

Le proto-oncogène *mcf2/dbl* et les facteurs d'échange GDP-GTP

Les oncogènes *mcf2* et *mcf2/dbl* sont les formes oncogéniques remaniées d'un même gène codant pour la protéine Mcf2/Dbl. Cette dernière possède, dans sa région centrale, un motif structural retrouvé dans le produit des oncogènes *bcr*, *vav* et dans la protéine de levure CDC24 (motif MVC). CDC24 et Dbl ont une activité de facteur d'échange pour des petites protéines G de la famille Rho. La protéine Mcf2/Dbl pourrait donc constituer un premier exemple de facteur d'échange dont l'activation aurait des effets oncogéniques.

Franck Galland
Daniel Birnbaum

Les oncogènes *mcf2* et *dbl* sont deux versions activées d'un même proto-oncogène. L'oncogène *mcf2* a été isolé par essais de tumorigénicité chez la souris *nude* à partir d'ADN de la lignée tumorale humaine MCF7 [1]. Le locus *mcf2* est localisé sur le chromosome X chez l'homme et chez la souris, au sein d'un groupe génique très conservé entre les deux espèces et comprenant notamment le locus du facteur IX anti-hémophilique [2, 3]. L'oncogène *dbl* est issu d'expériences de transfert génique dans des cellules NIH3T3 à partir d'ADN de lymphome B humain [4]. En fait, *mcf2* et *dbl* consistent en deux versions d'activation du même proto-oncogène. Cette activation est le résultat d'événements de cassure/réarrangement dans la région 5' codante du proto-oncogène, mais en deux points différents [5, 6]. Dans les deux cas, des séquences non identifiées se substituent en 5' et proviennent respectivement des chromosomes 15 et 3 [7, 8]. La perte des premiers

acides aminés semble avoir une implication cruciale dans le processus d'activation de *mcf2/dbl*. La surexpression du gène normal est aussi capable de transformer des fibroblastes NIH3T3 [9].

Dans la cellule normale, la fonction de Mcf2/Dbl pourrait être réglée négativement par son interaction avec une autre protéine nécessitant un site de reconnaissance présent dans la portion N-terminale de la molécule. La perte de cette portion empêcherait la liaison avec la protéine régulatrice et laisserait Mcf2/Dbl sous une forme constitutivement active (figure 1). La similitude de séquence décrite par l'équipe d'A. Eva entre les 450 premiers acides aminés de la protéine Mcf2/Dbl et le domaine *rod-like* de la vimentine (une molécule de la famille des filaments intermédiaires) [9] laisse supposer que cette protéine régulatrice pourrait être une protéine du cytosquelette.

Outre son activation oncogénique, le locus *mcf2* peut être délété chez certains patients atteints d'hémophilie B

ADRESSE

F. Galland : docteur de l'Université. D. Birnbaum : directeur de recherche à l'Inserm. Inserm U. 119, 27 boulevard Leï-Roure, 13009 Marseille, France.

m/s n° 8, vol. 8, octobre 92

RÉFÉRENCES

1. Fasano O, Birnbaum D, Edlund L, Foght J, Wigler M. New human transforming genes detected by a tumorigenicity. *Mol Cell Biol* 1984 ; 4 : 1695-705.
2. Noguchi T, Mattei MG, Oberlé I, *et al.* Localization of the *mcf2* transforming sequence to the X chromosome. *EMBO J* 1987 ; 6 : 1301-7.
3. Anson D, Blake D, Winship P, Birnbaum D, Brownlee GG. Nullisomic deletion of the *mcf2* transforming gene in two haemophilia B patients. *EMBO J* 1988 ; 7 : 2795-9.
4. Eva A, Aaronson SA. Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 1985 ; 316 : 273-5.
5. Noguchi T, Galland F, Batoz M, Mattei MG, Birnbaum D. Activation of the *mcf2* oncogene by deletion of amino-terminal coding sequences. *Oncogene* 1988 ; 3 : 709-15.
6. Eva A, Vecchio G, Rao CD, Tronick SR, Aaronson SA. The predicted *dbl* oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 2061-5.
7. Galland F, Stefanova M, Lafage-Pochitaloff M, Birnbaum D. Localization of the 5' end of the *mcf2* oncogene to chromosome 15, band q21. *Cytogenet Cell Genet* 1992 ; 60 : 114-6.
8. Tronick S, MacBride W, Popescu N, Eva A. Chromosomal localization of *dbl* oncogene sequences. *Genomics* 1989 ; 5 : 546-53.
9. Ron D, Tronick S, Aaronson SA, Eva A. Molecular cloning and characterization of the human *dbl* proto-oncogene : evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells. *EMBO J* 1988 ; 7 : 2465-73.
10. Galland F, Pirisi V, Delapeyrière O, Birnbaum D. Restriction and complexity of the *mcf2* proto-oncogene expression. *Oncogene* 1991 ; 6 : 823-39.
11. Galland F, Katzav S, Birnbaum D. The product of the *mcf2* and *vav* proto-oncogenes and the yeast gene CDC24 share sequence similarities. *Oncogene* 1992 ; 7 : 755-7.
12. Ron D, Zannini M, Lewis M, *et al.* A region of proto-*dbl* essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, *CDC24*, and the human breakpoint cluster gene, *bcr*. *The New Biol* 1991 ; 3 : 372-9.
13. Katzav S, Cleveland JL, Heslop HE, Pulido D. Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the *vav* proto-oncogene activates its transforming potential. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 1912-20.
14. Bustelo XR, Ledbetter JA, Barbacid M. Product of *vav* proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* 1992 ; 356 : 68-71.

