (figure 9, p. 463). La situation *in vivo* est très complexe, comme l'atteste l'hétérogénéité des phosphopeptides obtenus, et la signification précise de ces phosphorylations reste encore à établir. Par ailleurs, si la signification de la phosphorylation par p34<sup>cdc2</sup>, qui est censée agir plutôt au cours de la transition G2/M du cycle cellulaire, n'est pas claire, elle peut toutefois suggérer un contrôle par la toute nouvelle kinase homologue : cdk2/egl qui, elle, agirait en G<sub>1</sub> (*m/s* n° 4, vol. 8, p. 326).

### De nombreux partenaires et des talents variés

L'interaction du complexe AP1 avec sa cible semble également contrôlée par des effecteurs négatifs qui pourraient régler non seulement son affinité pour l'ADN, mais aussi, peut-être, sa localisation cellulaire. Dans le premier cas, J. Auwerx et P. Sassone-Corsi ont décrit un inhibiteur ubiquitaire labile, présent dans le cytoplasme comme dans le noyau, et dont l'activité serait elle-même réprimée par la protéine kinase activée par l'AMP cyclique (PKA) [14]. Le mode d'action de cet inhibiteur (IP1) proposé par ces auteurs est schématisé sur la figure 10, p. 463. Quant à la deuxième éventualité, elle a été proposée par notre groupe à la suite d'observations réalisées sur des cellules qui expriment Fos de façon constitutive [15]. Il semblerait, en effet, que la localisation nucléaire de Fos, telle qu'on l'observe après stimulation de son gène, ne soit pas automatique. Après quelques heures passées en l'absence de sérum, les cellules l'expriment dans le cytoplasme et sa localisation nucléaire est rapidement rétablie par tout traitement qui augmente la concentration en AMP cyclique (figure 10). De façon fort intéressante, les protéines virales échappent à ce phénomène et sont localisées dans le noyau quelles que soient les conditions. Là égale-

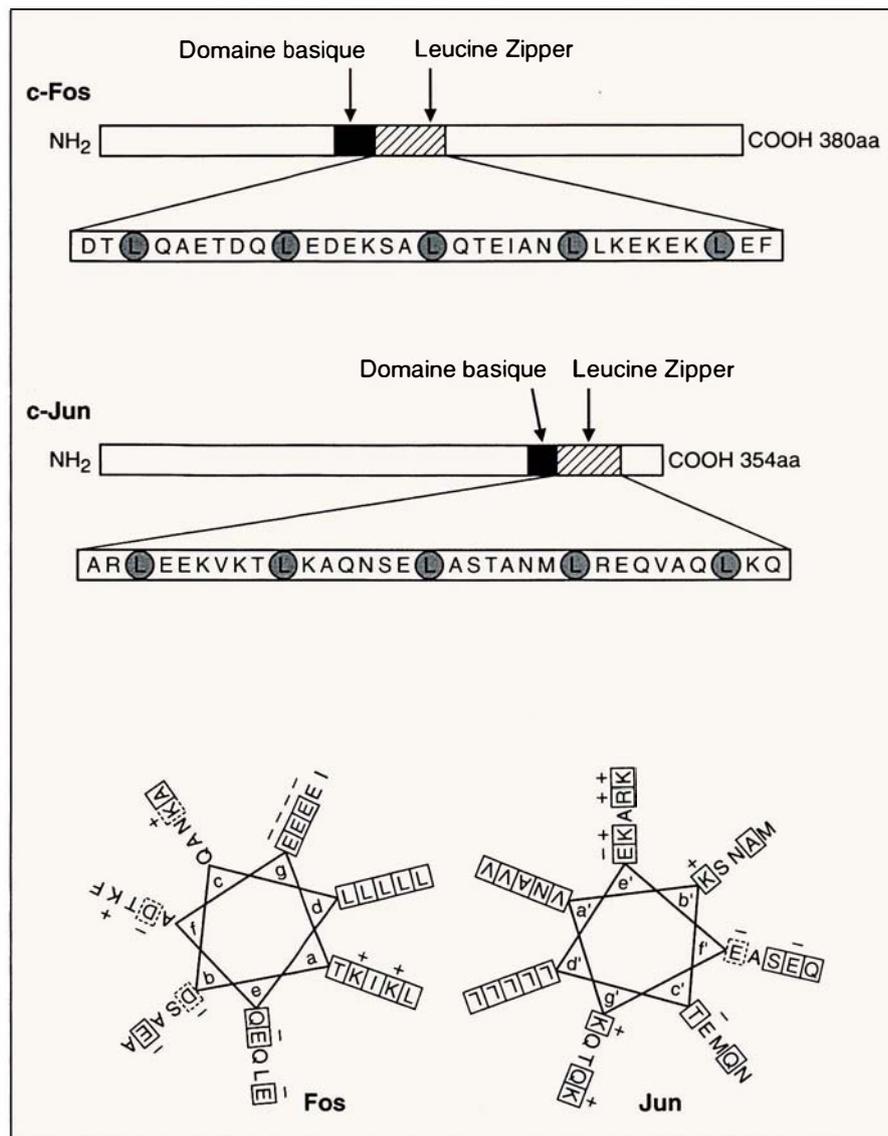


Figure 6. **Structure des protéines Fos et Jun.** Partie supérieure : les régions impliquées dans la formation du dimère (leucine zipper) et de l'interaction avec l'ADN (région basique) sont indiquées en gris. La région correspondant au leucine zipper est représentée dans le code à une lettre. Partie inférieure : représentation schématique des régions en interaction. Les hélices sont vues suivant leur axe à partir de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale des leucine zippers : les acides aminés empilés les uns au-dessus des autres sont regroupés et encadrés quand ils sont conservés dans les familles Fos et Jun (figure 8) ; les pointillés représentent des changements conservatifs.

	Domaine basique	Leucine zipper
Fos	LSPEEEKRRIRRRERNKMAAAK	RRRRRELTDTRQAETDQTEDEKSAQTQTEIANLKEKEKEFEFILAAH
Fra 1	LSPEEEERRRVRRRERNKLAALK	RRRRKELTDFRQAETDKTEDEKSGQREIEEIQKQKERLELVLEAH
Fos B (Fra 3)	LTPEEEKRRRVRRRERNKLAALK	RRRRRELTDTRQAETDQTEEEKAEFESEIAEIQKEKERLEFVLVAH
Jun	PPLSPIDMFSQERIKAEKRRMRNRIAASK	RRKRKLERIAFEEKVKTKAQNSFEASTANKREQVAQKQKVMNH
Jun B	PPVSPINMEDQERIKVERKRLRNRLAATK	RRKRKLERIAFEDKVKTKAENAGFSSAAGLREQVAQKQKVMTH
Jun D	PPLSPIDMDTQERIKAEKRLRNRIAASK	RRKRKLERISFEEKVKTKKSQNTFEASTASLREQVAQKQKVLSH

Figure 7. **Similarité au sein des séquences dans la région du leucine zipper des divers membres des familles Fos et Jun.** En rouge, la cystéine dont l'état de réduction est essentiel à la fixation du dimère sur l'ADN. Fra : Fos-related antigen.

ment, un inhibiteur à durée de vie courte serait impliqué. S'agit-il de deux voies parallèles, ou bien faut-il y voir des facettes différentes d'un même phénomène ?

