



Régulation intragénique de la transcription de c-fos: blocage de l'élongation et promoteur alterne

Vincent Coulon

► To cite this version:

Vincent Coulon. Régulation intragénique de la transcription de c-fos: blocage de l'élongation et promoteur alterne. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2001. Français. NNT: . tel-00007905

HAL Id: tel-00007905

<https://theses.hal.science/tel-00007905>

Submitted on 4 Jan 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences et Techniques du Languedoc
UFR Sciences

N° Attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Formation Doctorale : Biologie Santé

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent COULON

Le 29 Octobre 2001

Titre :

Régulation intragénique de la transcription de c-fos :

blocage de l'élongation et promoteur alterne.

Jury composé de :

Mr le Pr Philippe Jeanteur, Professeur, Université Montpellier II

Mr le Dr Olivier Bensaude, Directeur de Recherches ENS, Paris

Mr le Dr Jean Imbert, Directeur de Recherches INSERM, Marseille

Mr le Dr Robert A. Hipskind, Directeur de Recherches, IGM Montpellier

Mr le Dr Hervé Enslin, Chargé de Recherches, INSERM, Paris

Mr le Dr Jean-Marie Blanchard, Directeur de Recherches, IGM Montpellier

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

A mes parents,

A Victor,

A Julie.

Remerciements

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'en faire partie, j'en suis très honoré.

Jean-Marie Blanchard a dirigé les travaux de cette thèse, et je le remercie de m'avoir accueilli dans son équipe. Sa bonne humeur et son penchant pour... les bonnes choses ont contribué à la qualité de l'environnement dans lequel j'ai travaillé. De plus, il m'a permis d'apprendre ailleurs en participant à des formations et congrès.

Mon goût pour la biologie a été renforcé et nourri par Mr Prost, excellent professeur de Biologie au lycée. Sa passion et son prosélytisme m'on contaminé, merci pour le virus.

Mon premier contact avec la recherche s'est fait dans le laboratoire de Paul Mangeat, pour un stage de maîtrise. J'ai découvert là, au contact de Philippe Montcourrier et Hubert Reggio, que l'image d'Epinal du savant fou n'était pas si caricaturale. Merci pour les fous rires, les aventures sidérales et les dissections wagnériennes.

Jean-Luc Veyrune m'a appris les rudiments de la biologie moléculaire lors de mon stage de DEA. Sa patience fut admirable devant ma lenteur de militaire fraîchement libéré, et je le tiens pour mon ami.

Bob « *Captain SkyHook* » Hipskind, tes nombreux conseils et réactifs ont été déterminants pour l'aboutissement du papier JBC. Merci pour ta science de la signalisation cellulaire et du basket-ball.

Merci au personnel des services communs de l'IGMM, et en particulier à celui de l'animalerie. Chantal et Eric, votre disponibilité et votre compétence m'ont bien aidé et beaucoup appris. Mention spéciale à Karim « injector » Chebli, sans qui la transgénèse à l'IGMM...

Valérie Fraulob, du laboratoire de Pascal Dollé, m'a enseigné la technique d'hybridation *in situ*. Merci à tous les deux. Lors de ce séjour à Strasbourg, j'ai reçu un accueil chaleureux de la part en particulier de

Jérôme, Claire et Julien, que je n'oublierai pas. Jean-Christophe n'y est certainement pas étranger !

J'ai partagé beaucoup de moments agréables avec les voisins du CRBM, essentiellement avec les groupes de Philippe Fort et Anne Debant. Spéciale dédicace à Manu Militari, pour notre vieille amitié et toutes les fois où tu m'as sauvé la vie (pas seulement à la guerre). Tu as aussi partagé la lourde tâche de relire mon manuscrit avec Séverine B.

Je ne remercierai jamais assez les gens qui m'ont permis de collaborer à leurs travaux : Laurent Fagni et Julie Perroy, Anne Blangy et Marion de Toledo, Alex Philips. J'ai apprécié le dépaysement thématique et le travail en groupe, ce qui n'est pas arrivé sur mon propre projet.

Merci à l'ensemble du groupe *oncogènes et cycle cellulaire* et en particulier à Annick, qui m'a dépanné pour les génotypages pendant l'écriture de ce manuscrit, et à Evgenia, pour l'*in situ* « froide ».

Marc Piechaczyk m'a fait profiter de ses réflexions sur la génétique de *c-fos* chez la souris. Merci, ce fut bien utile.

Le Ministère qui Change de Nom Tout le Temps et la Ligue Nationale Contre le Cancer m'ont financé pendant ces quatre années éprouvantes, ce qui m'a donné une sérénité très appréciable.

Enfin, je me dois de remercier tous ceux qui ont participé au maintien de ma santé mentale hors du labo : mes parents et mon frère, Julie évidemment, et tous les potes qui m'ont fait oublier les manips foireuses dans des bringues, des randos, et autres activités vitales comme le basket.

Avant-propos

Dans toutes les cellules eucaryotes, l'expression des gènes codant des protéines (gènes de classe II) doit être adaptée à l'environnement cellulaire, l'ensemble des signaux intra- et extracellulaires qui sont autant d'informations à intégrer pour élaborer un destin cellulaire. L'expression génique est donc le résultat de l'intégration de toutes les voies de signalisation activées ou réprimées par ces signaux (adhérence, facteurs de survie, de croissance, stimulations diverses,...) à un moment donné.

Bien que certains facteurs de base de la transcription de classe II puissent être réglés par des signaux, la spécificité de contrôle repose souvent sur la combinatoire de facteurs spécifiques présents sur le promoteur et sur leur état d'activation.

Un de ces facteurs, AP-1 (Activator Protein-1), fut parmi les premiers découverts. Il contrôle un grand nombre de gènes en réponse à des signaux très divers. Dans la première partie de ce travail je décrirai ces facteurs AP-1 en essayant d'expliquer cette grande flexibilité, qui repose entre autres sur l'aspect multigénique de cette famille. Je me concentrerai ensuite sur c-Fos, un de ces facteurs, en développant surtout sa régulation transcriptionnelle qui est d'une sophistication telle qu'elle en fait un modèle de l'intégration des signaux sur un promoteur. Enfin, je détaillerai particulièrement le contrôle de cette transcription, non plus par les séquences en amont du démarrage, mais par des régions intragéniques.

Ainsi, je développerai les deux thèmes qui ont animé mon travail de thèse : le contrôle de l'élongation de l'ARNm de *c-fos* par le calcium et l'existence d'un nouveau promoteur dans le premier intron du gène.

Abréviations

Ad2MLP	<i>Adenovirus 2 Major Late Promoter</i>
AMPc	<i>Adenosine MonoPhosphate cyclique 2'-5'</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
bZIP	<i>basic region-leucine ZIPper</i>
CaM	<i>CalModulin</i>
CaMK	<i>Ca²⁺/CaM-dependent protein Kinase</i>
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CMH	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
CMV	<i>CytoMegaloVirus</i>
CRE	<i>Ca²⁺/cAMP Response Element</i>
CREB	<i>Ca²⁺/cAMP Response Element Binding protein</i>
CREM	<i>Ca²⁺/cAMP Response Element Modulator</i>
CTD	<i>RNA polymerase II Carboxy-Terminal Domain</i>
DAG	<i>DiAcylGlycérol</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent Protein Kinase</i>
dFRA	<i>drosophila Fos-Related Antigen</i>
dJRA	<i>drosophila Jun-Related Antigen</i>
DRB	<i>5, 6-dichloro-1-β-d-ribofuranosylbenzimidazole</i>
DRE	<i>Downstream Regulatory Element</i>
DREAM	<i>Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
DSIF	<i>DRB Sensitivity Inducing Factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ES	<i>Embryonic Stem (cells)</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FACT	<i>FAcilitates Chromatin Transcription</i>
FAM	<i>Fos Activation Modules</i>
FAP	<i>Fos AP-1-like site</i>
FBJ-MSV	<i>Finkel-Biskis-Jinkins Mouse Sarcoma Virus</i>
FBR-MSV	<i>Finkel-Biskis-Reilly Mouse Sarcoma Virus</i>
FIZ	<i>Fos Intron lacZ</i>
FIRE	<i>Fos Intragenic Regulatory Element</i>
FRA	<i>Fos-Related Antigen</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>
HAT	<i>Histone Acetyl Transferase</i>
HDAC	<i>Histone DeACetylase</i>
HOB	<i>HOmology Box</i>
HSF1	<i>Heat Shock Factor 1</i>
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
ID1	<i>Inhibitor Domain 1</i>
IEG	<i>Immediate Early Gene</i>
JAK	<i>Janus-Kinase</i>

JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KO	<i>Knock-Out, invalidation génique par recombinaison homologue</i>
LM-PCR	<i>Ligation-Mediated PCR</i>
LPA	<i>Lyso-Phosphatidic Acid</i>
LPS	<i>LipoPolySaccharide</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MADS box	<i>MCMI/Agamous/Deficiens/SRF box</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPKAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase</i>
MEF	<i>Mouse Embryo Fibroblasts</i>
MKP-1	<i>MAP-Kinase Phosphatase-1</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteases</i>
MT	<i>MétalloThionéine</i>
MVM	<i>Minute Virus of Mice</i>
NELF	<i>Negative ELongation Factor</i>
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
PABP	<i>PolyA-Binding Protein</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol 3-Kinase</i>
PKA	<i>cAMP-dependent Protein Kinase</i>
PKC	<i>Calcium and phospholipids-dependent Protein Kinase</i>
PKR	<i>dsRNA-activated Protein Kinase</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
Pol II	<i>RNA Polymérase II</i>
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of CDNA Ends</i>
RSK	<i>pp90 Ribosomal S6-Kinase</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SIE	<i>v-sis-conditioned medium Inducible Element</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors</i>
SNF	<i>Sucrose Non-Fermenting</i>
SRE	<i>Serum Response Element</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SWI	<i>Mating type SWItching</i>
TBP	<i>TATA box-Binding Protein</i>
TCF	<i>Ternary Complex Factor</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
tk-RL	<i>thymidine kinase promoter-Renilla Luciferase</i>
TPA	<i>12-O TetradecanoylPhorbol 13-Acetate</i>
TRE	<i>TPA-Responsive Element</i>
U.V.	<i>Ultra-Violet</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>
X-Gal	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl _-D-GalactoPyranoside</i>
YY1	<i>Ying-Yang 1</i>