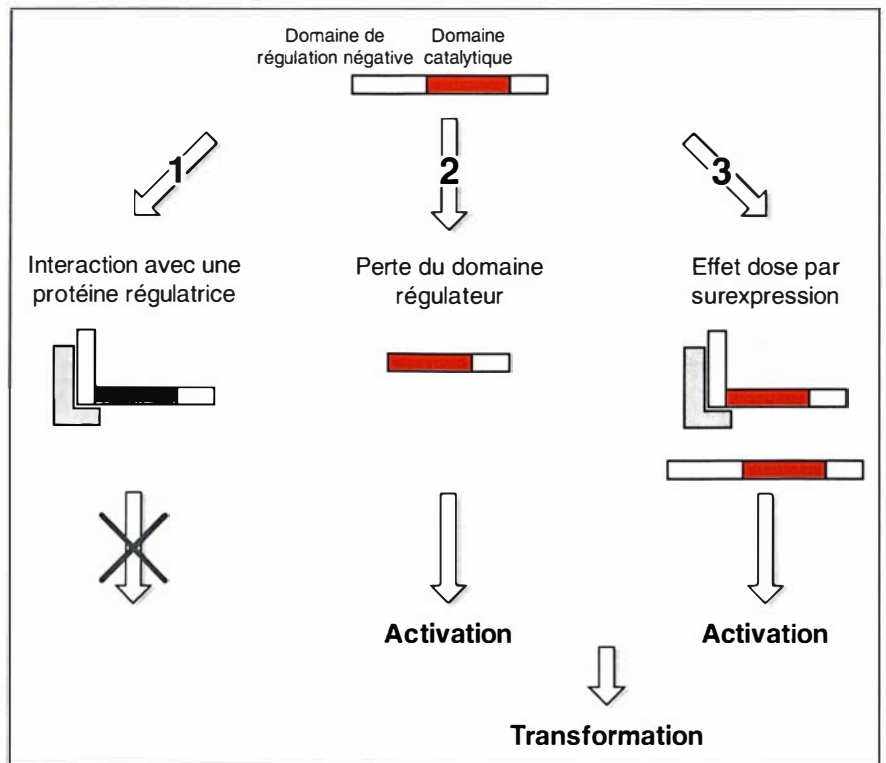


Figure 1. Régulation négative hypothétique de l'activité transformante de Mcf2/Dbl par ses séquences N-terminales

portant une délétion du *locus* du facteur IX suffisamment large pour comprendre aussi le *locus mcf2* [3]. Des individus mâles porteurs de ce type de délétion sont donc nullisomiques pour *mcf2*.

L'étude de la distribution tissulaire de l'expression du gène *mcf2* a révélé une restriction très spécifique aux gonades et tissus d'origine neuroectodermique [10]. Un transcrit *mcf2* est notamment exprimé de façon uniforme au cours du développement testiculaire chez la souris.

Les protéines Mcf2/Dbl, Vav, CDC24 et Bcr présentent des relations structurales

Alors qu'il était possible de ranger la plupart des proto-oncogènes connus dans différentes familles, les premières analyses de séquence peptidique n'avaient pas permis d'inclure Mcf2/Dbl dans une classe particulière. Les découvertes récentes d'analogies structurales avec d'autres molé-

cules ouvrent des nouvelles perspectives vers la connaissance de la fonction de ce produit.

Au niveau des séquences en acides aminés de la portion centrale de Mcf2, nous avons décrit une zone limitée partagée avec les protéines codées par le proto-oncogène *vav*, et le gène de levure *CDC24* [11]. Nous avons baptisé ce domaine « MVC » pour *mcf2/vav/CDC24*. De manière analogue, Ron *et al.* ainsi qu'Adams *et al.* ont rapporté l'existence de cette région conservée entre Dbl, CDC24 et Vav, mais également avec le produit du gène *bcr*, une sérine/thréonine kinase impliquée dans la pathogénie des leucémies myéloïdes chroniques (LCM) [12, 41] (figures 2 et 3).

Le produit du proto-oncogène vav
L'oncogène *vav* a été isolé par transfection d'ADN humain d'un carcinome œsophagien dans les cellules de souris. L'activation de *vav* passe par la perte des séquences 5' [13]. La région « MVC » est conservée dans les trois formes oncogéniques *mcf2*, *dbl* et

vav. Elle peut coïncider avec un domaine fonctionnel de la protéine important pour l'activité de transformation des produits altérés.

Le gène *vav* est exclusivement exprimé dans les cellules hématopoïétiques, mais la protéine Vav n'a pas de fonction précise connue. Néanmoins, après stimulation des récepteurs de l'EGF ou du PDGF (*platelet derived growth factor*), la p95^{vav} est rapidement phosphorylée et associée à ces récepteurs *via* son motif SH2 [14, 15]. Les motifs SH2 (*src homology region*) semblent essentiels pour des protéines transductrices, dans un système de signalisation impliquant des tyrosine kinases [16]. De plus, la p95^{vav} est observée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, après stimulation des cellules basophiles par regroupement en surface des récepteurs aux IgE. Bien qu'aucune activité régulatrice sur des facteurs nucléaires n'ait été démontrée, Vav possède un certain nombre de motifs (*helix-loop-helix*, *leucine-zipper*) qui, selon certains auteurs, lui permettraient de former des hétérodimères avec des facteurs de transcription. Les auteurs de ces travaux [15] proposent que Vav représente un relais direct entre la signalisation par les tyrosine kinases et les événements transcriptionnels.