Autre niveau de complexité : le gène *c-fos* appartient à une famille multigénique, et plusieurs membres très voisins ont été décrits chez l'homme, la souris, le rat ou le poulet [10, 16]. Les protéines présentent une grande similitude (70-80 %), localisée principalement dans la région centrale qui est responsable de l'interaction avec l'ADN et de la dimérisation (figure 7). Comme la même situation prévaut pour *c-jun* où trois gènes ont à l'heure actuelle été caractérisés (*c-jun*, *junB* et *junD*), nous avons là une combinaison alléchante puisque chaque membre d'un groupe peut former un hétérodimère avec l'un des membres de l'autre groupe [16]. Signalons la venue récente d'une petite dernière dans la famille Fos :  $\Delta$ FosB ou Fos/SF (pour *short form*) dont l'ARNm serait engendré par un épissage alternatif du gène *fosB* qui, en supprimant 140 pb de l'exon 4, introduit un codon stop : la protéine résultante est tronquée dans sa partie carboxy-terminale (figure 11, p. 464, [17]).

La conséquence de tout cela est que l'on retrouve Fos, ou l'un de ses acolytes, dans des complexes qui interagissent avec les régions régulatrices présomptives de nombreux gènes, pouvant y exercer des actions, soit positives (collagénase, kératine, gènes

de classe II du CMH, ovalbumine...), soit négatives (marqueur précoce de différenciation adipocytaire aP2, *c-myc*, ostéocalcine...), soit les deux comme pour la stromélysine dont le cas est schématisé sur la figure 12, p. 464. La régulation de l'expression de cette métalloprotéase matricielle illustre parfaitement la difficulté de généraliser les résultats obtenus sur une seule lignée cellulaire [18]. Ainsi, le même effecteur, l'EGF, induit la stromélysine par des voies différentes dans les cellules NIH3T3 et Rat-1. De plus, deux effecteurs antagonistes comme l'EGF et le TGF $\beta$  utilisent tous deux Fos ! De façon surprenante, les deux éléments stimulateurs TIE (*TGF $\beta$  inhibitory element*) et AP1 peuvent être échangés dans des réactions de compétition au niveau des retards sur gel\*, mais le lien qui relie *in vivo* ces deux éléments de réponse antagonistes n'est pas encore clair, d'autant que, pour compliquer les choses, la même région contient aussi un élément de réponse aux oncoprotéines de la famille *ets*. En effet, ces derniers peuvent, dans certains cas, agir en synergie avec Fos et Jun [19] et, par conséquent, amplifier considérablement l'effet du complexe AP1. Cette situation semble être commune à plusieurs gènes codant pour des protéa-

\* Test de retard sur gel : étude des interactions entre une (ou des) protéine(s) et des fragments d'ADN grâce au retardement ainsi induit de la migration de la cible d'ADN marquée par un isotope radioactif.

ses et également à d'autres gènes comme, par exemple, les gènes précoces du virus du polyome ou, comme nous allons le voir, pour *c-fos* lui-même.

### Un réseau très complexe de régulation

Cette dernière observation révèle la possibilité d'interactions multiples impliquant des éléments qui intègrent au niveau transcriptionnel des stimuli appartenant à des voies très différentes (*cross talk*). Les récepteurs hormonaux offrent un autre exemple de cette situation. Les récepteurs des glucocorticoïdes (GR, [20]), de l'acide rétinoïque (RA-R, [21]) ou de l'hormone thyroïdienne (TR, [m/s n° 2, vol 8, p. 156] [22]) inhibent la fixation du complexe AP1 à sa cible et réciproquement. Il s'agit vraisemblablement d'interactions directes entre ces différentes protéines qui conduisent à des complexes inactifs comme le montre la figure 13, p. 465 pour le récepteur des glucocorticoïdes. Nous avons là quelque lumière sur l'action de ces derniers dans les processus inflammatoires où, précisément, les protéases évoquées plus haut sont impliquées dans la destruction de la matrice extracellulaire. Ce dernier exemple est également très illustratif des conséquences introduites par la combinaison Fos-Jun : bien que Fos et Fos B soient très voisines en structure et en action, cette dernière échappe à la répression par le GR

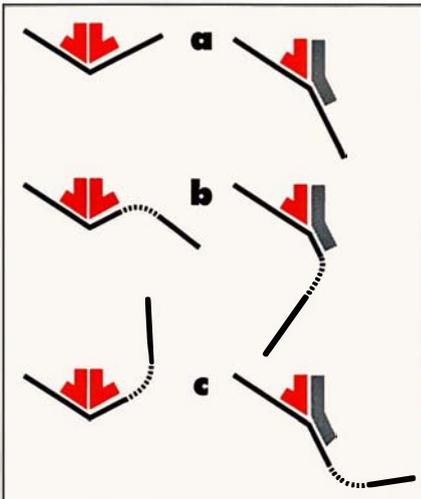


Figure 8. **La fixation des dimères Fos-Jun et Jun-Jun plie l'ADN en sens inverse.** **a** : fixation des dimères sur un fragment d'ADN qui contient la séquence canonique TGACTCA. **b** : une séquence connue pour introduire de façon intrinsèque un coude dans l'ADN (très riche en A/T ; représentée en pointillé) est introduite à 21 pb du centre du site AP1. **c** : la même séquence est maintenant distante de 26 pb. A gauche, fixation des dimères Jun-Jun, et à droite, fixation des dimères Fos-Jun.

parce qu'elle diffère de Fos dans sa partie amino-terminale ! En effet, ce sont les acides aminés 41 à 111 de Fos qui sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur. Signalons à ce propos que  $\Delta$ Fos B fonctionne vraisemblablement comme un répresseur des autres membres de la famille et introduit ainsi un autre verrou potentiel.

L'antagonisme observé entre les récepteurs ci-dessus et le complexe AP1 jette également un nouvel éclairage sur l'opposition souvent constatée entre prolifération et différenciation. Dans le cas de la collagénase et de la stromélysine, ces récepteurs ont un effet clairement inhibiteur. Il en est de même pour l'ostéocalcine qui est l'exemple sur lequel nous fermons ce chapitre [23], à cause de l'implication de Fos dans les tumeurs osseuses murines, qu'elles soient d'origine rétrovirale ou artificielle. L'ostéocalcine est une protéine de minéralisation des os en formation, produite par les ostéoblastes mûrs qui ne prolifèrent plus. Le gène de cette

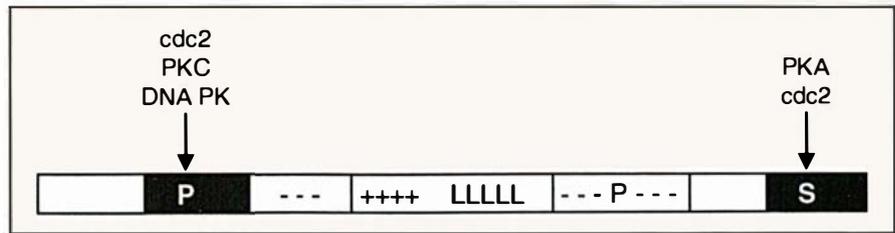


Figure 9. **Phosphorylation de la protéine Fos observée in vitro avec des kinases purifiées.** Les deux domaines représentés en noir exercent une action négative sur la transcription in vitro ; le domaine aminoterminal (aa 58 à 116) est riche en prolines et le domaine carboxyterminal (aa 321 à 380) riche en sérines. Ce dernier est indispensable à l'autorépression. Au centre : + + + + LLLLL représente le domaine basique suivi du leucine zipper (aa 139 à 211), structures encadrées par des domaines riches en acides aminés acides (---) et en prolines (P), supports de l'activation transcriptionnelle observée in vitro. Les diverses kinases utilisées sont représentées au-dessus ; « DNA PK » est une kinase nucléaire décrite récemment et capable de phosphoryler hsp90, p 53, Ku ou Sp1 après activation par de l'ADN. PKC : protéine kinase C ; PKA : protéine kinase stimulée par l'AMP cyclique ; cdc2 = p34<sup>cd2</sup>. Ku est un auto-antigène nucléaire dont la fonction est encore inconnue.