Table des Matières

INTRODUCTION	7
I. Le complexe AP-1	8
<u>1. Structure et propriétés biochimiques</u>	<u>8</u>
1.1. Structure	8
1.2. Interaction avec l'ADN	8
1.3. Interactions protéine-protéine	8
1.4. Transactivation	9
<u>2. Régulation d'AP-1</u>	<u>11</u>
<u>3. Cibles et rôles biologiques</u>	<u>12</u>
3.1. Prolifération	12
3.2. Transformation	12
3.3. Apoptose	12
3.4. Approche Génétique	13
3.5. Conclusion	13
II. c-Fos : structure, régulation et fonctions	15
<u>1. Structure et modifications de la protéine c-Fos</u>	<u>15</u>
1.1. Modules	15
1.2. Modifications	15
1.3. Interactions protéine-protéine : deux exemples	17
<u>2. Régulation</u>	<u>18</u>
2.1. Expression in vivo	18
2.1.1. Expression au cours du développement	18
2.1.2. Expression chez l'adulte	18
2.2. Aspects cinétiques	19
2.3. Régulation post-transcriptionnelle	19
2.4. Régulation post-traductionnelle	20
<u>3. Fonctions in vivo</u>	<u>20</u>
3.1. Découverte	20
3.2. Transformation	20
3.3. c-fos et tumeurs spontanées	21
3.4. Analyse génétique des fonctions de c-fos	22

3.4.1. Expression ectopique	22
3.4.2. Invalidation génique	23
3.4.2.1. Dans les cellules	23
3.4.2.2. Chez la souris	23
3.4.2.3. Compensation et correction phénotypique	26
<u>4. Conclusion</u>	<u>27</u>
III. Régulation transcriptionnelle de c-fos	28
<u>1. Démarrage de la transcription : sites, facteurs et voies</u>	<u>28</u>
1.1. c-fos et structure de la chromatine	28
1.2. Le promoteur	30
1.2.1. Serum Response Element, SRE	30
1.2.2 Ca ²⁺ /cAMP Response Element, CRE	30
1.2.3. Autres sites	31
1.2.4. Signalisation et transcription de c-fos : fig. 7	34
1.2.5. Conclusion	34
<u>2. Calcium et induction de c-fos</u>	<u>35</u>
Publication n°1 : Flux calciques et expression génique	36
Discussion de la publication n°1	62
<u>3. Elongation de la transcription</u>	<u>63</u>
3.1. Elongation de la transcription : aspects généraux	63
3.1.1. La transcription n'est pas un processus continu	63
3.1.2. Rôle du CTD de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II	63
3.1.3. Principaux facteurs d'élongation	65
3.1.3.1. Les freins	65
3.1.3.2. Les accélérateurs	65
3.1.3.3. Conclusion	70
3.2. Régulation de l'élongation de la transcription de c-fos	71
3.2.1. Premiers indices	71
3.2.2. Un blocage de l'élongation répandu in vivo	71
3.2.3. Stimulus affectant le blocage de transcription	71
3.2.4. Séquences requises	72
3.2.5. Pause ou terminaison prématurée?	72
3.2.6. Le cas de la séquence FIRE	73

RESULTATS	75
I. Calcium et blocage de la transcription de c-fos	76
<u>1. Introduction et résumé de la publication n°2</u>	<u>76</u>
<u>2. Publication n°2: A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site</u>	<u>78</u>
<u>3. Discussion de la publication n°2</u>	<u>87</u>
3.1. Mécanisme du blocage de transcription	87
3.2. Signalisation calcique	87
3.3. Rôle de ce niveau de régulation	88
II. Un nouveau promoteur dans le premier intron?	90
<u>1. Premiers arguments et données in silico</u>	<u>90</u>
<u>2. Données in vitro et ex vivo</u>	<u>92</u>
2.1. La région d'intérêt se lie à des protéines in vitro	92
2.2. Le site TRE est occupé dans des fibroblastes en culture	92
2.3. En transfection transitoire le fragment d'intérêt a une activité promotrice	95
<u>3. Données in vivo</u>	<u>97</u>
3.1. Détection du messager intronique	97
3.2. Expression au cours du développement : souris transgéniques	101
<u>4. Conclusion</u>	<u>104</u>
<u>5. Discussion</u>	<u>104</u>
5.1. Difficultés rencontrées et restrictions	104
5.2. Rôle de ce promoteur alterne?	106
DISCUSSION GENERALE	108
BIBLIOGRAPHIE	111
ANNEXES	130
ANNEXE I - Publication n°3	131
ANNEXE II - Publication n°4	132
ANNEXE III - Publication n°5	133
ANNEXE IV - Les voies MAP-Kinases	134

INTRODUCTION

I. Le complexe AP-1

1. Structure et propriétés biochimiques

1.1. Structure

Le complexe AP-1 est un facteur de transcription composé des protéines des familles Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) et Jun (c-Jun, JunB, JunD). Ces facteurs font partie de la superfamille bZIP : leur structure comprend une région basique (b) de liaison à l'ADN et un *leucine zipper* (ZIP) responsable de leur dimérisation (fig. 1). Cette "glissière à leucines" a une structure *coiled coil* (en hélice enroulée) formée par l'interaction étroite des hélices α des deux partenaires. La répétition des leucines tous les 7 résidus (fig. 1) permet de les orienter vers la surface de dimérisation et de créer des liaisons hydrophobes fortes, alors que les résidus chargés forment des liaisons ioniques stabilisatrices.

Leur séquence primaire contient aussi des domaines de transactivation de la transcription et des sites de phosphorylation ciblés par différentes kinases, ce qui permet leur régulation par divers signaux.

1.2. Interaction avec l'ADN

AP-1 se fixe sur les séquences correspondant au palindrome consensus heptamérique **TGA(C/G)TCA**, présentes sur les promoteurs d'un grand nombre de gènes. Cette séquence est proche de l'octamère TGACGTCA, cible des membres de la famille CREB/ATF/CREM. La séquence-cible d'AP-1 est aussi appelée TRE (*TPA-responsive Element*), car le TPA active la PKC (Protéine Kinase C) en mimant le DAG (DiAcylGlycérol), et la PKC active AP-1. Cependant, beaucoup d'autres signaux que la PKC activent la transcription sous le contrôle d'AP-1. La fixation de dimères Fos-Jun a lieu sur le grand sillon de l'ADN et peut se faire dans les deux orientations possibles (fig. 2, Glover and Harrison, 1995).

1.3. Interactions protéine-protéine

D'autres protéines bZIP (les Maf et certains ATF) peuvent interagir avec Fos et/ou Jun pour cibler de nouvelles séquences (Hai and Curran, 1991). Au contraire des Fos, les Jun peuvent former des homodimères, et des hétérodimères avec certains ATF. L'immense combinatoire apportée par la variété et l'état d'activation des membres de la famille AP-1 permettrait d'assurer la spécificité de réponse à différents signaux. Cependant, il est probable

que dans de nombreux cas les différences entre les membres d'AP-1 ne suffisent pas pour expliquer la diversité des effets de ce facteur. Il a donc été proposé que des interactions avec d'autres facteurs de transcription présents sur les promoteurs des gènes-cibles puissent apporter un degré supplémentaire de modulation. C'est le cas par exemple des facteurs NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) qui activent certains promoteurs en coopération avec AP-1 sur des sites composites présentant une faible affinité pour AP-1 en l'absence de ces cofacteurs. Ainsi, AP-1 ferait partie de différents complexes intégrant des signaux distincts pour obtenir des réponses spécifiques, selon le voisinage d'autres facteurs sur le promoteur.

Un autre type d'interaction a été abondamment étudié, et caractérisé en détail pour les récepteurs des glucocorticoïdes (GR). Dans ce cas le contact entre les GR et AP-1 dépend de l'hormone et intervient sans nécessité de liaison à l'ADN ; il a pour résultat l'inhibition mutuelle de ces deux facteurs de transcription (Lucibello et al., 1990).

1.4. Transactivation

Les complexes AP-1 sont principalement des activateurs de transcription. Ils peuvent directement interagir avec la machinerie basale de transcription (Metz et al., 1994) ou avec des coactivateurs pourvus d'activités susceptibles de décompacter localement la chromatine (CBP, *CREB-Binding Protein* : Bannister and Kouzarides, 1995, SRC-1 : Lee et al., 1998). Il est bien connu que ces relâchements locaux de la chromatine par acétylation des histones sont associés à l'activation génique, notamment pour les IEG (*Immediate Early Genes*) pour lesquels cet effet est le plus spectaculaire. De plus, un dimère Fos/Jun peut complètement "démonter" un nucléosome *in vitro* (Ng et al., 1997). Cet effet est probablement dû à la courbure qu'AP-1 inflige à l'ADN (Kerppola and Curran, 1991) dans le sens inverse de son enroulement sur un nucléosome. A nouveau cela va dans le sens d'une activation du promoteur ciblé, car Ng et coll. montrent que ce phénomène permet la fixation d'autres facteurs de transcription.

Toutefois AP-1 peut aussi avoir des activités de répresseur. Pour d'autres activateurs de la transcription on découvre qu'ils peuvent, en fonction des conditions, recruter des activités HAT (Histone Acétyl Transférase) ou HDAC (Histone DésAcétylase), et ainsi passer du mode activateur à celui de répresseur. Il est vraisemblable que ce mécanisme soit général et concerne aussi AP-1. Ainsi AP-1 recruterait SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors*), un corépresseur interagissant avec des HDAC (Lee et al., 2000).

Basic Region					Leucine Zipper					
									\$	
c-Jun	257	RKRMRNR	IAA	SKCRERKLER	IARLEEKVKT	LKAQNSLAS	TANMLREQVA	QLKQKVMNHV		316
JunB	273	RKRLRNRL	IAA	TKCRERKLER	IARLEEDKVKT	LKAENAGLSS	TAGLLREQVA	QLKQKVMTHV		332
JunD	273	RKRLRNRL	IAA	SKCRERKLER	ISRLEEKVKT	LKSQNTLAS	TASLLREQVA	QLKQKVLSHV		332
dJRA	217	RKRQRNR	VAA	SKCRERKLER	ISELEDRVKV	LEGENVDLAS	IVENLKDHYA	EYKQQVMEHI		276
c-Fos	142	IRRRERN	MAA	AKCRNRRREL	TDTLQAETDQ	LEDEKSALQT	EIANLLKEKE	KLEFILAAHR		201
FosB	160	YRRERN	ELAA	AKCRNRRREL	TDRLQAETDQ	LEEKAELES	EIAELQKEKE	RLEFVLVAHK		219
Fra1	110	YRRERN	ELAA	AKCRNRRREL	TDFLQAETDK	LEDEKSGLQR	EIEELQKEKE	RLELVLEAHR		169
Fra2	129	IRRRERN	ELAA	AKCRNRRREL	TEFLQAETEE	LEEKSGLQK	EIAELQKEKE	KLEFMLVAHG		188
dFRA	263	YRRERN	ECAA	ARCRERRYDQ	TNELTEEVEQ	LEKRGESMRK	EIEVLTNSKN	QLEYLLATHR	\$	322
GCN4	232	--RARNT	EAA	RRSRARKLQR	MQLEDKVEE	LISKNYHLEN	EVARLKKLVG	ER		281

Figure 1: Alignement des domaines bZIP des membres majeurs d'AP-1, montrant la conservation des heptades de leucines et du domaine basique jusque dans les homologues fonctionnels d'AP-1 chez la drosophile (dJRA et dFRA) et de la levure (GCN4). D'après F. Keith Junius, thèse (http://life.nthu.edu.tw/~b830473/Chapter_1.html).