La protéine Bcr

Le gène *bcr* est exprimé de façon ubiquitaire. La protéine Bcr apparaît structurellement et fonctionnellement très complexe. Comme Vav, elle possède plusieurs domaines de similitude de séquence avec diverses protéines. En particulier, elle dispose d'un domaine de liaison pour des motifs SH2 et d'un domaine qui partage des ressemblances avec la GAP-Rho, la n-chimérine et la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) [17]. Des éléments récents ont montré que le produit de *bcr* a une double activité catalytique. Outre une activité sérine/thréonine kinase [17], le domaine GAP-like de Bcr est capable d'activer la fonction GTPasique d'une petite protéine analogue de la p21^{ras} : la p21^{rac} [18] (figure 3).

La protéine de levure CDC24

Le produit du gène *CLS4/CDC24* joue un rôle central dans les proces-

Mcf2	498	HVLNELIQTERVYVRELYTVLLGYRAEMDNPEMFDLMPPLLRNKKDILFG
Vav	197	CCLREIQQTEEKYTDTLGSIQQHF...LKPLQRF...LKPDIEIIFI
CDC24	163	KIIKEFVATERKYVHDL.EILDKYRQQLDLSNLIT...SEELYMLFP
Bcr	501	WVLSGILASEETYLSHLEALLPMKP.LKAAATTS.QPVLTSQIETIFF
consensus		--L-E---TE--Y---L---L---L-----L-----L-----F-
Mcf2	548	NMAEIEYEFHNDIFLSSLE.NCAHAPERVG..PCFLERKDDFQMYAKYQCN
Vav	239	NIEDLLRVHTH.FLKEMK.EALGTPGAPNLYQVFIKYKERFLVYGRYCSQ
CDC24	206	NLGDADFQRR.FLISLEINALVEPSKQRIGALFMHSHKFFKLYEPWSIG
Bcr	549	KVPELYEIHKE.FYDGLFPRVQVQWSHQVRVGDVDFQKLASQLGVYRAFVDN
consensus		N-----H---FL--L-----P-----F---K--F--Y-----
Mcf2	595	KPRSETIWRKYSECA.FFQECQRKL.....K...HRLRLDSYLLKPV
Vav	287	VESASKHLDRVAAAR...EDVQMKL.....ECSQRANNGRFTARPA
CDC24	255	QNAAIEFLSSTLHKM.RVDESQRFI.....I...NNKLELQSFYKPV
Bcr	598	YGVAMEMAEEKCCQANAQFAEISENLRARSNKDAKDPPTKNSLETLLYKPV
consensus		---A-----E-Q--L-----L---L-KPV
Mcf2	633	Q...RITKYQLLKKELLYSKDCE.GSALLKKALDAMLDLLKSVNDSMH
Vav	326	DGAYAASSQISPPSPGAGETHAGGD.GARKLRLALDAMRDLAQCQVNEVKR
CDC24	294	Q...RLCRYPLLVKELLAESSDDN.NTKELEAALDI SKNIARSINENQR
Bcr	648	D...RVTRSTLVLHDLKHTPASHPDHPLLDALRISQNFSSINEEIT
consensus		-----R-----L---LL-----L--ALD-----S-NE---
Mcf2	678	QIAINGYIGNLNLGKMMIMQGGFSVWIGHK.KGATKMKDLARFKPMQRHL
Vav	375	DNETLRQITNF.QLSIENLDQSLAHYGRPKIDGELKITSVERRSKMDRYA
CDC24	339	RTENHQVVKLY.....GRVNVWKGYRI.....SKFGEL...
Bcr	694	PRRQSMTVKKGEH..RQLLKDSFMV...ELVEGARKL.....RHW
consensus		-----G--K-----R--
Mcf2	727	FLYEKAIVFCKRRVSEGESDRYPSYSFKHKCWMDEVGITEYVKGDN
Vav	424	FLLLDKALLICKRRGDS.....YDLKDFVNLHSPQVRDDSSGDR
CDC24	368	LYFDK..VFISTTSSSEPEREFVYLFEKIILFSEVVTKKSASSL
Bcr	729	FLFTE.LLCTKLKQSGGKTQQ...YDCKWYIPL....TDLFSQMV
consensus		FL--K---C---S-----Y--K---L-----T--S---

Figure 2. **Alignement des séquences du domaine « MVC » de Mcf2/Dbl, Vav, CDC24 et Bcr.** Une séquence consensus dérivant de cet alignement est indiquée.

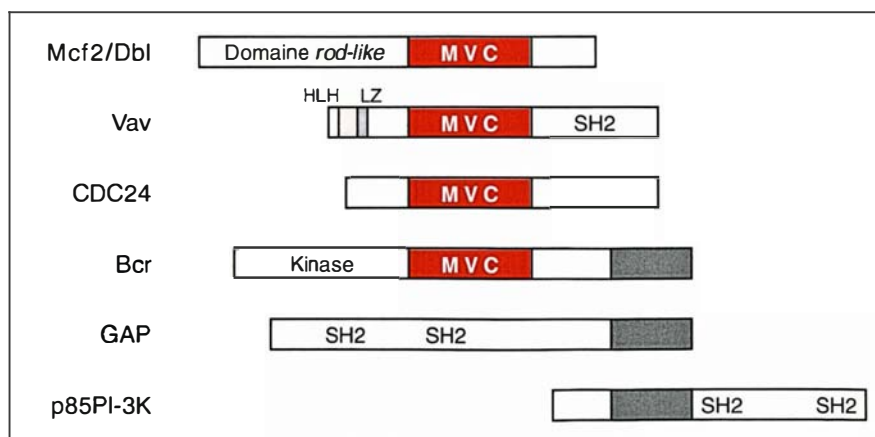


Figure 3. **Familles de molécules transductrices pouvant intervenir sur des petites protéines G.** Le domaine « MVC » (en rouge) de Mcf2/Dbl a une activité facteur d'échange GDP-GTP. Ce domaine est partagé avec trois autres molécules : Vav, la protéine de levure CDC24, et Bcr, qui possède également un motif catalytique GTPase activateur (en gris) retrouvé sur la protéine GAP et la sous-unité p85 de la PI-3K (phosphatidyl inositol-3 kinase). HLH : helix loop helix ; LZ : leucine zipper ; SH2 : src homology 2.