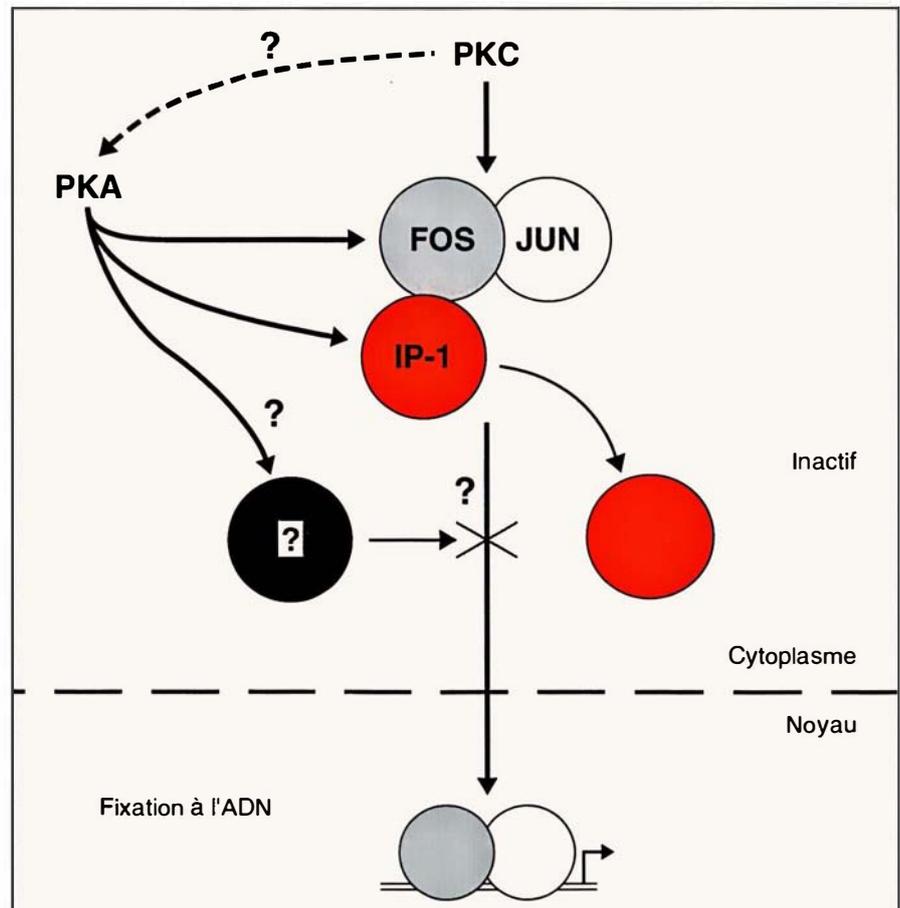


Figure 10. **Contrôle hypothétique du complexe AP1 par des inhibiteurs cytoplasmiques.** En rouge : inhibiteur IP1 proposé par J. Auwerx et P. Sassone-Corsi [14] ; en noir : inhibiteur proposé par P. Roux et al. PKC : protéine kinase C (activée par le diacyl glycérol), PKA : protéine kinase A (activée par l'AMP cyclique). IP1 serait un inhibiteur de la fixation de AP1 à l'ADN et son action serait inhibée par la PKA. Les pointillés indiquent la possibilité d'interactions réciproques entre PKA et PKC (localisation nucléaire ?). Quant à l'inhibiteur proposé par notre équipe, il interviendrait indirectement sur le transport nucléocytoplasmique en provoquant la rétention de la protéine dans le cytoplasme.

## RÉFÉRENCES

- Müller R. Cellular and viral fos genes : structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. *Biochim Biophys Acta* 1986 ; 823 : 207-25.
- Marx JL. The fos gene as « master switch ». *Science* 1987 ; 237 : 854-6.
- Curran T. The fos oncogene. In : Reddy EP, Shalka AM, Curran T, eds. *The Oncogene Handbook*. Amsterdam : Elsevier Science Publishers BV, 1988 : 307-554.
- Rüther U, Garber C, Komitowski D, Müller R, Wagner EF. Deregulated fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* 1987 ; 325 : 412-6.
- Wang ZQ, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Wagner EF. A novel target cell for c-fos induced oncogenesis : development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *EMBO J* 1991 ; 10 : 2437-50.
- Barber JR, Verma IM. Modification of fos proteins : phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by TPA and serum. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 2201-11.
- Basset-Seguin N, Escort C, Molés JP, Blanchard JM, Kerai C, Guilhou JJ. c-fos and c-jun proto-oncogenes expression is decreased in psoriasis : an *in situ* quantitative analysis. *J Invest Dermatol* 1991 ; 97 : 672-8.
- Smeyne RJ, Schilling K, Robertson L, Luk D, Oberdick J, Curran T, Morgan JI. Fos-lacZ transgenic mice : mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* 1992 ; 8 : 13-23.
- Setoyama C, Frunzio R, Liao G, Mudryj M, De Crombrughe B. Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 3213-7.
- Busch S, Sassone-Corsi P. Dimers, leucine zippers and DNA binding domains. *Trends Genet* 1990 ; 6 : 36-40.
- Abate C, Patel L, Rauscher FJ III, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA binding activity *in vitro*. *Science* 1990 ; 249 : 1157-61.
- Kerppola TK, Curran T. Fos and jun heterodimers bend DNA in opposite orientations : implications for transcription factor cooperativity. *Cell* 1991 ; 66 : 317-26.
- Abate C, Marshak DR, Curran T. Fos is phosphorylated by p 24<sup>cdc2</sup>, cAMP dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* 1991 ; 6 : 2179-85..
- Auwerx J, Sassone-Corsi P. IP-1 : a dominant inhibitor of fos/jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* 1991 ; 64 : 983-93.

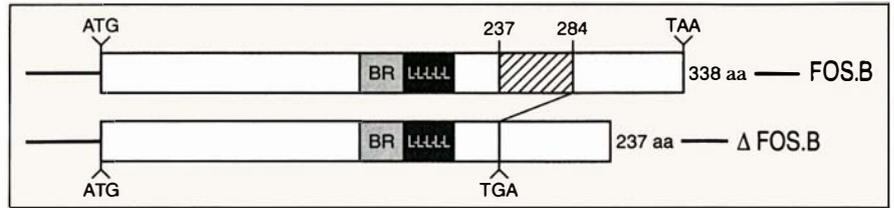


Figure 11. **Structure comparée des ADNc de Fos et ΔFos B montrant comment, à partir d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 4, un codon stop est introduit et conduit à une forme naturellement tronquée de Fos B.**

dernière contient, en amont de son promoteur, plusieurs éléments dont l'un, centré sur une boîte CCAAT (figure 14), est responsable de l'activité de base spécifique de tissu, et l'autre rend compte de l'inductibilité du gène par les vitamines A ou D3. Ce dernier élément peut également fixer le complexe AP1. Finalement, la boîte TATAAAA est, elle aussi, enchâssée dans un élément de réponse aux glucocorticoïdes (*m/s n° 10, vol. 6, p. 1003*) !

Ce mécanisme subtil de compétition pour les mêmes sites va conduire à une modulation fine du niveau de l'expression de l'ostéocalcine. Quant à l'exclusion du facteur TFIID par la fixation du récepteur des glucocorticoïdes, si elle rend compte de l'effet connu de ces derniers sur la croissance osseuse, elle n'a pas encore été analysée en termes d'interaction réciproque avec la fixation plus en amont du facteur AP1.