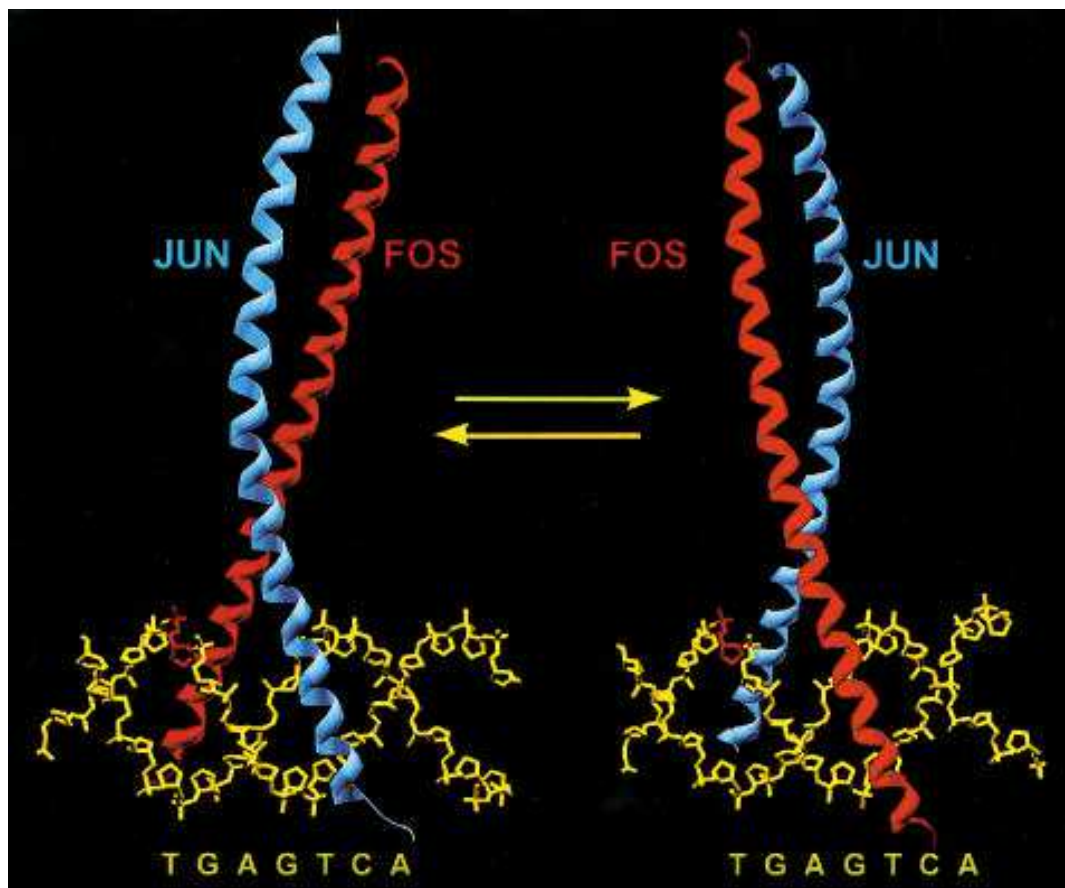


Figure 2 : Un hétérodimère Fos/Jun se lie au site AP-1 dans les deux orientations.

Les domaines bZIP de Fos et Jun sont représentés respectivement en rouge et bleu. Le squelette sucre-phosphate de l'ADN est en jaune, ainsi que la séquence consensus AP-1. Cette figure représente les deux possibilités d'orientation du dimère AP-1 sur sa cible nucléaire, et suggère que selon cette orientation des interactions entre Fos ou Jun et d'autres facteurs de transcription seront possibles ou pas. Glover and Harrison, 1995.

2. Régulation d'AP-1

L'induction d'AP-1 par de très nombreux signaux pose la question de la spécificité de réponse à chaque stimulation, et il est vraisemblable que cette sélectivité soit permise par les différences de régulation entre les divers membres de la famille.

Cette régulation intervient à tous les niveaux imaginables, et surtout dans le contrôle de l'abondance relative des différents membres d'AP-1: transcription, stabilité du messenger, traduction, stabilité de la protéine. Cependant, les modifications post-traductionnelles (principalement phosphorylation) sont celles qui permettent à AP-1 d'intégrer rapidement les signaux cellulaires afin d'élaborer une réponse adaptée par l'activation de gènes-cibles.

Alors que chez la drosophile, les MAP-Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) DJNK (*Basket*) et ERK (*Rolled*) phosphorylent à la fois DJun et DFos (*kayak*) (Ciapponi et al., 2001; Kockel et al., 2001), il existe plus de différences fonctionnelles entre Fos et Jun chez les mammifères : JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) phosphoryle Jun et non Fos, qui ne possède pas de domaine ∂ (*JNK docking domain*). Ainsi, c-Jun est phosphorylé sur les sérines 63 et 73 par JNK en réponse aux stress (en particulier le rayonnement U.V) ou aux cytokines, suite à l'activation d'un module MAP-Kinase distinct de celui qui débouche sur ERK (Derijard et al., 1994; Hibi et al., 1993). Ces phosphorylations augmentent la transactivation par c-Jun et son interaction avec le coactivateur CBP (Arias et al., 1994). Elles semblent aussi requises pour la transformation par Ras dans certains systèmes (Behrens et al., 2000) mais pas dans les cellules aviaires (Metivier et al., 1993). Cependant, lorsque c-Jun endogène est remplacé (par recombinaison homologue, *knock-in*) par une version dont les sérines 63 et 73 sont mutées en alanines, les souris résultantes survivent et n'ont que des défauts relativement mineurs de prolifération et d'apoptose neuronale (Behrens et al., 1999). Cela relativise l'importance de ces sérines lorsque l'on compare ce phénotype à celui des souris KO (*Knock-Out*) pour c-Jun (Eferl et al., 1999, voir tableau 1) qui meurent très tôt de multiples malformations (cœur, foie,...).

Bien que c-Fos possède de nombreux sites potentiels de phosphorylation, (voir §II.1, structure et modifications de c-Fos) l'importance biologique des Fos-kinases est controversée.

Il semble que le niveau majeur de régulation soit l'abondance du messenger et de la protéine, qui sont contrôlées par des mécanismes multiples et très rapides. Ceci est confirmé

par des résultats de correction phénotypique du groupe d'Erwin Wagner (§II.3.4.2.3, Fleischmann et al., 2000). La régulation de *c-fos* sera traitée §II.2 et III.

3. Cibles et rôles biologiques

3.1. Prolifération

Très tôt le lien entre AP-1 et prolifération a été suggéré par le fait qu'il est activé par les mitogènes et son rôle dans l'activation de gènes de prolifération. Les cibles des facteurs AP-1 sont très nombreuses, et comprennent par exemple les métalloprotéinases de matrice (MMP : collagénase I, stromélysine-3,...) et la cycline D1. La complexité de l'identité d'AP-1 rend difficile l'interprétation de ces données. Cependant, l'utilisation de fibroblastes dans lesquels l'expression ou l'activité des Fos ou des Jun est compromise, par des anticorps bloquants (Kovary and Bravo, 1991) ou par invalidation génique (Brown et al., 1998; Johnson et al., 1993) a montré qu'ils étaient requis pour la progression en phase G1 du cycle cellulaire et pour l'expression de cycline D1, en réponse au sérum ou aux facteurs de croissance. D'une façon générale, il semble qu'AP-1 permette la réponse à de nombreuses stimulations en activant rapidement la transcription de gènes requis pour les étapes plus tardives de la prolifération cellulaire.

3.2. Transformation

Les membres d'AP-1 ont été impliqués dans différentes étapes de la tumorigénèse (Jochum et al., 2001) comme le suggéraient leurs cibles (les MMP sont utiles à une cellule qui veut digérer la matrice extracellulaire pour envahir de nouveaux tissus). Il semble que leur potentiel à transformer des cellules soit lié à leurs propriétés de transactivation. En effet, *c-Fos* et *FosB* sont transformants (Jenuwein and Muller, 1987; Miller et al., 1984; Schuermann et al., 1989) et transactivent, alors que *Fra-1* et *Fra-2*, pour lesquels on n'a pu montrer d'activité transactivatrice, ne transforment pas (ou peu) les cellules (Bergers et al., 1995; Wisdom and Verma, 1993).

La transformation oncogénique induite par *ras* requiert *c-jun* (Johnson et al., 1996), alors que *JunB* et *JunD* semblent au contraire inhiber la transformation (Jochum et al., 2001).

3.3. Apoptose

Les fibroblastes *c-fos*^{-/-} et les *c-jun*^{-/-} sont plus sensibles à l'apoptose induite par irradiation U. V (Schreiber et al., 1995; Wisdom et al., 1999). Cela suggère que ces facteurs

ont un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par les U. V, vraisemblablement en permettant la mise en place de systèmes de survie ou de réparation. Dans d'autres conditions et types cellulaires, AP-1 aurait un effet positif sur l'apoptose (Shaulian and Karin, 2001). Cette apparente contradiction vient sans doute du fait que des membres d'AP-1 différents sont impliqués.

3.4. Approche Génétique

Les fonctions des facteurs AP-1 chez la souris ont été recherchées par invalidation génique et surexpression chez la souris. Les tableaux 1 et 2, respectivement, résument ces résultats. De façon étonnante, les phénotypes sont très divers, et seuls les KO de Fra-1 et JunB ont des phénotypes très semblables, vraisemblablement dus à un défaut de vascularisation du placenta. Cela suggère que ces deux facteurs ont des rôles similaires dans le développement précoce, mais qu'ils ne sont pas interchangeables puisqu'ils ne se compensent pas.