RÉFÉRENCES

15. Margolis B, Hu P, Katzav S, *et al.* Tyrosine phosphorylation of *vav* proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* 1992 ; 356 : 71-4.
 16. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains : elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991 ; 252 : 668-74.
 17. Maru Y, Witte ON. The *bcr* gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 1991 ; 67 : 459-68.
 18. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, *et al.* *bcr* encodes a GTPase-activating protein for p21^{rac}. *Nature* 1991 ; 351 : 400-2.
 19. Ohya Y, Miyamoto S, Ohsumi Y, Anraku Y. Calcium-sensitive *cls4* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in bud formation. *J Bacteriol* 1986 ; 165 : 28-33.
 20. Drubin D. Development of cell polarity in budding yeast. *Cell* 1991 ; 65 : 1093-6.
 21. Chardin P. Small GTP-binding proteins of the Ras family : a conserved functional mechanism ? *Cancer Cells* 1991 ; 3 : 117-26.
 22. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily : conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991 ; 349 : 117-25.
 23. Matsui Y, Kikuchi A, Araki S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a *ras* p21-like GTP-binding protein. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 4116-22.
 24. Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *Nature* 1991 ; 354 : 311-4.
 25. Ziman M, O'Brien JM, Ouellette LA, Church WR, Johnson DI. Mutational analysis of *CDC42Sc*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 3537-44.
 26. Shinjo K, Koland GJ, Hart MJ, *et al.* Molecular cloning of the placenta GTP-binding protein, Gp (G25K) : identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division cycle protein, CDC42. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 9853-7.
 27. Ron D, Graziani G, Aaronson SA, Eva A. The N-terminal region of proto-*dbl* down regulates its transforming activity. *Oncogene* 1989 ; 4 : 1067-72.
 28. Créchet JB, Poulet P, Mistou MY, *et al.* Enhancement of the GDP-GTP exchange of RAS proteins by the carboxyl-terminal domain of SCD25. *Science* 1990 ; 248 : 866-8.
- sus morphogénétiques qui régissent le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* [19]. Chez cette levure, la croissance cellulaire se concrétise par des bourgeonnements qui se réalisent de manière prédéterminée, mettant en jeu une restructuration du cytosquelette. *CDC24* participe à la formation des bourgeonnements spécifiques de la levure en contrôlant l'assemblage des composants du cytosquelette selon les différents sites et en fonction du Ca²⁺ [20], donnant ainsi une polarité à la cellule. Grâce à l'existence de mutants chez la levure, des interactions génétiques sont connues entre *CDC24* et deux autres gènes, *CDC42* et *CDC43*.
- De quelle nature pouvait être le rapport entre les quatre molécules : Mcf2/Dbl, Vav, CDC24 et Bcr ?
- D'un côté, des interactions possibles avec des éléments du cytosquelette (soupçonnées pour Mcf2/Dbl et CDC24).
 - De l'autre, un rôle de transducteur dans la transmission d'un signal (pressenti pour Vav et Bcr).
- Fonctionnellement, la région mise en cause pouvait définir un domaine catalytique potentiel. La réponse est venue en analysant les données recueillies sur CDC24 chez la levure.

Mcf2/Dbl et facteurs d'échange GDP-GTP

Les protéines Rho font partie de la superfamille des petites protéines G dont les prototypes sont les protéines codées par les proto-oncogènes *ras* [21]. Toutes ces protéines peuvent exister sous deux états conformationnels interchangeables : liées au GDP, elles sont dites inactives ; alors que liées au GTP, elles sont sous leur forme dite active (*figure 4*) [22]. Dans une cellule à l'état normal *in vivo*, la forme liée au GDP est prépondérante. Cela est rendu possible grâce à une activité GTPase et à l'intervention de protéines GAP (*GTPase activating proteins*) qui stimulent l'hydrolyse du GTP par les petites protéines G. Mais divers arguments expérimentaux semblent aussi attribuer à GAP un rôle d'effecteur pour des petites protéines G activées (*m/s n° 5, vol. 8, p. 471*).

Une autre classe de protéines a pour but de catalyser la dissociation du

GDP pour permettre son remplacement par du GTP. Ce sont les facteurs d'échange GDP-GTP ou GNRP (*guanine nucleotide release protein*). Enfin, il existe des protéines GDI pouvant jouer un rôle apparemment opposé aux facteurs d'échange en inhibant la dissociation du GDP [23]. Récemment, Hart *et al.* ont publié une fonction de facteur d'échange pour la protéine Dbl [24]. Ils sont partis des deux observations suivantes : CDC42Sc est une petite protéine G de la famille des protéines Rho [25] et, chez la levure, CDC24 règle l'activité de CDC42Sc [20]. La sur-expression de CDC42Sc supprime le phénotype « défaut de croissance » de la levure mutée pour CDC24 [25]. Le gène *CDC42Hs* est l'homologue humain de CDC42Sc [26]. Par analogie, la protéine humaine Mcf2/Dbl pouvait donc être une protéine régulatrice de l'activité de CDC42Hs. Les auteurs ont démontré expérimentalement que la p66^{dbl} n'a aucune capacité de type GAP ; en revanche, elle se comporte comme un facteur d'échange GDP-GTP pour la protéine *Rho-like* CDC42Hs, c'est-à-dire qu'elle catalyse de façon spécifique la dissociation du GDP de CDC42Hs. Actuellement, il est difficile de comprendre le rôle précis de cette régulation de CDC42Hs par la protéine Dbl, la fonction biologique réelle de cette dernière n'étant toujours pas connue.