Pour conclure, bien que Fos seul ne

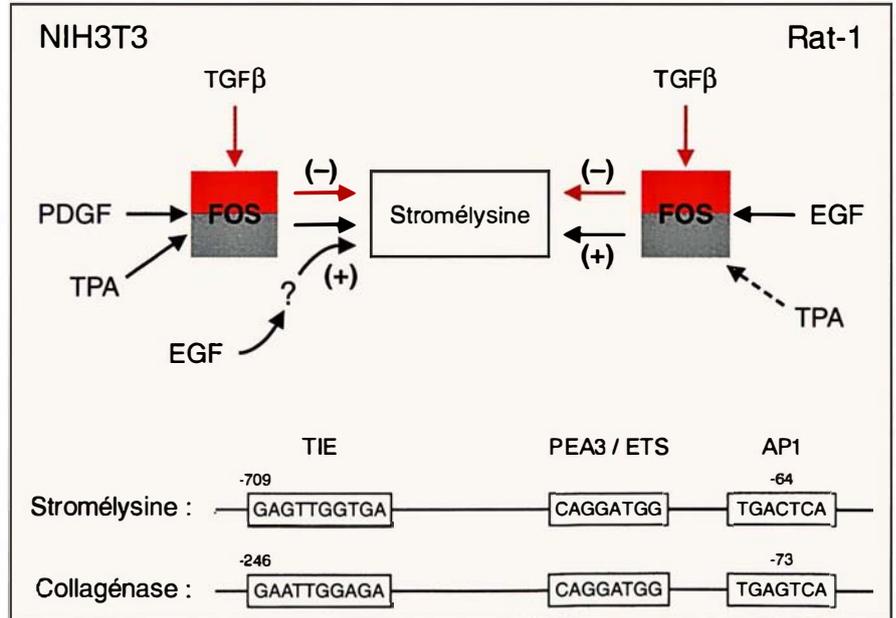


Figure 12. **Régulation comparée de l'expression de la stromélysine dans deux lignées cellulaires différentes. Fos ou une protéine apparentée serait un relais nécessaire pour les divers effecteurs indiqués, sauf dans NIH3T3 où l'EGF utiliserait une voie qui ne fait pas appel à Fos. Le TPA est sans effet sur Rat-1 (pointillés). Les voies positives sont représentées par des flèches noires et les voies négatives par des flèches rouges. Les séquences impliquées dans les promoteurs des gènes codant pour la stromélysine et la collagénase sont représentées en dessous. TIE : TGFβ inhibitory element ; PEA3/ETS : élément de fixation du produit du proto-oncogène c-ets.**

puisse pas interagir de façon spécifique avec l'ADN, la faculté qu'a cette protéine d'interagir avec de nombreuses autres protéines, en font un « commutateur » universel. La richesse des possibilités est accrue par l'existence d'une combinatoire au sein des familles Fos et Jun, combinatoire qui peut être modulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles autant que par la capacité qu'a Jun lui-même d'interagir avec les membres de sa propre famille ou d'autres familles comme CREB/ATF.

Nous avons peut-être là les prémices d'une « thérapie moléculaire » à visée antiproliférative ; en effet, toute substance mimétique pour le *leucine zipper* pourra bloquer l'action de Fos ou de Jun. Plusieurs constructions de mutants négatifs transdominants\* ont déjà été décrites.

Signalons finalement que, du fait que des nombreuses situations analysées ci-dessus, beaucoup l'ont été *in vitro* et souvent avec des séquences canoniques (comme le site AP1 du gène de la somatostatine), elles restent encore spéculatives et attendent leur démonstration sur l'animal.

### Le SRE : un activateur transcriptionnel modulaire et versatile

*c-fos* constitue un modèle d'étude des phénomènes immédiats associés à la transmission des signaux, qu'ils soient mitogènes ou liés à la formation de la mémoire. C'est aussi un modèle d'analyse des relations qui existent entre gènes de réponse primaire et mise en place du programme de division cellulaire ; en effet, plusieurs travaux, utilisant soit des approches anti-sens ARN, ADNc ou oligonucléotides, soit la micro-injection d'anticorps, ont suggéré l'implication de Fos dans le contrôle de l'entrée en phase S. Cependant, le groupe de R. Bravo a réévalué ce dernier point grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de chaque membre de la famille Fos : seule la neutralisation de tous les membres bloque efficacement

\* Protéine mutante transdominante : protéine mutée capable d'inactiver les fonctions de la protéine correspondante normale, en formant avec elle des complexes inactifs ou en se fixant de façon compétitive à ses cibles.

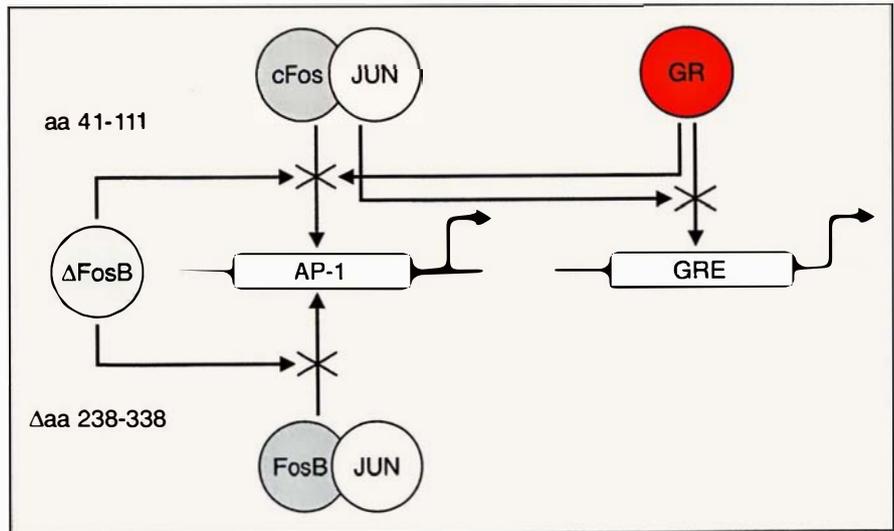


Figure 13. **Inhibitions réciproques entre AP1 et le récepteur des glucocorticoïdes.** Modulation hypothétique de ces effets par Fos B et ΔFos B. Les acides aminés 41 à 111 qui diffèrent entre c-Fos et Fos B sont responsables de l'interaction avec le récepteur des glucocorticoïdes (GR). Fos B et ΔFos B diffèrent par la partie carboxyterminale (aa 238 à 338), absente dans ΔFos B. Le (X) indique une inhibition réciproque.

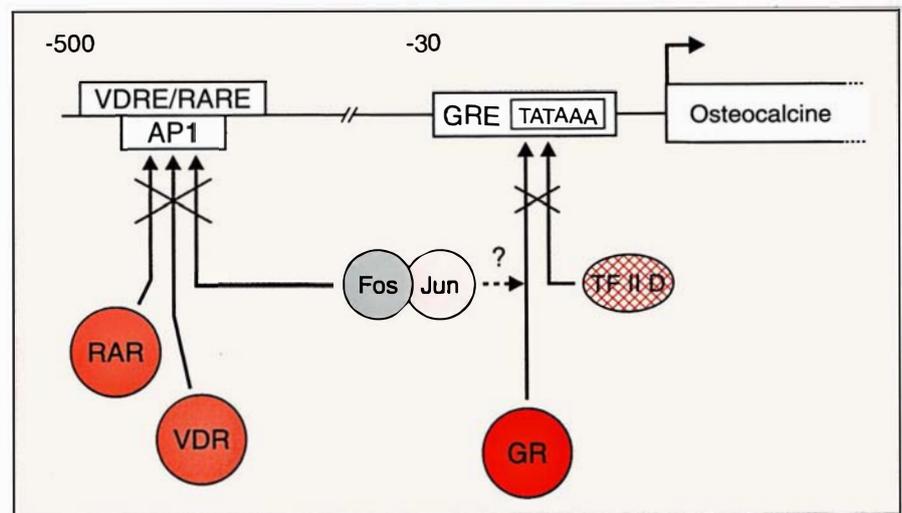


Figure 14. **Interactions exclusives faisant intervenir AP1 et plusieurs récepteurs nucléaires au niveau du promoteur du gène codant pour l'ostéocalcine.** Les récepteurs de l'acide rétinoïque (RA-R) et de la vitamine D3 (VD-R) reconnaissent le même élément (VDRE/RARE) qui contient également un site AP1. Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) peut se fixer sur un site (GRE) qui contient également la TATA box. Le (X) indique une inhibition réciproque.