Alors que certains membres d'AP-1 sont essentiels pour le développement embryonnaire (comme c-Jun, Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993), d'autres semblent avoir des rôles plus restreints (par exemple FosB). Cependant, dans ces derniers cas il est fort probable que n'apparaissent que les fonctions pour lesquelles d'autres Fos/Jun ne peuvent pas compenser. D'autre part, des phénotypes aussi discrets que celui des mères FosB ^{-/-}, qui ne s'occupent pas de leurs portées (Brown et al., 1996), ont pu échapper à des investigateurs moins attentifs dans d'autres KO.

Ces expériences de KO renseignent donc sur les rôles exclusifs de chaque facteur, ceux pour lesquels aucun autre ne peut s'y substituer, malgré la conservation importante au sein de la famille AP-1. Ainsi, les cellules ES et les fibroblastes c-fos ^{-/-} fosB ^{-/-} ont une prolifération ralentie, et l'induction de cycline D1 par les facteurs de croissance est inefficace (Brown et al., 1998), alors que les cellules mutées pour un seul de ces gènes n'ont pas ces défauts de prolifération (Field et al., 1992; Gruda et al., 1996).

Il est plus difficile de comparer les expériences d'expression forcée ou ectopique (tableau 2) car elles ont été menées avec des promoteurs différents. On peut toutefois noter que dans la famille Fos, les os semblent constituer une cible privilégiée. Dans le cas de c-fos le KO confirme ce tropisme (tableau 1).

3.5. Conclusion

De nombreux rôles ont été proposés pour AP-1, dans la prolifération et la tumorigénèse, mais aussi dans la différenciation et l'apoptose. L'apparente divergence de ces

données reflète (entre autres) la diversité des fonctions des différents membres des familles Fos et Jun. AP-1 constitue donc une famille utilisant des mécanismes semblables pour répondre à un signal par une activation génique adaptée, mais les tropismes des membres de cette famille sont différents. Ceci est sans doute dû à la variabilité de facteurs auxiliaires qui vont introduire une spécificité tissulaire.

Tableau 1: Résumé des expériences d'invalidation génique des membres d'AP-1 chez la souris (d'après Jochum et al., 2001)

	Phénotype	Organes/cellules affectés	Références
c-Fos	Ostéopétrose	Os / ostéoclastes	Wang et al. 1992, Johnson et al. 1992
FosB	Défaut d'instinct maternel	Cerveau / hypothalamus	Gruda et al. 1996, Brown et al. 1996
Fra-1	Mort embryon E9.5	Tissus extra-embryonnaires + placenta	Schreiber et al. 2000
Fra-2	<i>Non publié</i>		
c-Jun	Mort embryon E12.5	Foie / Hépatoblastes+Coeur	Hilberg et al. 1993, Johnson et al. 1993 Eferl et al. 1999
JunB	Mort embryon E8.5 à E10	Tissus extra-embryonnaires + placenta	Schorpp-Kistner et al. 1999
JunD	Stérilité des mâles	Testicule / spermatogenèse	Thepot et al. 2000

Tableau 2 : Résumé des expériences d'expression forcée des membres d'AP-1 chez la souris (d'après Jochum et al., 2001)

	Promoteur	Phénotype	Organes/cellules affectés	Références
c-Fos	H2kb	Ostéosarcome	Os/ostéoblastes	Grigoriadis et al. 1993
FosB	H2kb	Aucun		Grigoriadis et al. 1993
ΔFosB	TCRb	Défaut différenciation lympho T	Thymus/ thymocytes immatures	Carrozza et al. 1997
	NSE	Ostéosclérose	Os/ostéoblastes	Sabatakis et al. 2000
Fra-1	H2kb	Ostéosclérose	Os/ostéoblastes	Jochum et al. 2000
Fra-2	CMV	Malformations oculaires	Oeil/ structures antérieures	McHenry et al. 1998
c-Jun	H2kb	Aucun		Grigoriadis et al. 1993
JunB	Ubiquitin C	Aucun		Schorpp et al. 1996
	CD4	Maturation des Th2 augmentée	Thymus/ thymocytes CD4+	Li et al. 1999
JunD	<i>Non publié</i>			

II. c-Fos : structure, régulation et fonctions

1. Structure et modifications de la protéine c-Fos

1.1. Modules

c-Fos est une protéine de 380 aa composée de 5 domaines de transactivation ou *Fos Activation Modules* (fig. 3, FAM) encadrant le domaine bZIP qui est central. En effet, c-Fos est une protéine modulaire, comme c-Jun et CREB (Ransone et al., 1990) et bien d'autres, ce qui permet d'évaluer les rôles de chaque module en construisant des chimères. Ainsi, on peut tester la capacité de transactivation d'un module en le fusionnant avec un domaine de liaison à l'ADN de type Gal4, dans un système hétérologue. Certains FAM contiennent un motif appelé HOB (*HOmology Box*, Sutherland et al., 1992), que l'on trouve conservé dans c-Jun (HOB1 et 2) et C/EBP (HOB2). Le domaine HOB1 de c-Jun contient la ser73, une cible de JNK (voir §I.2). Dans Fos, HOB1-C et HOB2 sont inefficaces séparément mais coopèrent en transactivation sur un rapporteur artificiel. Dans ce système, les HOB de Fos et Jun sont interchangeables (Sutherland et al., 1992).

Un domaine inhibiteur a aussi été repéré par des méthodes semblables : appelé ID1 (*Inhibitor Domain 1*), il réprime spécifiquement l'activation par les domaines contenant le motif HOB1 situés sur la même protéine. Ce domaine agirait par interaction avec une protéine que l'on peut titrer en surexpression et qui reste à identifier (Brown et al., 1995).

La présence dans c-Fos d'autant d'unités élémentaires de transactivation capables de coopérer suggère que ce facteur est lui même un intégrateur en plus de ses possibilités de dimérisation. En effet, l'activation sélective des domaines d'interaction avec des facteurs de transcription (généraux et spécifiques) et des coactivateurs permet une nouvelle combinatoire permettant de raffiner l'effet final sur l'expression génique.

1.2. Modifications

Fos apparaît sur un gel dénaturant sous forme d'une traînée, ce qui suggère qu'il est abondamment modifié. Effectivement, les kinases phosphorylant c-Fos *in vitro* sont nombreuses : cdc2, PKA (*cAMP-dependent Protein Kinase*), PKC (*Calcium and phospholipids-dependent Protein Kinase*, Abate et al., 1991), ERK1 (*Extracellular signal-*

Regulated Kinase), DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*, Abate et al., 1993). L'effet de ces modifications sur l'activité de Fos a rarement été démontré, et la signification biologique de ces phosphorylations reste mystérieuse. L'utilisation de mutants *in vivo*, comme cela a été entrepris pour Jun, permettrait d'estimer le rôle de ces sites de phosphorylation.

FAM5 a été identifié comme un domaine activateur (Funk et al., 1997; McBride and Nemer, 1998). Il est phosphorylé *in vitro* et *in vivo* par Rsk (*pp90 Ribosomal S6-Kinase*) et ERK (Abate et al., 1991; Chen et al., 1993) de manière coopérative sur (respectivement) ser362 et 374, ce qui augmente ses facultés d'activation transcriptionnelle (Abate et al., 1991; Chen et al., 1993). FAM5 semble aussi avoir un potentiel inhibiteur, sous forme d'une transrépression de Fos sur son propre promoteur (Sassone-Corsi et al., 1988). Cependant, le caractère inhibiteur de FAM5 est très controversé : son activité de transrépression sur le promoteur de *c-fos* a été montrée par expression forcée (Lucibello et al., 1989; Sassone-Corsi et al., 1988; Wilson and Treisman, 1988), et l'inhibition obtenue pourrait être due à la séquestration de coactivateurs par le domaine surexprimé (Cahill, 1997). En effet, FAM5 contient les domaines d'interaction avec TBP (*TATA box-Binding Protein*, Metz et al., 1994) et CBP (Bannister and Kouzarides, 1995) et l'effet ne nécessite pas la liaison à l'ADN (Lucibello et al., 1989) : il se pourrait donc que ce phénomène soit un artefact de surexpression, ou qu'il soit utilisé dans la cellule lorsque de très forts niveaux de c-Fos sont exprimés. De plus, dans les fibroblastes dépourvus de protéine c-Fos, le messenger issu du locus recombiné est induit et réprimé normalement (Brusselbach et al., 1995).

Le motif HOB1-C est lui aussi phosphorylé par une MAPK sur la thr232, équivalent de la ser73 de c-Jun. Cette modification serait requise pour son activité (Bannister et al., 1994).

La localisation subcellulaire de Fos varie en fonction des signaux : dans les fibroblastes privés de sérum, Fos transfecté réside dans le cytoplasme, ce qui suggère qu'un mécanisme de translocation ou de dégradation différentielle participe à sa régulation (Roux et al., 1990). Le NLS représenté sur la figure 3 n'est sans doute pas le seul car Tratner et coll. ont montré qu'il n'était pas nécessaire pour la localisation nucléaire de Fos (Tratner and Verma, 1991).

La cys154 est conservée dans le domaine basique de liaison à l'ADN de tous les Fos/Jun (fig. 1). Son état d'oxydo-réduction influence les propriétés de liaison à l'ADN d'AP-1 *in vitro* (Abate et al., 1990). La signification biologique de cette régulation demeure obscure.

En plus du domaine bZIP, les aa 1 à 84 sont requis pour la différenciation ostéoclastique (Matsuo et al., 2000).

Le fait que chaque FAM puisse répondre à des signaux en modifiant l'activité de c-Fos apporte un niveau supplémentaire de régulation. Le niveau suivant émane des interactions de c-Fos avec d'autres protéines.

1.3. Interactions protéine-protéine : deux exemples

Fos interagit avec un grand nombre de facteurs de transcription (généraux ou spécifiques) et de coactivateurs, directement ou à travers son partenaire de dimérisation. Le plus souvent il s'agit de facteurs qui coopèrent avec AP-1 sur un même promoteur, comme c'est souvent le cas pour les facteurs NF-AT. Cette interaction, outre le niveau supplémentaire de complexité et de finesse qu'elle apporte, est requise pour une réponse immunitaire correcte des lymphocytes (Macian et al., 2001).

Parmi les interactions les plus documentées figure celle d'AP-1 avec les récepteurs nucléaires, et surtout les récepteurs des glucocorticoïdes (Herrlich, 2001). Cette interaction a pour résultat l'inhibition mutuelle des activités de ces deux facteurs de transcription, et ne requiert ni la dimérisation, ni la liaison à l'ADN des GR. Du côté d'AP-1, cette fonction nécessite un domaine N-terminal de Fos indiqué sur la figure 3 (Lucibello et al., 1990). Cette fonction annexe des GR est potentiellement intéressante, car elle pourrait permettre de découpler les effets utiles des glucocorticoïdes contre l'inflammation des effets secondaires indésirables (ostéoporose, arthrose,...).