Ces travaux ont été réalisés avec la forme oncogénique tronquée p66^{dbl}. Les expériences de transformation ont montré l'importance de la perte de la portion N-terminale, analogue à des éléments du cytosquelette tels que la vimentine, dans le pouvoir transformant de Mcf2/Dbl [2, 12, 27]. A ce stade, il est possible d'établir un parallèle avec SDC25. Le domaine C-terminal de SDC25 fonctionne comme un facteur d'échange GDP-GTP pour diverses protéines Ras. Curieusement, la molécule entière est incapable de catalyser l'échange GDP-GTP, comme si la présence des séquences N-terminales empêchait toute activité (*m/s n° 7, vol. 6, p. 703*) [28, 29]. Ainsi, Mcf2/Dbl et SDC25 sont deux exemples de molécules facteurs d'échange dont l'activité biochimique est contrôlée par la formation de complexes avec un élément régu-

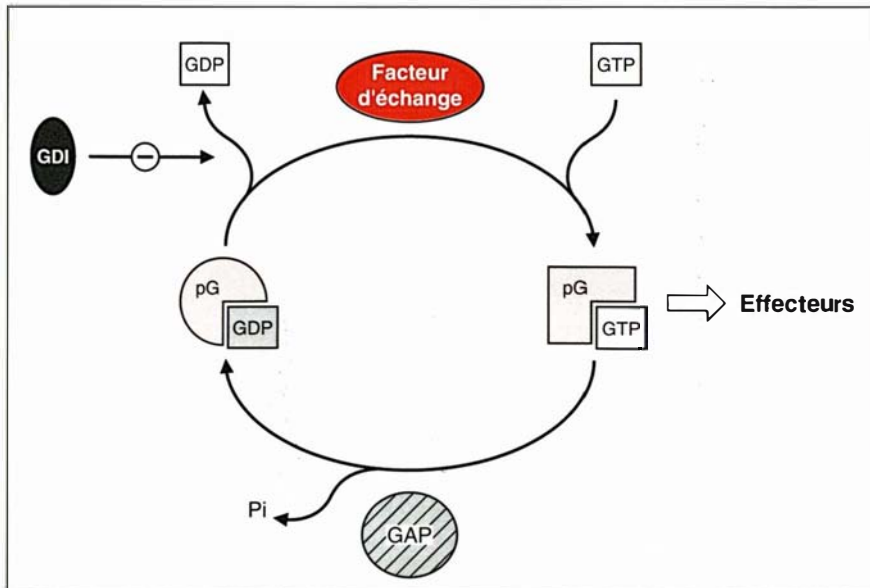


Figure 4. **Les petites protéines G (pG) du type Ras-like peuvent se présenter sous deux états conformationnels différents (lié au GDP ou au GTP).** Des protéines régulatrices interviennent sur ces changements d'état : GAP (GTPase activating protein), facteur d'échange (GNRP : guanine nucleotide release protein, ou GDS : GDP dissociation stimulating protein) et GDI (GDP dissociation inhibiting protein) (pour détails voir [21, 22]). A noter que la protéine GAP semble également pouvoir se comporter comme effecteur aval de la transduction du signal relayé par la protéine Ras activée.

lateur. La nature de ces derniers éléments reste à déterminer. La région amino-terminale de 344 résidus de SDC25 renferme un motif SH3. Les domaines SH3 seraient susceptibles de réunir des particules transductrices à leurs cibles et de réaliser des jonctions avec le cytosquelette [16]. Dans ce contexte, il serait intéressant d'extraire uniquement le domaine MVC de Mcf2/Dbl et de tester sa capacité à catalyser l'échange GDP-GTP sur CDC42Hs ou d'autres petites protéines G. La même approche pourrait être entreprise avec les domaines isolés de Vav ou de Bcr.

Plusieurs familles de facteurs d'échange GDP-GTP

Plusieurs laboratoires ont détecté une activité facteur d'échange pour la p21^{ras} chez les mammifères [30-32]. Cependant, le modèle levure est beaucoup mieux documenté : les produits des gènes *CDC25* [33], *SDC25* [28] et *BUD5* [34] exercent ce type d'activité sur des protéines analogues à Ras de *S. cerevisiae*. Chez la drosophile,

le facteur d'échange Sos pourrait être impliqué dans la stimulation de Ras1 après activation du récepteur tyrosine kinase *sevenless* par liaison avec son ligand [35]. Sos partage des similitudes de séquence avec les produits de levure *CDC25*, *SDC25* et *BUD5*. Aucune similitude de séquence entre ces molécules et Mcf2/Dbl, ni même *CDC24*, n'a jamais été observée. Par leur motifs MVC apparentés, une nouvelle classe de facteurs d'échange GDP-GTP, peut-être plus spécifique des protéines Rho, peut se bâtir autour de Mcf2/Dbl, Vav, Bcr et *CDC24*. Bien sûr, l'activité de facteur d'échange n'a encore été démontrée que pour Dbl. Cette situation est un peu similaire à celle des protéines *GAP-like*, où aucune similitude de séquence n'existe entre la *GAP-Rap* et les autres protéines *GAP-Ras* décrites [36].