## RÉFÉRENCES

15. Roux P, Blanchard JM, Fernandez A, Lamb N, Jeanteur Ph, Piechaczyk M. Nuclear localization of *c-fos*, but not *v-fos* proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell* 1990 ; 63 : 341-51.
  16. Abate C, Curran T. Encounters with *fos* and *jun* on the road to AP1. *Semin Cancer Biol* 1990 ; 1 : 19-26.
  17. Nakabeppu Y, Nathans D. A naturally occurring truncated form of *fos* B that inhibits *fos/jun* transcriptional activity. *Cell* 1991 ; 64 : 751-9.
  18. Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM. TGF- $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a *fos* binding sequence. *Cell* 1990 ; 61 : 267-78.
  19. Wasylyk B, Wasylyk CW, Flores P, Begue A, LePrince D, Stehelin D. The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with *c-fos* and *c-jun* for transcriptional activation. *Nature* 1990 ; 346 : 191-3.
  20. Lucibello FC, Slater EP, Jooss KU, Beato M, Müller R. Mutual transrepression of *fos* and the glucocorticoid receptor : involvement of a functional domain in *fos* which is absent in *fos* B. *EMBO J* 1990 ; 9 : 2827-34.
  21. Schüle R, Rangarajan P, Yang N, et al. Retinoic acid is a negative regulator of AP1 responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 6092-6.
  22. Zhang XK, Wills KN, Husmann M, Hermann T, Pfahl M. Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with *jun* and *fos* oncogene activities. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 6016-25.
  23. Schüle R, Umersono K, Mangelsdorf DJ, Bolado J, Pike JW, Evans RM. *Jun*-*fos* and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* 1990 ; 61 : 497-504.
  24. Kovary K, Bravo R. The *jun* and *fos* protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 4466-72.
  25. Rivera VM, Greeberg ME. Growth factor induced gene expression : the ups and downs of *c-fos* regulation. *The New Biologist* 1990 ; 2 : 751-8.
  26. Treisman R. The SRE : a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin Cancer Biol* 1990 ; 1 : 47-58.
- l'entrée en phase S [24] ! C'est finalement un modèle remarquable d'étude de la régulation génique comme nous allons l'illustrer dans les lignes qui suivent [25].
- Tout d'abord, de nombreux inducteurs sont capables d'activer la transcription de *c-fos* et la dissection de son promoteur révèle la présence de plusieurs éléments dont les plus caractéristiques sont représentés sur la figure 15. Leur contribution respective va dépendre du *stimulus* et du type cellulaire. Le SRE (*serum response element*) constitue toutefois un élément central [26] : c'est une région pseudosymétrique (certains auteurs lui donnent également le nom de DSE, pour *dyad symmetry element*) qui contient la séquence : CC(A/T)<sub>6</sub>GG que l'on retrouve dans les promoteurs d'autres gènes induits par le sérum mais aussi dans certains gènes exprimés au cours de la mise en place du programme de différenciation musculaire (où elle a été également baptisée « CArgG box »). Cette séquence est suffisante pour conférer l'inductibilité par le sérum à tout autre promoteur minimal qui lui est accolé. Suivant le type cellulaire, et surtout l'état de transformation, elle va également permettre au gène de répondre aux esters de phorbol (qui servent à induire artificiellement la protéine kinase C), à certains facteurs de croissance (PDGF, EGF...), aux formes activées de nombreux oncogènes à expression cytoplasmique (*ras*, *src*, *mos*, *raf*), ou même à l'AMP cyclique. Cette grande diversité est due en partie à la structure modulaire du SRE et de l'élément « AP1 » (FAP) vicinal : de nombreuses protéines vont interagir au niveau de cette région, ce qui explique qu'elle soit toujours sous forme complexée *in vivo* [27]. Ainsi, alors qu'aucun des éléments *ets*, « CArG » ou « FAP » séparés ne fonctionne dans la cellule tumorale HeLa, l'élément « CArG » est suffisant pour relayer l'effet de l'oncogène *Ha-ras* dans la cellule NIH3T3. Pour restaurer cet effet dans la cellule HeLa, l'adjonction de l'élément *ets* est absolument nécessaire [28]. Cette observation est renforcée par le fait, d'une part, que SRF (*serum response element binding factor*) est un transactivateur puissant dans les cellules NIH3T3 mais non chez HeLa et, d'autre part, qu'un oligonucléotide SRE est suffisant pour bloquer l'action de *Ha-ras* quand ils sont micro-injectés ensemble dans la cellule REF52 (*rat embryo fibroblasts*). Le SRE semble donc un médiateur privilégié de *ras* dans les cellules non transformées (telles NIH3T3 et REF52). Quant à l'élément « FAP », il semble constitutivement activé dans les cellules HeLa et confère l'inductibilité par l'AMP cyclique dans les cellules neuronales PC12\* et fibroblastiques NIH3T3, mais seulement quand cette dernière est transformée par l'oncogène *v-raf* !
- Pour compliquer le tout, il semblerait que la moitié droite du SRE puisse fixer, au moins dans PC12, une protéine qui appartient à la famille de C/EBP et qui été caractérisée initialement comme médiatrice des effets de l'IL-1 et de l'IL-6 sur le gène de l'IL-6. Cette protéine, baptisée NFIL-6 ou LAP (*nuclear factor IL6 or liver-specific activating protein*), se fixe de façon exclusive sur le SRE après stimulation de la PKA, stimulation qui a pour effet de provoquer la translocation de NFIL-6 du cytoplasme vers le noyau [29]. Ce facteur pourrait également utiliser la séquence « FAP », ce qui expliquerait le comportement décrit plus haut de cette dernière suivant le contexte cellulaire : la protéine serait constitutivement nucléaire dans les cellules transformées. Possédant en outre un *leucine zipper*, elle interagit vraisemblablement avec d'autres protéines...
- Le SRF joue le rôle d'organisateur qui va permettre l'assemblage correct des protéines requises pour la formation du complexe de pré-initiation, *via* une interaction probable avec le facteur général TFIID. Certaines protéines sont d'ores et déjà connues pour ne se fixer qu'en présence de SRF [25, 26] : c'est le cas de P62<sup>TCF</sup>/Elk-1, qui appartient à la famille des gènes *c-ets* et dont R. Treisman vient de cloner plusieurs ADNc chez la levure au moyen d'un crible fort ingénieux. En outre, SRF est un très bon substrat de la caséine

\* Cellules PC12 : dérivées d'une tumeur de la médullo-surrénale de rat. En présence de NGF, elles se différencient en neurones sympathiques alors que, en présence de glucocorticoïdes, elles se différencient en cellules chromaffines de la médullosurrénale.