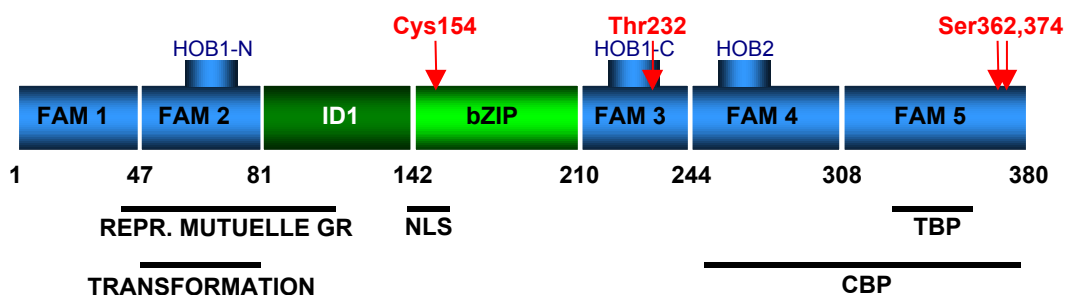


Figure 3 : Structure modulaire de la protéine c-Fos. D'après Piechaczyk and Blanchard, 1994 et Brown et al., 1995.

2. Régulation

2.1. Expression in vivo

2.1.1. Expression au cours du développement

L'expression du messager *fos* commence dès 7 jours de gestation (E7) dans l'embryogenèse des mammifères, avec des niveaux importants dans les annexes extra-embryonnaires et le placenta (Muller et al., 1983; Muller et al., 1983). Ce résultat est à rapprocher du rôle des MMP, cibles d'AP-1, dans deux processus aux mécanismes similaires : l'invasion trophoblastique et l'invasion tumorale (Bischof and Campana, 2000).

Les ARNm *fos* sont détectés dès E12 dans tout le système nerveux central, puis cette expression se restreint vers E16 : partie antérieure de la moëlle épinière, lobe olfactif, rétine, cortex et cervelet sont marqués (Caubet, 1989). Le foie et les cellules sanguines expriment aussi *c-fos* (Caubet, 1989).

Plus tard dans le développement (E17-E18), Dony et coll. (Dony and Gruss, 1987) ont détecté par hybridation *in situ* une expression dans les régions des os et du cartilage qui montrent une croissance importante à ce stade. Ce tropisme osseux fut confirmé par les études de transgénèse et recombinaison homologue (voir §II.3.4).

2.1.2. Expression chez l'adulte

L'activité c-Fos est extrêmement faible dans la plupart des tissus adultes non stimulés (Piechaczyk and Blanchard, 1994) , mais il existe des exceptions : les kératinocytes en différenciation terminale expriment de hauts niveaux de messager (Basset-Seguin et al., 1991; Dotto et al., 1986), alors qu'on associait plutôt *c-fos* à la prolifération qu'à la différenciation. Les mégacaryocytes sont une autre exception (Panterne et al., 1992), ainsi que certaines structures du cerveau (mais à un faible niveau, Smeyne et al., 1992).

Dans les autres tissus, le niveau de base est très faible mais peut être augmenté de façon spectaculaire par de nombreux signaux, stress et facteurs de croissance (Muller et al., 1984): irradiation U.V. (Devary et al., 1991), activation des lymphocytes (Kovacs et al., 1986), activité synaptique des neurones (Morgan et al., 1987), stimulations mécaniques (Sadoshima and Izumo, 1993)...

En utilisant des souris transgéniques pour une construction comprenant tout le gène *c-fos* fusionné à la β -galactosidase (LacZ), Smeyne et coll. (Smeyne et al., 1992) ont montré

que le marquage constitutif (en l'absence de stimulation) concerne surtout les os et la peau. Dans ces structures l'expression du transgène serait plus associée aux cellules en différenciation terminale qu'à celles qui prolifèrent. Ils ont même établi une corrélation entre cette expression et les prémisses de la mort cellulaire programmée (Smeyne et al., 1993). Dans le cerveau, le niveau basal est faible et restreint ; par contre, lors d'une stimulation par un agent épiléptogène comme le kaïnate, on observe une induction forte et générale, dans presque tout le cerveau (Smeyne et al., 1992).

2.2. Aspects cinétiques

L'activation de l'expression de *c-fos* par toutes sortes de stimulus est non seulement rapide mais aussi très transitoire (le maximum d'accumulation de messenger tourne autour de 30 min après stimulation, 60 min pour la protéine), et elle ne nécessite pas de néosynthèse protéique. *c-fos* fait donc partie des gènes de réponse précoce (*Immediate Early Genes*, IEG). L'étroitesse extrême de cette fenêtre d'expression suggère que *c-fos* fait l'objet d'un contrôle très serré à plusieurs niveaux.

En effet, l'expression et l'activité de Fos sont réglées de façon très stricte à de multiples niveaux : démarrage de la transcription, allongement du messenger, stabilité et traductibilité de ce dernier, et enfin stabilité et modifications de la protéine (Blanchard, 1992; Piechaczyk and Blanchard, 1994). Je traiterai ici surtout de sa régulation transcriptionnelle, tant au niveau du démarrage que de la progression des polymérase (§III).

2.3. Régulation post-transcriptionnelle

La stabilité du messenger *fos* est régulée en fonction des signaux. Cet ARNm est très labile (Fort et al., 1987), mais peut être stabilisé à la suite d'une stimulation. Ainsi, l'irradiation U. V. stabilise l'ARNm *c-fos* (Blattner et al., 2000). La traduction du messenger *fos* semble elle aussi influencer sa vitesse de dégradation (Veyrune et al., 1995; Veyrune et al., 1997; Wilson and Treisman, 1988). Le modèle suivant a été proposé : le passage des ribosomes détruirait des complexes stabilisateurs formés i) de protéines se liant aux séquences riches en AU du messenger et ii) de la PABP (*PolyA-Binding Protein*). Une fois traduit, l'ARNm serait donc rapidement déadénylé et détruit (Grosset et al., 2000).

La localisation périnucléaire de ce messenger repose sur des séquences distinctes et serait utile pour la nucléarisation rapide de la protéine Fos dès sa traduction, étant donnée la labilité de cette protéine (Dalglish et al., 2001).

2.4. Régulation post-traductionnelle

Comme le détaille le §II.1.2, la protéine c-Fos fait l'objet de modifications post-traductionnelles : nombreuses phosphorylations, oxydo-réduction de la cys154,...

Mais la stabilité de cette protéine participe aussi au maintien de l'étroite fenêtre d'expression de l'activité c-Fos. En effet, Fos est très labile et cette dégradation est en grande partie due au protéasome (Salvat et al., 1998) bien que d'autres systèmes puissent entrer en jeu. Les déterminants moléculaires de cette instabilité restent obscurs : il semble que ni les séquences PEST, ni l'ubiquitination ne soient nécessaires pour une dégradation rapide de Fos (I. Jariel, communication personnelle).

La régulation transcriptionnelle de *c-fos* fait l'objet d'un chapitre à part entière, §III.

3. Fonctions *in vivo*

3.1. Découverte

Le gène *c-fos* a été découvert suite à l'identification de deux rétrovirus oncogènes (*v-fos*), FBJ-MSV (*Finkel-Biskis-Jinkins Mouse Sarcoma Virus*) et FBR-MSV (*Finkel-Biskis-Reilly Mouse Sarcoma Virus*), provoquant des ostéosarcomes chez la souris. Ces virus avaient transduit un gène cellulaire qui fut nommé *c-fos*, recevant ainsi son appellation de proto-oncogène. Cependant, les versions virales de *fos* ont subi un certain nombre de modifications : bien sûr le promoteur est remplacé par des LTR (*Long Terminal Repeat*), mais ce n'est pas le seul changement. La 3'UTR (contenant une séquence d'instabilité du messenger) est absente, ainsi que les trois introns, et des mutations/délétions de la région codante sont apparues. Il semble donc que beaucoup d'aménagements aient été nécessaires pour donner des propriétés oncogéniques à Fos. Ceci est sans doute dû au grand nombre de niveaux de régulation qui permettent de maintenir ce gène sous un contrôle très strict. Dès sa découverte, *fos* a donc été associé à la tumorigénèse et au tissu osseux. Ce tropisme allait se confirmer lors des expériences de génétique inverse *in vivo*.

3.2. Transformation

Les virus FBJ et FBR transforment les fibroblastes en culture, qui forment alors des foyers à la morphologie particulière. Mais selon les systèmes, la protéine normale c-Fos est peu ou pas transformante. Pour la rendre efficace il faut muter une région riche en AU de la 3'

UTR (Meijlink et al., 1985) impliquée dans la dégradation du messenger (Grosset et al., 2000) et déréguler la transcription en remplaçant le promoteur par des LTR viraux (Miller et al., 1984). Ainsi, il faut une expression durable de Fos pour transformer des fibroblastes de rat 208F, et Fos stimule la croissance des cellules exponentielles sans accélérer le démarrage de cellules carencées (Miao and Curran, 1994). A l'inverse, Balsalobre et Jolicoeur (Balsalobre and Jolicoeur, 1995) trouvent que c-Fos transforme les cellules sur le plan morphologique, mais paradoxalement il aurait plutôt un effet négatif sur la croissance cellulaire, en ralentissant le passage de la phase G1.

La grande majorité des expériences de transformation cellulaire ont été conduites en utilisant les versions virales de Fos, et le plus souvent même une chimère FBJ/FBR appelée E300. Bien que ces protéines soient différentes du proto-oncogène, ces tests ont tout de même permis de cartographier les domaines requis pour la transformation. Ainsi, les domaines basique et *leucine zipper* sont nécessaires (Neuberg et al., 1991; Schuermann et al., 1989), de même que des motifs situés en N- (aa 60-84 ou HOB1-N, fig. 3) et C-terminal (aa 292-316). Tout concorde pour suggérer que l'activité transcriptionnelle de c-Fos est la base de ses facultés transformantes, y compris la coopération avec Jun (Neuberg et al., 1991).

Bakin et Curran (Bakin and Curran, 1999) proposent que le mécanisme de la transformation par Fos implique une DNA méthylase, *dnmt1*, et dépend aussi d'activités HDAC. Fos déclencherait la transformation non seulement par activation génique directe mais aussi indirectement, en dérégulant de façon plus générale la transcription.

3.3. *c-fos* et tumeurs spontanées

De façon étonnante, on trouve peu ou pas de tumeurs spontanées où *c-fos* est surexprimé (Zhang et al., 1997); ceci pourrait aussi s'expliquer par le nombre de blocages qu'il faut éliminer pour perdre la régulation de son expression ou activité (Piechaczyk and Blanchard, 1994).