La p95^{vav} est capable de s'unir par son domaine SH2 à des récepteurs activés [14, 15]. Par son domaine facteur d'échange potentiel, Vav représenterait aussi un contrôle positif de l'« allumage » des protéines analogues

à la p21^{ras}. GAP liée à des récepteurs par son domaine SH2 [37] interviendrait, à l'opposé, pour « éteindre » les petites protéines G, peut-être après avoir transmis le signal d'activation à un effecteur aval (*m/s* n° 5, vol. 8, p. 471). Nous avons là un modèle de contrôle du fonctionnement des petites protéines G par des molécules, elles-mêmes retrouvées imbriquées dans des complexes de transduction hétérodimériques associés à des récepteurs de surface (*figure 5C*, p. 824) [38]. La situation se complique si l'on considère que le domaine de similitude de Bcr avec Mcf2/Dbl confère aussi une activité de facteur d'échange à Bcr. La protéine Bcr deviendrait alors le premier exemple de produit portant la double activité enzymatique d'échange GDP-GTP et d'activation de l'hydrolyse du GTP. Bcr possède en effet une activité GAP sur des protéines de la famille Rho/Rac à laquelle appartient *CDC42* [18]. De plus, une région d'attachement sur des motifs SH2 est caractérisée sur Bcr [17]. Reste à savoir si la protéine Bcr est capable de remplir, à elle seule, le rôle fonctionnel d'un couple régulateur du type Vav-GAP décrit précédemment (*figure 5B*). On peut également se demander si Mcf2/Dbl interagit avec des éléments du cytosquelette par sa région N-terminale (*figure 5A*) ou bien si Mcf2/Dbl est susceptible de s'associer à des récepteurs membranaires activés. Aucun motif SH2 n'est décelable sur la molécule Mcf2/Dbl. Toutefois, on pourrait envisager l'intervention de molécules « connecteurs », sans domaine catalytique apparent, mais présentant des régions « SH » d'interactions protéine-protéine (*figure 6*, p. 825). De telles molécules pourraient correspondre aux protéines déjà connues du type Crk [43] ou Nck [44], ou encore Sem5 plus récemment décrit et qui permettrait le couplage entre un récepteur tyrosine kinase et un facteur d'échange chez *C. elegans* [39].

Comment expliquer la dichotomie entre l'expression restreinte de Mcf2/Dbl et celle quasi ubiquitaire de *CDC42Hs*? Peut-on postuler l'existence de toute une famille de facteurs d'échange analogues à Mcf2/Dbl, qui présenteraient des spécificités variables vis-à-vis des différentes petites

RÉFÉRENCES

29. Damak F, Boy-Marcotte E, Le Roscouet D, Guilbaud R, Jacquet M. *SDC25*, a CDC25-like gene which contains a RAS-activating domain and is a dispensable gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 202-12.
30. Wolfman A, Macara IG. A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21^{ras}. *Science* 1990 ; 248 : 67-9.
31. Downward J, Riehl R, Wu L, Weinberg RA. Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21^{ras}. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5998-6002.
32. Huang YK, Kung HF, Katama T. Purification of a factor capable of stimulating the guanine nucleotide exchange reaction of Ras protein and its effect on Ras-related small molecular mass G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 8008-12.
33. Jones S, Vignais ML, Broach JR. The *CDC25* protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to Ras. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 2641-6.
34. Chant J, Corrado K, Pringle JR, Herskowitz I. Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *bem1*. *Cell* 1991 ; 65 : 1213-24.
35. Simon MA, Bowtell DDL, Dodson GS, Lavery TR, Rubin GM. Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 1991 ; 67 : 701-16.
36. Rubinfeld B, Munemitsu S, Clark R, et al. Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21^{ras}. *Cell* 1991 ; 65 : 1033-42.
37. Anderson D, Koch CA, Grey L, Ellis C, Moran MF, Pawson T. Binding of SH2 domains of phospholipase C1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 1990 ; 250 : 979-82.
38. Filhol O, Cochet C. Le transfert des signaux mitogéniques : une affaire de particules. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 980-4.
39. Pawson T. Conviction by genetics. *Nature* 1992 ; 356 : 285-6.
40. McCormick F. *ras* GTPase activating protein : signal transmitter and signal terminator. *Cell* 1989 ; 56 : 5-8.
41. Xu G, Lin B, Tanaka K, et al. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates *ras* GTPase and complement *ira* mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 1990 ; 63 : 835-41.
42. Adams J, Houston H, Allen J, Lints T, Harvey R. The hematopoietically expressed *vav* proto-oncogene shares homology with the *dbl* GDP-GTP exchange factor, the *bcr* gene and the yeast gene (*CDC24*) involved in cytoskeletal organization. *Oncogene* 1992 ; 7 : 611-8.
43. Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 1988 ; 332 : 272-5.
44. Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson J. Nck a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 1048.