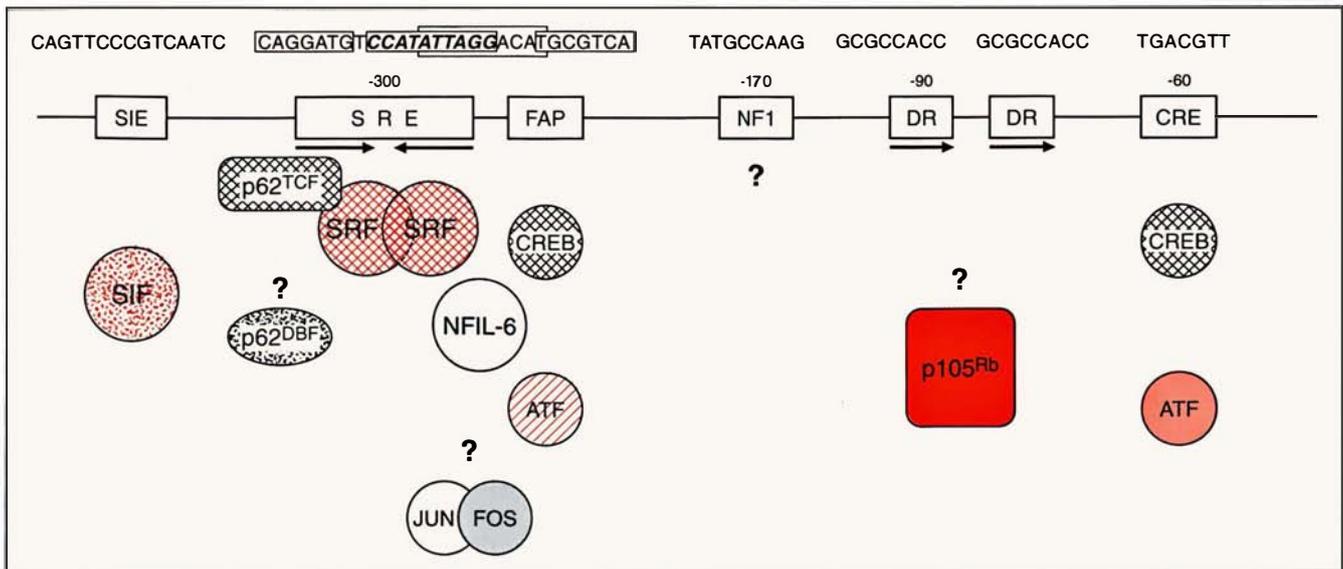


Figure 15. **Structure du promoteur du gène *c-fos* humain.** SIE : sis conditioned medium inducible element ; SRE : serum response element ; FAP : Fos AP1, DR : direct repeat, relai de l'action négative de *p105<sup>Rb</sup>*, produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome (sans que le mécanisme soit encore connu) et positive de *v-raf* ; NF1 : site présumptif de fixation in vitro du facteur NF1/CTF, rôle encore inconnu (activité basale ?) ; CRE : cyclic AMP response element, fixe de nombreuses protéines in vitro, sa destruction abaisse à quelques pour cent l'activité de base du promoteur ; des empreintes constitutives sont visibles in vivo sur ces éléments sauf pour SIE et NF1. *p62<sup>TCF</sup>/Elk-1* : ternary complex factor, *p62<sup>DBF</sup>* : direct binding factor, SIF : v-sis/PDGF inducible factor, SRF : serum response element binding factor.

kinase II (CKII) et son état de phosphorylation module la vitesse de dissociation d'avec sa cible et, probablement, son interaction avec d'autres protéines. Par ailleurs, la micro-injection de CKII active induit *c-fos* avec une phosphorylation concomitante de SRF [30]. A ce niveau, nous sommes toutefois confrontés à un paradoxe : alors que la protéine SRF est relativement stable, elle n'est synthétisée que pendant une période brève suivant l'induction par le sérum (c'est donc le produit d'un gène de réponse précoce), mais après que *c-fos* a déjà été induit [31] ! Sa phosphorylation suit de très près son accumulation dans le noyau. Il semblerait donc qu'il puisse exister une différence fonctionnelle entre SFR accumulé et SFR nouvellement synthétisé. Ce dernier type de SRF interviendrait-il dans l'extinction secondaire du gène *fos* (rétro-régulation). Ce dernier aspect de la transcription de *c-fos* est encore mal connu. La nécessité d'une synthèse protéique a laissé supposer que la protéine Fos elle-même participait à ce mécanisme. Cette hypothèse a été confortée par plusieurs expériences mettant en jeu la transfection simul-

tanée de vecteurs d'expression de Fos, d'une part, et de gènes indicateurs sous le contrôle du promoteur de *c-fos*, d'autre part. Le *leucine zipper* et la partie carboxy-terminale de la protéine seraient impliqués dans ce mécanisme et la phosphorylation de cette dernière jouerait un rôle prépondérant. Cela explique probablement que les protéines virales soient, quant à elles, dépourvues de ce rôle répresseur. Ces expériences ont montré, en outre, que cette répression passe par le SRE mais que la protéine ne semble pas interagir directement avec l'ADN [25]. Cependant, là encore, nous manquons d'information sur les mécanismes impliqués chez l'animal, et des résultats contradictoires ont été obtenus par le groupe d'E. Wagner sur des souris transgéniques qui expriment le gène *c-fos*.

### Une mosaïque d'éléments régulateurs transcriptionnels

Plusieurs autres éléments régulateurs entourent le SRE avec, en amont, un élément de réponse au PDGF (SIE : *sis conditioned medium inducible element*)

et, en aval, plusieurs éléments qui semblent très importants pour l'activité basale du promoteur, le CRE (*cyclic AMP responsive element*) situé à -60 pb du site de début de transcription étant, de loin, le plus fort. Ce dernier, en fixant des protéines de la famille CREB/ATF, semble non seulement capable d'intégrer à la fois des signaux provenant de la PKA, mais aussi de kinases activées par la calmoduline et donc par le calcium. Cette activation par CREB serait contrecarrée à la suite de la formation d'hétérodimères avec un antagoniste décrit récemment : CREM (*cAMP responsive element modulator* [*m/s n° 5, vol. 7, p. 500*] [32]). L'élément « SIE », défini initialement comme étant capable de conférer à un gène indicateur l'inductibilité par un milieu conditionné par des cellules transformées par *v-sis*, agit de façon additive avec le SRE, mais nécessite soit le CRE, soit les répétitions situées à -90 pb pour agir en l'absence du SRE. Contrairement au SRF qui semble constitutif, le facteur qui se fixe sur SIE (SIF) serait inducible.