Cependant des ostéosarcomes humains surexpriment c-Fos avec une fréquence de 60% (Wu et al., 1990), et d'autres études confirment cette corrélation (Gamberi et al., 1998; Wang et al., 1995).

c-Fos a d'abord été considéré comme un "interrupteur général" (*master switch*, Marx, 1987) permettant, par son activation précoce et sa qualité de facteur de transcription, de déclencher rapidement des réponses à long terme à partir de stimulations ponctuelles. Cela faisait de lui un maillon central de la réponse à toutes les stimulations, et suggérait qu'il était indispensable à beaucoup d'événements cellulaires. Cependant, les expériences de génétique chez la souris donnèrent des phénotypes moins sévères que prévu et spécifiques de tissus particuliers. Il fallut donc revoir ces notions et corriger à la baisse les modèles "fos-centristes"!

3.4. Analyse génétique des fonctions de c-fos

Dans tous les cas le système squelettique est affecté. L'établissement et le maintien de ce système repose sur un équilibre dynamique entre trois types cellulaires : les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Chondrocytes et ostéoblastes dérivent d'un précurseur commun et forment respectivement le cartilage et l'essentiel de l'os. Les ostéoclastes viennent de précurseurs hématopoïétiques de la lignée monocyttaire, et sont chargés de la résorption de l'os. Même chez l'adulte, les os sont en constant remodelage, et un déséquilibre vers la formation ou la résorption de masse osseuse peu avoir des conséquences graves (Karsenty, 1999).

3.4.1. Expression ectopique

L'expression forcée de c-fos a été menée en utilisant différents promoteurs: celui de la métallothionéine, MT (Ruther et al., 1987; Ruther et al., 1989), ou celui du CMH de classe I, H2Kb (Grigoriadis et al., 1993; Ruther et al., 1988) qui s'exprime dans une plus large gamme de tissus et à un niveau supérieur (Grigoriadis et al., 1995).

En utilisant le promoteur H2K, Ruther et coll. (Ruther et al., 1988) ont montré que les souris H2-c-fos souffrent de splénomégalie et d'anomalies du thymus, avec une différenciation accrue des lymphocytes T. Cet effet semble indirect, c-fos favorisant la croissance des cellules épithéliales du thymus.

Dans les autres études, un LTR remplace la 3'UTR de c-fos, qui contient un élément déstabilisant le messenger (voir §II.2.3), ce qui permet des niveaux d'expression bien plus élevés.

Ainsi, les souris pMT-fos-LTR montrent des lésions des os longs accompagnées d'une augmentation de l'ostéogenèse (Ruther et al., 1987). Après une période d'observation ces auteurs ont recensé des tumeurs de type ostéosarcome chondroblastique (contenant de l'os et

du cartilage) dans 20% de ces mêmes souris (Ruther et al., 1989). Les souris H2-*fos*-LTR développent aussi des tumeurs osseuses (Ruther et al., 1989) avec 100% de pénétrance dans lesquelles le type cellulaire transformé est l'ostéoblaste (Grigoriadis et al., 1993).

Enfin, les promoteurs H2K et MT étant silencieux avant la naissance, Wang et coll. (Wang et al., 1991) ont créé des souris chimériques à partir de cellules ES exprimant fortement MT-*fos*-LTR. Ces souris développent rapidement des chondrosarcomes où le principal type cellulaire transformé est le chondrocyte. Ce résultat suggère que selon le stade de développement où l'expression forcée de *fos* commence, on affecte les ostéoblastes (Grigoriadis et al., 1993) ou un précurseur commun aux ostéoblastes et aux chondrocytes (Wang et al., 1991).

3.4.2. Invalidation génique

3.4.2.1. Dans les cellules

Les cellules (ES et fibroblastes) *c-fos*^{-/-} ne présentent pas de défauts de prolifération et les cellules ES semblent se différencier correctement (Brusselbach et al., 1995; Field et al., 1992; Hu et al., 1994) mais ont une réponse aux rayonnements U. V. altérée (Schreiber et al., 1995) du point de vue de la survie mais pas de la réparation.

3.4.2.2. Chez la souris

Les souris *c-fos*^{-/-} sont viables et fertiles (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992), *c-fos* n'est donc pas essentiel pour le développement. Ce résultat constituait déjà une surprise, à l'époque où on surestimait l'importance de *c-fos* dans un grand nombre de processus vitaux. Toutefois, la complexité et la conservation de la famille *fos* suggère que d'autres facteurs peuvent compenser certaines fonctions de *c-fos*, mais pas toutes : les souris KO ont une série de déficiences qui soulignent certaines fonctions spécifiques de *c-fos* :

- Retard de croissance
- Problèmes d'hématopoïèse : lymphopénie, hématopoïèse extramédullaire (dans la rate)
- Ostéopétrose par défaut de résorption osseuse. Les cavités des os longs sont réduites de 80% et la masse osseuse plus dense (fig. 4).
- Les dents, piégées dans la masse osseuse, ne sortent pas.
- Comportement : manque de réaction à certaines sollicitations, et autres défauts mineurs (Paylor et al., 1994).

Certains de ces défauts sont indirectement liés à l'invalidation de *c-fos* : il a été montré par greffe de moëlle osseuse que les problèmes du système hématopoïétique étaient dus à l'exigüité des cavités osseuses (Okada et al., 1994). Certains comportements anormaux sont vraisemblablement dus à la difficulté de se mouvoir à cause du phénotype osseux (Wang et al., 1992).

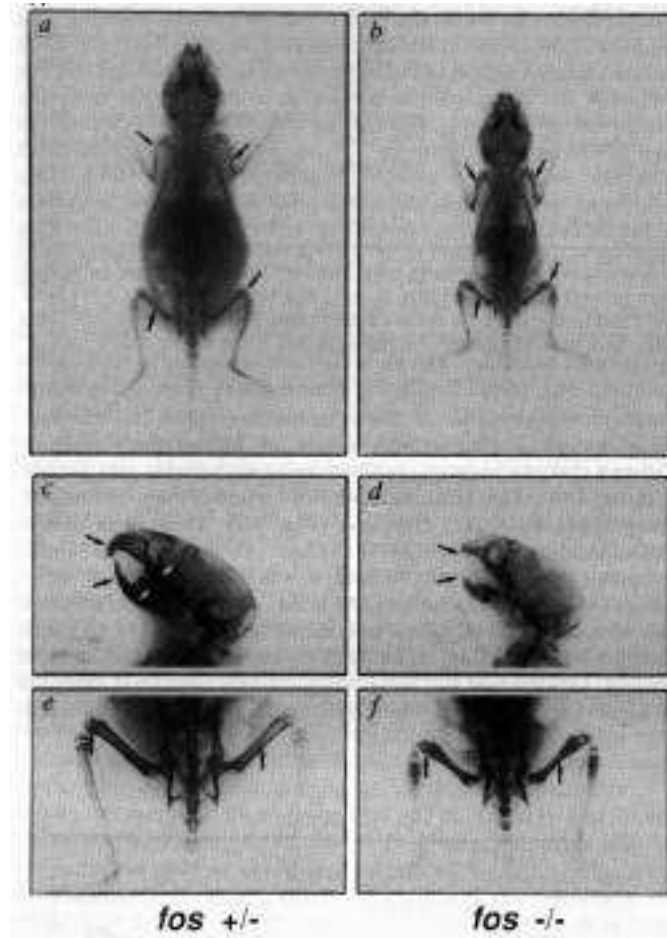


Figure 4 : Analyse par radiographie aux rayons X du squelette des souris hétérozygotes (*fos*^{+/-}; a, c, e) et homozygotes (*fos*^{-/-}; b, d, f) pour l'invalidation de *c-fos*.

Le retard de croissance est bien visible (comparer a et b). Les dents sont absentes chez les *fos*^{-/-} (c et d, flèches), et les os longs sont affectés : absence de cavité osseuse et enflure des épiphyses et métaphyses (e et f, flèches). Wang et al., 1992.

Le phénotype ostéopétritique suggère que *c-fos* est requis pour la fonction ou la différenciation des ostéoclastes. Les travaux de Grigoriadis et coll. (Grigoriadis et al., 1994) montrent une absence d'ostéoclastes et de leurs précurseurs immédiats dans ces souris. De plus, le nombre de macrophages est augmenté dans la moëlle osseuse. Or, il semble qu'ostéoclastes et macrophages aient un précurseur commun : tout concorde pour conclure que *c-fos* est nécessaire pour une étape tardive de la différenciation des ostéoclastes qui consiste en un "choix" entre ostéoclastes et macrophages à partir d'un précurseur commun.

Bien que la peau soit un domaine d'expression constitutive de *fos*, celle des souris *c-fos*^{-/-} semble normale (Saez et al., 1995). Elle peut aussi donner des papillomes (tumeur bénignes) mais ceux-ci ne deviendront jamais malins, contrairement à ceux développés par les souris "sauvages". *c-fos* est donc requis pour une étape cruciale de la tumorigénèse dans la peau.

Dans un modèle d'épilepsie (Watanabe et al., 1996), *c-fos* semble requis pour le déroulement des crises et leurs effets à long terme (synaptogénèse).

Enfin, il est nécessaire pour l'apoptose des photorécepteurs rétiniens en réponse à la lumière (Hafezi et al., 1997). Ce rôle positif de *c-fos* dans l'apoptose est paradoxal : en effet, *c-fos* est requis pour la survie des fibroblastes irradiés aux U.V. (voir §II.3.4.2.1, et Schreiber et al., 1995). Une fois de plus, la spécificité tissulaire de certains phénomènes est étonnante et complique l'attribution d'un rôle simple à *c-fos*.

3.4.2.3. Compensation et correction phénotypique

Le nombre restreint de tissus affectés par l'absence de *c-fos* était inattendu, eu égard au rôle présumé de *c-fos* dans la prolifération cellulaire. Cependant, même si la famille *fos* est requise pour la division cellulaire (Kovary and Bravo, 1991), les cellules mutées pour un seul de ces gènes n'ont pas ces défauts de prolifération (Field et al., 1992; Gruda et al., 1996; Kovary and Bravo, 1991). Par contre, les cellules ES et les fibroblastes *c-fos*^{-/-} *fosB*^{-/-} ont une prolifération ralentie (Brown et al., 1998), ce qui suggère que dans les simples mutants ils se compensent l'un l'autre.