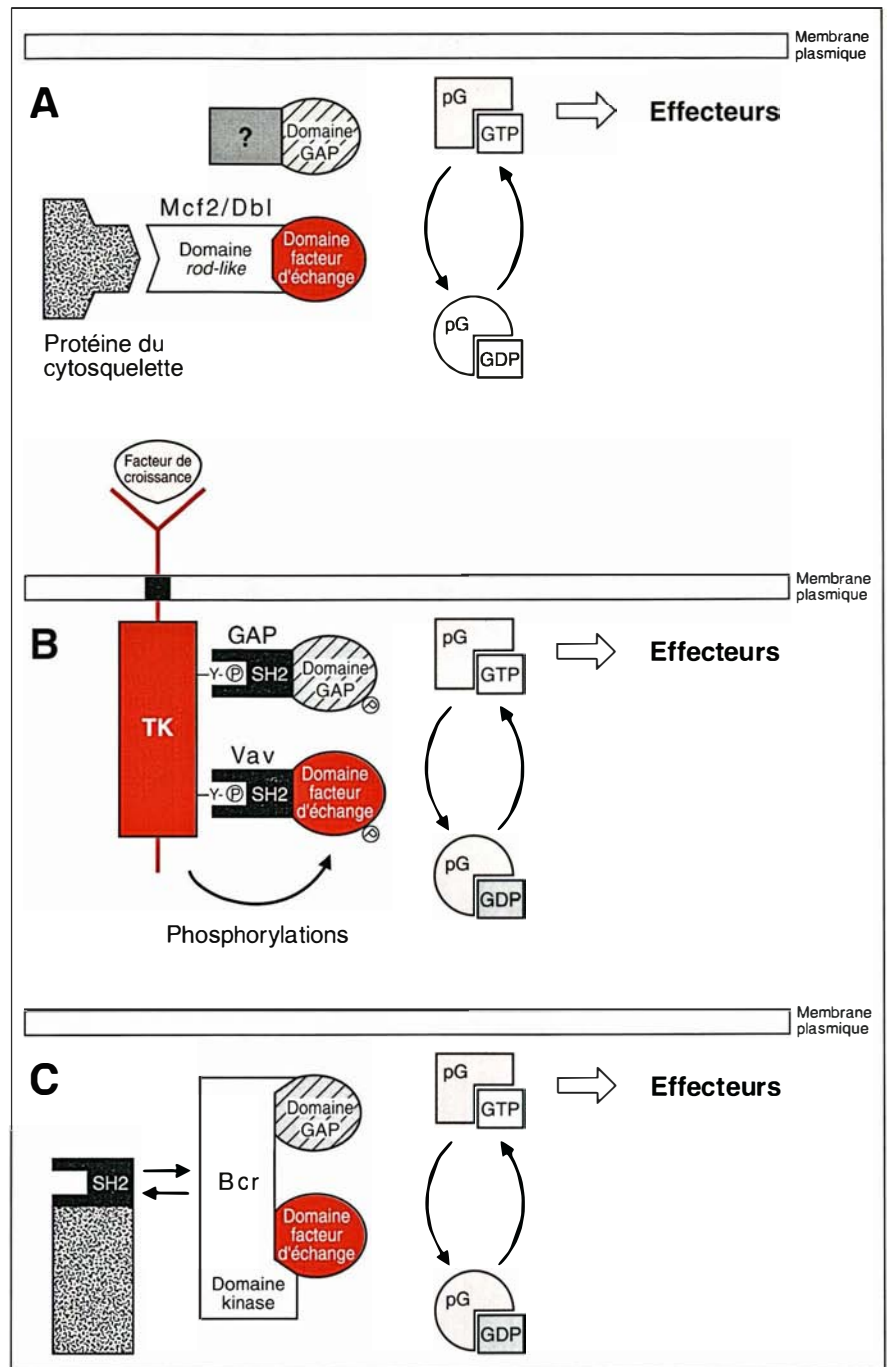


Figure 5. **Trois situations hypothétiques impliquant trois types de facteurs analogues à Mcf2/Dbl.** (A) Par son domaine catalytique favorisant l'échange GDP-GTP, la protéine Mcf2/Dbl contrôle l'activité d'une petite protéine G (pG) (peut-être de la famille Rho/Rac). Par son extrémité N-terminale, elle interagit avec des éléments du cytosquelette. (B) La protéine Vav possède un domaine facteur d'échange analogue à Mcf2/Dbl, et se lie via son motif SH2 à un récepteur transmembranaire tyrosine kinase phosphorylé. (C) Dans les deux situations précédentes, les fonctions « GAP » et « échange » sont découplées sur deux molécules distinctes. Ici, la protéine Bcr module le cycle GTPase par sa double activité GAP et facteur d'échange, et s'associe à la région SH2 d'une kinase.