Finalement, les autres éléments, bien que très prometteurs pour certains,

## RÉFÉRENCES

27. Herrera RE, Shaw PE, Nordheim A. Occupation of the serum response element *in vivo* by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature* 1989 ; 340 : 68-70.
28. Gutman A, Wasylyck B. Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Genet* 1991 ; 7 : 49-54.
29. Metz R, Ziff E. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev* 1991 ; 5 : 1754-66.
30. Gauthier-Rouvière C, Basset M, Blanchard JM, Cavadore JC, Fernandez A, Lamb NJC. Casein kinase II induces c-fos expression *via* the serum response element pathway and p67<sup>SRF</sup> phosphorylation in living fibroblasts. *EMBO J* 1991 ; 10 : 2921-30.
31. Misra RP, Rivera V, Wang JM, Fan PD, Greeberg ME. The serum response factor is extensively modified by phosphorylation following its synthesis in serum-stimulated fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 4545-54.
32. Foulkes NS, Laoide BM, Schlotter F, Sassone-Corsi P. Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down regulates c-fos cAMP-induced expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5448-52.
33. Robbins PD, Horowitz JM, Mulligan RC. Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* 1990 ; 346 : 668-71.
34. Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M. Wild type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9979-83.
35. Lamb NJC, Fernandez A, Tourkine N, Jeanteur Ph, Blanchard JM. Demonstration in living cells of an intragenic negative regulatory element within the rodent c-fos gene. *Cell* 1990 ; 61 : 485-96.
36. Alexandre C, Verrier B. Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogen* 1991 ; 6 : 543-51.
37. Hentze MW. Determinants and regulation of cytoplasmic mRNA stability in eucaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1991 ; 1090 : 281-92.
38. Bonniou A, Roux P, Marty L, Jeanteur Ph, Piechaczyk M. AUUUA motifs are dispensable for rapid degradation of the c-myc RNA. *Oncogene* 1990 ; 5 : 1585-8.
39. Rechsteiner M. *Semin Cell Biol* 1990 ; 1 : 433-40.

comme les répétitions directes que nous venons de mentionner et qui seraient la cible de la répression de *c-fos* par le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome [33], sont encore très mal définis. Par ailleurs, de nouvelles séquences régulatrices vont très vraisemblablement venir renforcer cette panoplie, comme l'élément de réponse aux œstrogènes situé à -1 200 ou encore celui, dont la position reste encore à définir, qui relâierait l'inhibition de *c-fos* par p53 [34]. Il semble, en outre, que les régions situées en aval puissent également, dans certaines circonstances, contribuer au contrôle de l'expression de *c-fos*, comme le nouveau CRE situé à +20 ou un élément régulateur négatif, FIRE (pour *fos intragenic regulatory element*) défini par notre équipe et localisé à la fin de l'exon 1 [35]. Dans ce dernier cas, la situation se complique par l'existence d'un phénomène déjà décrit pour d'autres gènes tel *c-myc* : les ARN polymérasés s'arrêtent prématurément au début du premier intron. Toutefois, la région minimale pour observer ce blocage *in vitro* est située dans les 100 premiers nucléotides de l'intron 1 et ne contient pas FIRE. Quoi qu'il en soit, nous avons pu montrer qu'*in vivo*, le gène utilisait ce phénomène à des fins régulatrices, par exemple dans le foie en hypertrophie compensatrice ou bien dans les macrophages. Dans ces deux cas, la transcription est parfaitement détectable et restreinte au premier exon de *c-fos* ; c'est aussi le cas de cellules transformées comme les cellules d'origine fibroblastique Ltk<sup>-</sup>, et dans de nombreuses situations l'induction observée résulte plus de la levée de ce blocage que d'une augmentation du taux d'initiation. Nous avons donc là un phénomène qui peut être interprété soit comme un « verrou de sécurité » (nous venons de le voir, nombreux sont les éléments et les facteurs qui peuvent activer le gène de façon inopportune), soit comme une « veille transcriptionnelle » (*stand by*, qui permettrait au gène de répondre plus rapidement aux sollicitations extérieures). Il semblerait que, au moins dans le cas des macrophages, le calcium joue un rôle important et nous examinons actuellement la possibilité qu'en fait FIRE participe à la

réponse de *c-fos* au calcium.

Finalement, plusieurs de ces éléments sont capables de véhiculer des signaux d'activation par des transactivateurs viraux, par exemple la protéine Tax du virus HTLV-1 [36].

### Un ARN messager très éphémère et très mal traduit

Le caractère transitoire de l'expression de l'ARNm de *c-fos* au cours de la transition G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> est révélateur d'une grande instabilité : en effet, l'ARNm de ce gène est l'un des plus labiles des ARNm eucaryotes décrits à ce jour, avec une durée de vie de quelques minutes. Sa dégradation dépend, d'une façon encore mal définie, de la synthèse protéique, et l'inhibition de cette dernière conduit au phénomène de superinduction décrit pour nombre d'ARNm codant pour des oncogènes nucléaires et des cytokines : l'accumulation observée résulte, d'une part, comme nous l'avons déjà vu, de l'absence d'une répression de la transcription, et, d'autre part, d'un arrêt de la dégradation de l'ARNm [1-3]. Cette dégradation serait consécutive à la perte de la queue de poly(A) présente en 3'. Plusieurs éléments ont pu être définis et l'un d'eux, situé dans la région 3' non codante (*figure 16*), contient des séquences déjà décrites par G. Shaw et R. Kamen dans l'ARNm du G/M-CSF [37]. Ces séquences de type AUUUA, fonctionnent quand elles sont positionnées en 3' et peuvent déstabiliser un ARNm stable par ailleurs, comme l'ARNm de la  $\beta$ -globine, mais seulement quand elles sont présentes au moins au nombre de trois. De la même façon, le remplacement de la région 3' non codante de l'ARNm de la  $\beta$ -globine par celle de *c-fos* le rend très instable. Il semblerait, toutefois, que la partie codante du messenger puisse également contribuer à la grande instabilité constatée pendant la transition G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, mais pas dans des cellules en croissance exponentielle [37]. Le mécanisme par lequel ces séquences agissent n'est pas encore éclairci et les résultats décrits par les divers groupes sont encore discordants : pour les uns, la suppression de la région riche en A/U ralentit à la fois le taux de