Un autre cas de compensation, cette fois *in vivo*, est spectaculaire : celui de la correction phénotypique de *fos* par *fra-1*. En remplaçant, par knock-in, *c-fos* par *Fosl1* (le gène codant *Fra-1*), Fleischmann et coll (Fleischmann et al., 2000) ont récemment montré que

l'on peut corriger les défauts des souris *c-fos*^{-/-} à condition d'exprimer Fra-1 dans les territoires où s'exprime *c-fos* normalement. Cette manipulation conserve le promoteur *c-fos* et toutes les régions régulatrices hormis celles du premier exon et premier intron. Ainsi, les souris Fos^{Fosl1/Fosl1} ne souffrent pas d'ostéopétrose et l'apoptose de leurs photorécepteurs est rétablie. Bien que Fosl1 soit une cible de c-Fos (Matsuo et al., 2000), il est surprenant qu'il puisse rétablir toutes ses fonctions dans les ostéoclastes et la rétine, sachant qu'aucun domaine d'activation de la transcription n'a été découvert dans Fra-1.

4. Conclusion

c-Fos reste un élément majeur de la réponse à de nombreuses stimulations, mais son activité n'est pas absolument requise (dans les conditions de laboratoire) pour la plupart des fonctions biologiques. La redondance fonctionnelle et spatio-temporelle entre les membres de cette famille est donc plus importante que prévu, comme le montrent les phénotypes très mineurs de certaines souris KO (par exemple FosB, voir tableau 1 et Brown et al., 1996).

Peut-être ces souris *c-fos*^{-/-} ont-elles d'autres défauts qui n'apparaissent que lorsqu'elles sont en compétition avec des souris sauvages en milieu naturel. C'est une des limitations du KO chez la souris de laboratoire...

III. Régulation transcriptionnelle de *c-fos*

Au cours de l'étude de l'expression de *c-fos*, il s'est imposé comme un bon modèle pour l'étude des mécanismes généraux de la transcription, tant le degré de sophistication de son contrôle est élevé (voir §II.2.1 et II.2.2). En particulier, il constitue un paradigme de l'intégration de signaux cellulaires pour déclencher rapidement et efficacement l'activation génique, sur un modèle "tout ou rien" qui favorise les comparaisons.

Le gène *c-fos* humain est unique et se trouve sur le chromosome 14 (en 14q24.3, Ekstrand and Zech, 1987). Chez la souris, il comprend 4 exons qui composent un messager de 2,2 kb (fig. 5 : schéma du gène murin).

1. Démarrage de la transcription : sites, facteurs et voies

1.1. c-fos et structure de la chromatine

L'état de compaction de la chromatine participe à la régulation de la transcription: il détermine l'accessibilité des séquences promotrices pour le démarrage et permet ou non la progression de l'ARN polymérase.

En tant qu'IEG, *c-fos* permet de suivre l'ouverture de la chromatine lors de l'activation génique, car il passe rapidement d'un état fermé à ouvert. Ainsi l'activation, par des facteurs de croissance, de la transcription des IEG coïncide avec la phosphorylation de l'histone H3 (Mahadevan et al., 1991) sur sérine 10 (Sassone-Corsi et al., 1999) par Msk1 (Thomson et al., 1999) et Rsk2 (Sassone-Corsi et al., 1999). Cette phosphorylation semble permettre l'acétylation de la "queue" N-terminale de H3 (Clayton et al., 2000) par diverses HAT, et donc l'ouverture de la chromatine. Ces modifications des histones permettraient aussi de créer des sites d'ancrage pour des coactivateurs de la transcription (Berger, 2001).

A l'inverse, la répression de *c-fos* est associée à l'activité de BRG1, un membre du complexe SWI/SNF (*mating type SWItching/Sucrose Non-Fermenting*). Ce complexe est une machine à remodeler activement l'ADN qui consomme de l'ATP pour modifier la structure de la chromatine (Murphy et al., 1999).

D'une façon générale, il semble que les modifications (acétylation, méthylation, phosphorylation) des histones concourent à mettre en place un code qui fournit une

information sur l'état de la chromatine et permet l'interaction avec des machines de remodelage (Strahl and Allis, 2000).

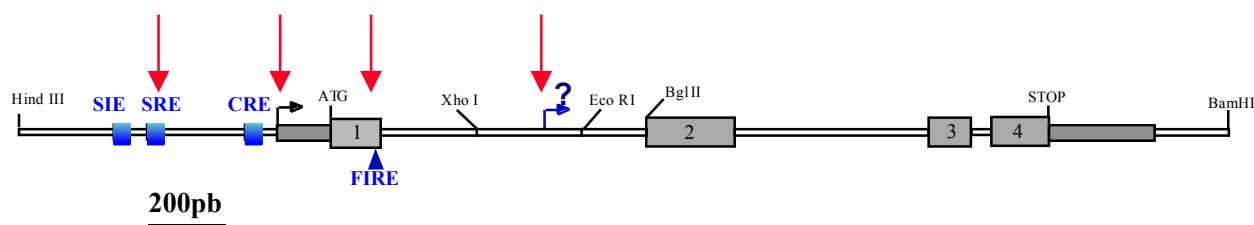


Figure 5 : Organisation du gène *c-fos* murin. Les principales séquences régulatrices abordées dans le texte sont représentées en bleu. Les flèches rouges désignent les sites hypersensibles à la DNase I (Renz et al., 1985). Les exons sont grisés. SIE : *v-sis-conditioned medium Inducible Element*. SRE : *Serum Response Element*. CRE : *Ca²⁺/cAMP Response Element*. FIRE : *Fos Intragenic Regulatory Element*.

L'équipe de Rolf Müller a cartographié les sites hypersensibles à la DNase le long du gène *c-fos* (fig. 5). Ces sites sont l'indice d'une laxité locale de la chromatine, et correspondent à des régions régulatrices potentielles. Il apparaît que certains se trouvent en amont du site de démarrage de transcription et ont plus tard été identifiés comme le SRE, le CRE et le site de démarrage lui-même, définissant le promoteur (Renz et al., 1985, voir fig. 5). D'autres furent identifiés plus en aval; ils seront décrits au §III.3.2.6 et section résultats, II..

Il semble qu'entre la région du SIE et du SRE d'une part, et celle du CRE et du démarrage d'autre part, il existe un nucléosome fixe, dont la position et la compacité ne varient pas au cours de l'activation de *c-fos* (Herrera et al., 1997). Une autre étude inclut le CRE dans le nucléosome (Schild-Poulter et al., 1996) mais elle fut menée *in vitro* avec de courtes séquences, ce qui rend sa pertinence plus douteuse. Ce nucléosome permettrait de mettre en contact ces sites distants pour construire des super-complexes de facteurs de transcription et coactivateurs avec la machinerie basale de transcription.

1.2. Le promoteur

Le promoteur de *c-fos* a fait l'objet de nombreuses études visant à comprendre les mécanismes de son activation si rapide. Ainsi ont été découvertes les séquences gouvernant son activation par différents stimulus, dont je ne présenterai que les majeures (fig. 6).

1.2.1. Serum Response Element, *SRE*

Découverte par Richard Treisman (Treisman, 1985), cette séquence, aussi appelée *CARF box*, est nécessaire et suffisante pour l'induction par le sérum de différents gènes (souvent des IEG) dont *c-fos*, quoique moins efficacement que dans le contexte global du promoteur. La première protéine identifiée pour sa liaison au SRE fut SRF (Treisman, 1986), une protéine de 67 Kd contenant une MADS box (*MCMI/Agamous/Deficiens/SRF box*) et se liant au SRE sous forme de dimère.

Alors que SRF est requis pour la prolifération des fibroblastes (Gauthier-Rouviere et al., 1991), ce n'est pas du tout le cas pour les cellules ES (Schratt et al., 2001). Dans ces cellules *srf*^{-/-} l'activation d'IEG (dont *c-fos*) contenant un SRE est pourtant sévèrement compromise. Cela limite le rôle de SRF dans la prolifération au développement tardif, ce qui est cohérent avec le fait que les souris *srf*^{-/-} se développent bien jusqu'à E6 puis meurent (Arsenian et al., 1998).

De façon étonnante, les sites de phosphorylation identifiés dans SRF sont peu conservés (Treisman, 1995) et ne semblent pas requis pour l'activation transcriptionnelle. Cela a mené à la recherche et l'identification de partenaires capables de relayer l'action des facteurs de croissance sur le SRE, sous forme d'un complexe ternaire (*Ternary Complex Factor*, TCF). C'est ainsi que Elk1 (Hipskind et al., 1991) et SAP-1 (Dalton and Treisman, 1992) ont été découverts. Ces facteurs de la famille *ets* sont phosphorylés par les MAPK activées (et donc nucléaires) avec une spécificité encore mal comprise, peut-être liée à l'organisation nucléaire des domaines transcriptionnels.

Plus récemment, un nouveau TCF a été cloné, Net/ERP/SAP2 (Giovane et al., 1994). Ce TCF est plutôt inhibiteur et sa phosphorylation par JNK déclenche son export vers le cytoplasme (Ducret et al., 1999).

1.2.2 Ca²⁺/cAMP Response Element, *CRE*

Cet élément a été isolé comme une séquence permettant la réponse à l'AMPc (Berkowitz et al., 1989; Fisch et al., 1989; Sassone-Corsi et al., 1988). Il est la cible des membres de la famille CREB (Montminy and Bilezikjian, 1987). Les facteurs ATF, les

CREM et les membres de la famille Jun peuvent aussi se fixer sur un CRE, ce qui crée une combinatoire de dimères susceptible de fournir une grande diversité de réponses, certains étant inhibiteurs, spécifiques d'un tissu particulier, réglés par épissage alternatif (Tian et al., 1996)...

La signalisation AMPc n'est pas la seule qui active la transcription à partir du CRE : le calcium, via les CAMK (Ca^{2+} /CaM-dependent protein Kinase, voir §III.2) et les facteurs de croissance, via Rsk (Xing et al., 1996), ciblent CREB et la transcription associée.

Ainsi, l'activation de CREB par phosphorylation sur ser133 intègre les signaux de différentes voies de signalisation.

Dans certains systèmes la phosphorylation de CREB sur ser133 augmente son affinité pour le CRE (Nichols et al., 1992), mais il semble que le plus souvent il soit constitutivement fixé sur l'ADN, et que cette modification change plutôt ses partenaires d'interaction (comme par exemple le coactivateur CBP, Chrivia et al., 1993). Dans tous les cas elle augmente la capacité de transactivation de CREB (Sheng et al., 1991), sauf lorsque ser142 est phosphorylée également (Sun et al., 1994 et publication n°1).

L'importance de la voie CREB dans la réponse au calcium (et probablement à d'autres stimulus) varie selon les types cellulaires : dans les cellules PC12, le CRE tient un rôle majeur (Sheng et al., 1988; Sheng et al., 1990) alors que d'autres mécanismes interviennent dans d'autres types cellulaires.