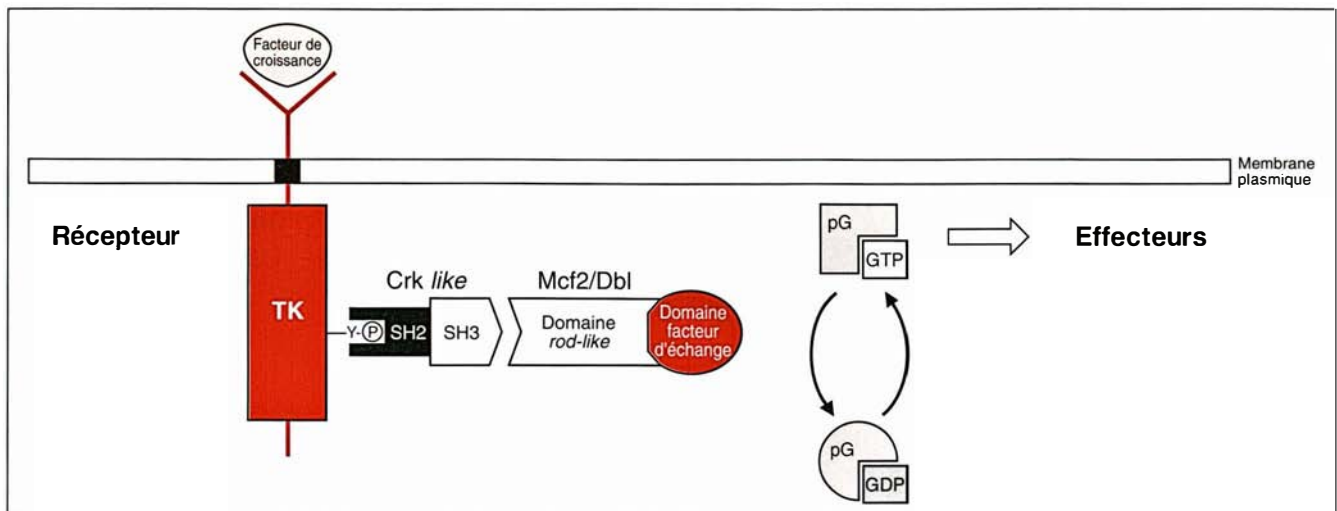


Figure 6. **Modèle de mode d'action de Mcf2/Dbl dans un couplage hypothétique entre la stimulation d'un récepteur transmembranaire tyrosine kinase par son ligand et l'activation d'une petite protéine G (pG).** Ce couplage est réalisé par l'intermédiaire d'un « connecteur » moléculaire de type Crk (ou autre) capable de mettre en action un facteur d'échange analogue à Mcf2/Dbl.

protéines G. Ces spécificités reposeraient sur des différences de localisation tissulaire ou d'interactions avec d'autres protéines pouvant affecter leurs propriétés fonctionnelles. Mais il existe probablement un certain niveau de redondance fonctionnelle. Deux remarques vont dans ce sens : (a) chez la levure, des mutants nuls pour SDC25 sont tout à fait viables [29] ; (b) chez l'homme, des hémophiles nullisomiques pour *mcf2* (voir plus haut) ne semblent pas affectés par l'absence de la protéine Mcf2 [3]. Ces constatations indiquent qu'il doit être possible de compenser l'absence de ces facteurs par un analogue, au moins dans certaines conditions.

Conclusion

Une protéine du type Ras peut être transformante lorsqu'elle n'est plus contrôlée. Cela peut résulter d'une mutation dominante dans la séquence du gène [40] ou d'une altération d'éléments impliqués dans la régulation de son activité. Au moins deux catégories de facteurs peuvent être concernées : les protéines GAP et les facteurs d'échange GDP-GTP. En situation cellulaire normale, l'acti-

tion de la protéine Ras en réponse à un *stimulus* n'est que transitoire. Elle ne dure que le temps de recruter des molécules cibles qui poursuivront la transmission du signal. Une anomalie fonctionnelle de GAP peut donc engendrer un défaut dans le retour à la forme dite inactive de la $p21^{ras}$ et mimer l'effet transformant par mutation du gène *ras*. En cela, certains gènes codant pour des protéines GAP doivent s'apparenter à des gènes suppresseurs de tumeur. C'est ce qui a été montré pour le produit de *NF1*, un anti-oncogène impliqué dans la neurofibromatose de type 1, qui code pour un produit assimilé à une GAP exerçant un contrôle négatif sur plusieurs types de petites protéines G [41]. Cependant, d'autres protéines GAP, telle p120-GAP, peuvent non seulement être des régulateurs négatifs de $p21^{ras}$, mais aussi des intermédiaires dans la transduction du signal. Le facteur d'échange devrait, quant à lui, avoir plutôt un effet positif sur la prolifération, par son mode d'action sur les produits semblables à Ras et ainsi se comporter comme un oncogène. La démonstration que Mcf2/Dbl code pour un facteur d'échange va dans ce sens. L'activité transformante de Mcf2/Dbl

se passe en fait par une activation « longue durée » de petites protéines G, en remplaçant le GTP dès que celui-ci est hydrolysé. On peut s'interroger sur la participation du domaine MVC dans les processus qui conduisent à la transformation par Vav. Mcf2/Dbl est le premier facteur d'échange GDP-GTP pour des petites protéines G dont l'altération peut conduire à un pouvoir oncogénique. Il est raisonnable de penser que c'est le premier membre d'une famille qui ne demande qu'à s'agrandir.

Si désormais les mécanismes biochimiques par lesquels Mcf2/Dbl semble agir sont plus clairs, il est encore difficile de cerner le rôle biologique de cette molécule dans la régulation de protéines telles que CDC42Hs et les types d'informations qu'elle véhicule dans les gonades et les tissus nerveux. Mcf2/Dbl pourrait participer à la modulation d'activités associées au cytosquelette, comme par exemple être impliqué dans la maintenance de la polarité cellulaire et/ou intervenir dans la mitose. Son mode d'action semble être sous l'influence d'un élément assurant un contrôle négatif, qui pourrait être lui-même contrôlé par des phénomènes de phosphorylation ■

Summary

The *mcf2/dbl* proto-oncogene and GDP-GTP exchange factors

mcf2 and *dbl* are two oncogenic forms of the same proto-oncogene activated by loss of 5' sequences. These sequences coding for the N-terminus of the *mcf2/dbl* gene product contain a « rod-like » domain similar to those found on intermediate filaments such as the vimentin. This domain could be involved in protein-protein interactions that may participate to the regulation of the biological activity of the Mcf2/Dbl molecule. Recently it has been reported that the central portion of the *mcf2/dbl* product shares similarities with three other proteins : Vav, Bcr and the yeast protein CDC24. Moreover this region codes for a catalytic domain with a GDP-GTP exchange activity on a small G protein of the Ras superfamily : the CDC24Hs product. Thus Mcf2/Dbl, Vav, Bcr and CDC24 could represent a new class of exchange factors involved in the activation of small G-proteins. It is of interest to correlate positive regulatory element of small G-proteins to an activated oncogene.