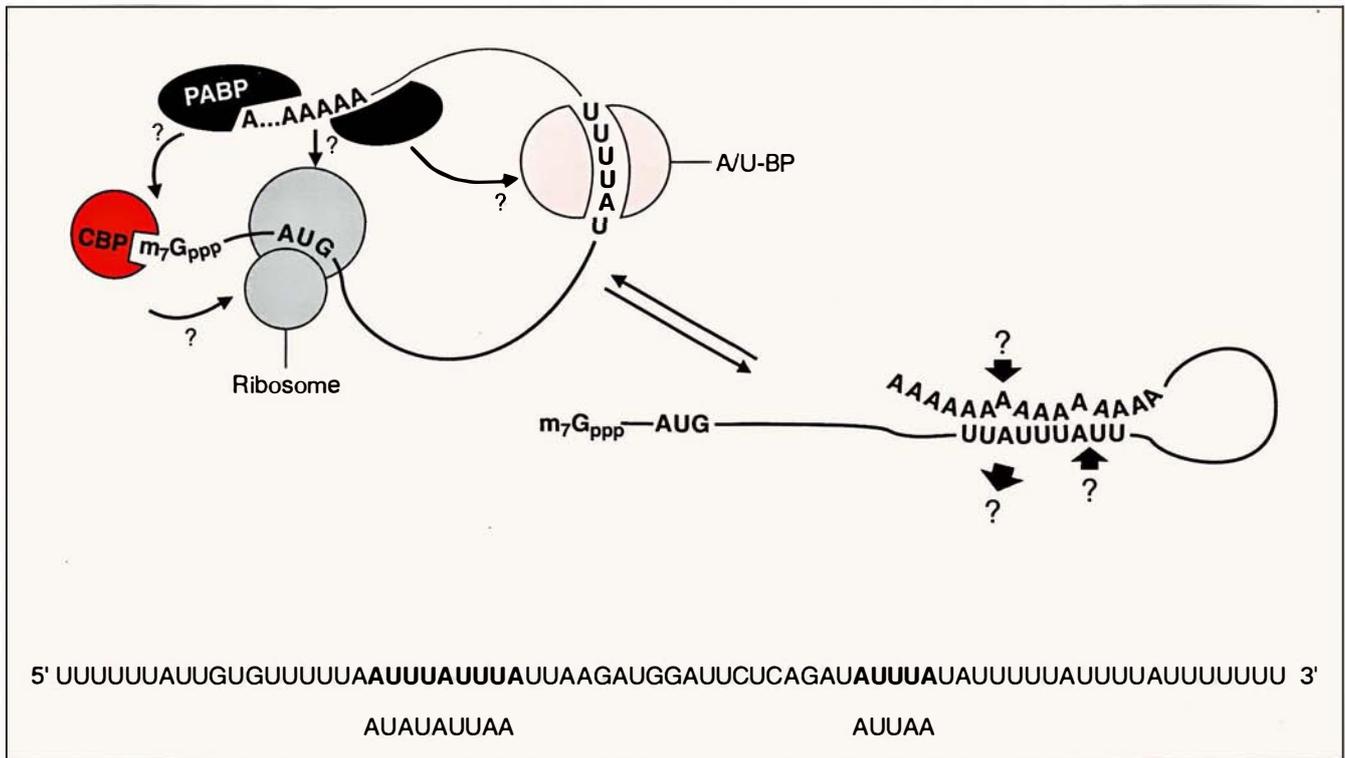


Figure 16. **Rôle hypothétique des régions riches en U, présentes dans la région 3' non codante, et de la queue de poly(A) dans la dégradation et la traduction de l'ARNm de c-fos.** PABP : poly(A) binding protein (noire) ; CBP : cap binding protein (rouge) ; ribosome (gris) ; A/U-BP : A/U rich region binding protein (rose), ces protéines pourraient moduler l'action des nucléases ou l'accès de PABP au site d'initiation. Les mauvais appariements pourraient être des sites d'attaque pour des nucléases (flèches), ce qui permettrait une certaine sélectivité ; en outre, la structure engendrée peut être elle-même génératrice de signaux (activation d'enzymes comme la 2,5A synthétase, la kinase activée par l'interféron, etc.). La dépendance vis-à-vis de chacun de ces facteurs sera fonction de l'état physiologique de la cellule (G<sub>0</sub> ou croissance exponentielle, par exemple). Est représentée en dessous la séquence qui, supprimée, active le pouvoir transformant du gène c-fos et affecte à la fois la stabilité de son ARNm et la vitesse de renouvellement du poly(A) ; cependant la moitié gauche de l'élément n'est pas suffisante pour déstabiliser l'ARNm. Quant aux séquences en caractères gras, mutées en celles qui sont en dessous, elles provoquent un ralentissement de la dégradation.

renouvellement du poly(A) et celui de l'ARNm, alors que pour les autres seule la dégradation du corps de l'ARNm est concernée [37]. Par ailleurs, et au moins dans le cas d'un autre ARNm instable étudié *in vitro*, celui de *c-myc*, la dégradation serait initiée par une coupure dans une région globalement riche en U mais qui ne contient pas de AUUUA ! Dans ce dernier cas, d'ailleurs, la mutation de ces éléments ne modifie en rien la stabilité de l'ARNm [38]. Les éléments 3' joueraient également un rôle inhibiteur dans la traduction : en effet, l'observation réalisée initialement par micro-injection d'ARNm chimères dans l'œuf de xénope semble pouvoir se généraliser aux cellules somatiques. En fait, plusieurs articles avaient déjà signalé la difficulté de détecter la protéine dans certaines conditions où l'ARNm, lui, était bien

présent. Le poly (A) pourrait avoir ici un rôle dans la traduction du message s'ajoutant à son intervention signalée ci-dessus dans la dégradation de l'ARN (figure 16). il est à noter que chez *S. cerevisiae*, le gène codant pour la protéine qui fixe le poly(A) est essentiel à la survie de la levure et que son mauvais fonctionnement affecte à la fois le taux de renouvellement du poly(A) et l'initiation de la synthèse protéique [37]. Ces résultats montrent la difficulté à définir de façon univoque des séquences qui gouvernent l'instabilité des ARNm alors que la structure globale de la molécule et celle des protéines participent de toute évidence au processus. En conclusion les éléments présents dans la région 3' codante, agissant seuls ou de concert avec d'autres motifs présents dans la partie codante, limitent considérablement la

quantité de protéine Fos produite en jouant, à la fois, sur la dégradation et la traduction de l'ARNm *c-fos*. Nous rejoignons là l'observation faite au début de cet article quant au pouvoir transformant du gène *c-fos* : les tumeurs ne sont observées dans les animaux transgéniques que si la région 3' non codante de l'ARNm est supprimée car la protéine Fos, par ailleurs très labile, va pouvoir s'accumuler au-delà d'un seuil où le tissu va basculer de l'hyperplasie bénigne vers la formation d'une tumeur. Ce scénario appelle au moins deux commentaires. Il illustre l'importance des événements post-transcriptionnels que peut subir le produit d'un gène, même si ce dernier est soumis à un contrôle très complexe au niveau de la transcription. Par ailleurs, l'extrême spécificité tissulaire des tumeurs observées chez la souris sug-

gère l'importance cardinale du compagnon qui sera associé à Fos qui, rappelons-le, ne peut pas se fixer, seul, de façon spécifique à l'ADN. Nous avons donc, d'une part, un gène capable d'être activé au niveau transcriptionnel par un très grand nombre de *stimuli* et, d'autre part, de nombreux verrous qui vont empêcher à tous les niveaux l'accumulation de son produit. Parmi les virus que nous avons mentionnés, le plus agressif d'entre eux, le FBR-MSV, aurait supprimé ces verrous. A noter que, de façon parfaitement paradoxale pour un gène que l'on pensait essentiel, les expériences récentes d'inactivation par recombinaison homologue des deux allèles de *c-fos* ont produit des souriceaux viables. B. Spiegelmann (USA) a signalé toutefois aux UCLA Symposia, qui se sont déroulés ce printemps à Keyston, que ces derniers (25 % des souriceaux homozygotes) souffraient d'ostéopérose avec une absence quasi totale de dents et vraisemblablement des troubles du comportement. Ce phénotype est à rapprocher de celui des souris double mutantes pour *src* obtenues par le groupe de Ph. Soriano (Houston, USA) (*m/s* n° 5, vol. 7, p. 509) et suggère donc un lien entre ces deux gènes dans l'élaboration du tissu osseux normal. Quoiqu'il en soit, l'existence de gènes codant pour des protéines aux fonctions voisines de celles de Fos, créant ainsi une certaine redondance fonctionnelle, pourrait expliquer la relative modicité des anomalies observées chez des animaux dépourvus de cette protéine ■

## Summary

### Proto-oncogene *c-fos* : a molecular « go between »

Proto-oncogene *c-fos* codes for a transcription factor and belongs to the so-called « immediate early response » genes which are rapidly and transiently induced by numerous stimuli in a wide variety of cell types. It is currently envisioned as a « master switch » which allows the cell to manipulate a large number of interacting transduction pathways involved in processes as different as the control of the subtle balance between cell differentiation and proliferation, or probably the establishment of short-term memory. While a wealth of information has accumulated about this proto-oncogene, it is, contrary to others, like *myc* or *ras*, only rarely involved in spontaneous tumors. This is probably due to the existence of negative regulatory loops present at almost all steps governing its expression. Interestingly, the known viruses which have transduced *c-fos* have elimina-

ted most of these negative regulatory elements and thus, by overproducing the protein, can give rise to cell transformation. However, belonging to a highly complex regulatory network and with the remarkable property of its protein to associate with a large number of partners including the *jun* family, it can be taken as a magnificent paradigm for the study of eukaryotic gene regulation. Starting from its modular promoter which allows the gene to respond very quickly to stimuli as diverse as growth factors, cAMP or ion influxes, down to its mRNA or protein which are rapidly degraded, and then back to the nucleus where the protein operates, the study of *c-fos* gene regulation has considerably contributed to our understanding of the strategies used by the cell to transform an external stimulus into a genetic program.