1.2.3. Autres sites

Outre le SRE et le CRE, d'autres sites ont été identifiés dans le promoteur de *c-fos*.

Le SIE, activé en réponse au PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et d'autres cytokines (Wagner et al., 1990), est la cible des facteurs de transcription STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), qui sont phosphorylés sur tyrosine par les kinases JAK (*Janus-Kinase*), ce qui les active et les envoie dans le noyau (Rane and Reddy, 2000).

Le site FAP (*Fos AP-1-like*, Velcich and Ziff, 1990) est un consensus pour AP-1 qui chevauche le SRE. Les fixations d'AP-1 et SRF seraient mutuellement exclusives. Il a été proposé que cet antagonisme est à l'origine de la transrépression de *c-Fos* sur son propre promoteur (Gauthier-Rouviere et al., 1992). En transfection transitoire le FAP semble participer à l'induction de *c-fos* par le calcium (Wang and Simonson, 1996). On ignore toujours l'identité des facteurs qui se fixent sur ce site et son rôle dans la régulation de *c-fos*.

Il existe plusieurs sites de fixation pour YY1 sur le promoteur ; ces facteurs permettraient l'activation ou la répression de sites voisins (SRE, CRE) par la courbure de l'ADN qu'ils occasionnent (Natesan and Gilman, 1995).

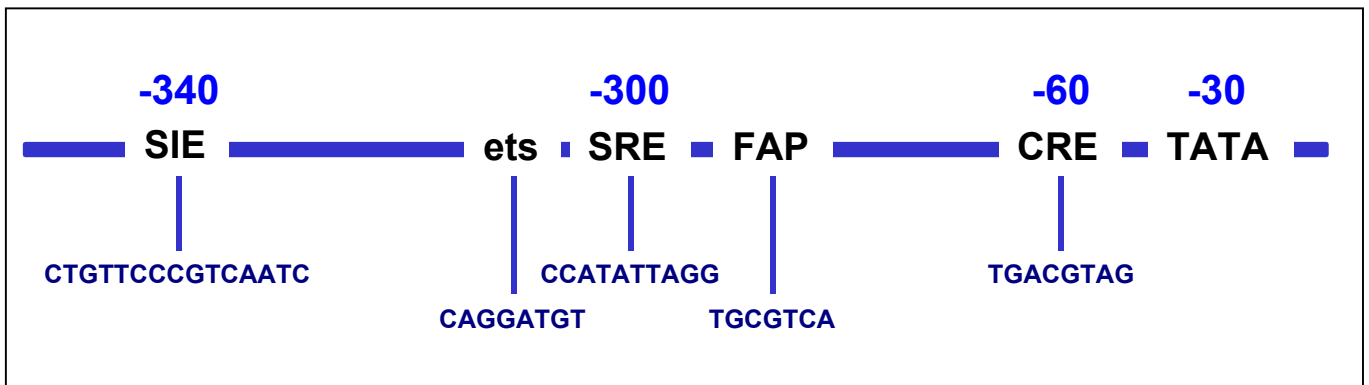


Figure 6: Sites principaux identifiés sur le promoteur murin de *c-fos*. Leurs séquences sont indiquées en bas, leur position par rapport au démarrage de transcription, en haut. Les nombres désignent la distance par rapport au site de démarrage en paires de bases.

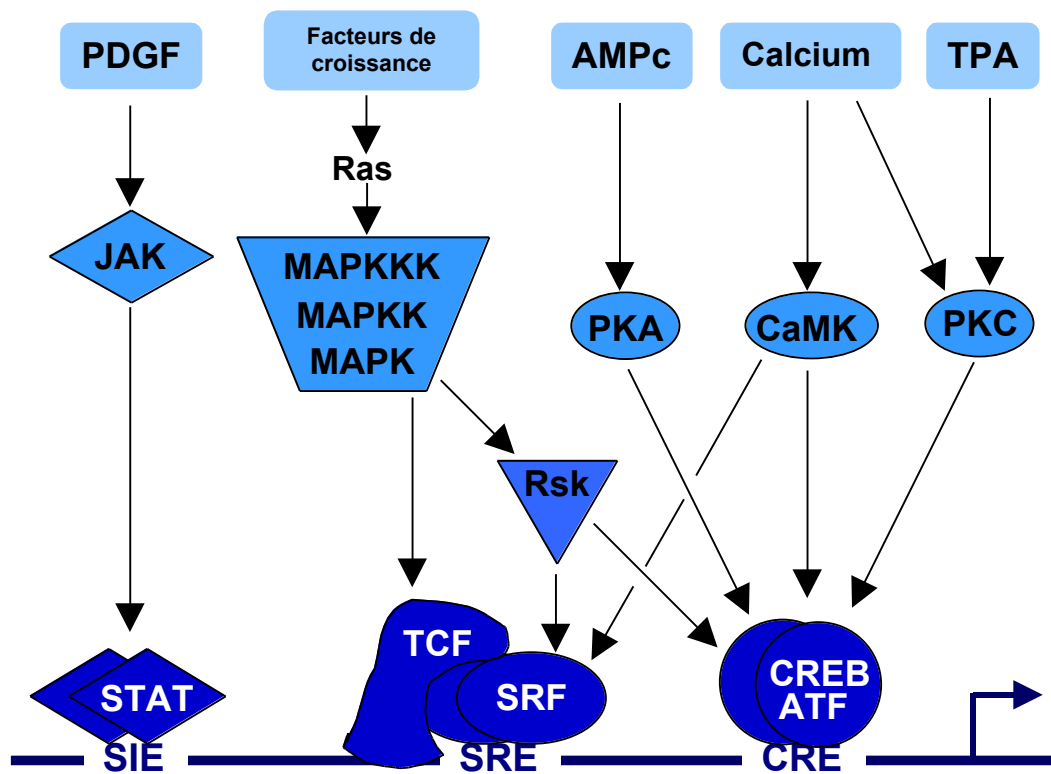


Figure 7: Principales voies de signalisation qui débouchent sur le promoteur de *c-fos*. Le site de démarrage de transcription est représenté par une flèche brisée.

D'autres facteurs plus spécifiques de certains tissus interviennent aussi dans la régulation de *c-fos* : par exemple MyoD réprime l'activation de *c-fos* par le SRE lors de la différenciation musculaire (Trouche et al., 1993), et Pit-1 active ce SRE dans les cellules hypophysaires (Gaiddon et al., 1999).

1.2.4. Signalisation et transcription de *c-fos* : fig. 7

La signalisation JAK/STAT est plus complexe que ne laisse croire la fig. 7 : il existe des possibilités de dialogue avec les voies des MAPK, PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*, Rane and Reddy, 2000) et PKR (*dsRNA-activated Protein Kinase*, Deb et al., 2001), mais je ne détaillerai pas ces événements.

Hill et coll. (Hill et al., 1995) ont découvert une nouvelle voie de signalisation qui mène des petites GTPases de la famille Rho (*Ras homolog*) à l'activation de SRF. Activée notamment par le LPA (*Lyso-Phosphatidic Acid*), cette voie ne semble pas affecter *c-fos* endogène (Gineitis and Treisman, 2001). Par contre, l'activation de SRF par PI-3K est requise pour l'induction de *c-fos* par certains mitogènes. Bien que le mécanisme de cette activation soit obscur, cette voie semble indépendante de celles des Rho et de TCF (Poser et al., 2000).

L'activation de TCF par les facteurs de croissance via les MAPK (Janknecht et al., 1993) semble cibler majoritairement la voie ERK, alors que l'activation de *c-fos* par les stress est plus complexe et cible préférentiellement les voies JNK et p38 (voir annexe IV).

La famille CREB est au carrefour de nombreuses voies susceptibles d'activer *c-fos*, ce qui est compatible avec l'étude utilisant un dominant-négatif qui montre que ces facteurs sont utiles pour la réponse de *c-fos* à de nombreux stimulus (Ahn et al., 1998). Toutefois, Cette étude a été réalisée dans les cellules PC12, et il est probable que la signalisation via CREB soit moins dominante dans d'autres types cellulaires, en particulier ceux où le SRE prédomine. En effet, la contribution relative des différents sites pour la réponse à un stimulus donné varie selon les types cellulaires (Gabellini et al., 1991; Johnson et al., 1997; Lucibello et al., 1991).

1.2.5. Conclusion

Il semble qu'il existe une fixation constitutive des facteurs de transcription sur le promoteur (Herrera et al., 1989) : ceux qui sont résidents nucléaires seraient activés (par phosphorylation, acétylation,...) *in situ*, sur l'ADN, ce qui les convertirait de répresseurs en activateurs selon leurs partenaires d'interaction (coactivateurs ou corépresseurs).

De plus, il apparaît que l'approche simpliste consistant à associer un stimulus à un site via une voie de signalisation a vécu. Dans la majorité des cas, tous les sites sont requis et la

spécificité de réponse à un stimulus donné repose sur une combinaison particulière de facteurs (généraux, spécifiques et coactivateurs) déterminée par l'environnement et l'état de la cellule, le type cellulaire, et les autres stimulations concomitantes. C'est pourquoi l'utilisation de fragments de promoteur en transfection transitoire donne souvent des résultats difficiles à concilier avec le comportement du gène endogène : il manque à la fois l'architecture des complexes protéiques et celle de la chromatine.

Enfin, le groupe de Tom Curran a introduit des mutations dans la construction Fos-LacZ (voir II.2.1.2) : les sites majeurs (SIE, SRE, FAP, CRE) du promoteur ont été mutés et des souris transgéniques ont été générées. Leur travail montre qu'*in vivo* la mutation d'un seul de ces sites suffit à diminuer fortement l'activité LacZ basale ou induite par divers agents, avec un effet particulièrement drastique pour SRE et CRE (Robertson et al., 1995). Les auteurs proposent que les différents facteurs de transcription agissent de concert sur le promoteur, sous forme d'un Complexe de Transcription Interdépendant, dans lequel ils ont tous une fonction coopérative requise. La formation de ce complexe serait favorisée par les courbures imprimées à l'ADN par certains facteurs. Cette étude est à rapprocher de celle d'Herrera et coll. (Herrera et al., 1997) qui ont détecté un nucléosome central dans le promoteur de *c-fos*. La présence de ce nucléosome pourrait rapprocher des sites distants, favorisant les interactions entre transactivateurs, coactivateurs et machinerie de transcription.

2. Calcium et induction de *c-fos*

Les voies de signalisation activées par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et aboutissant à l'activation transcriptionnelle sont nombreuses. Elles sont détaillées dans la publication n°1.

Publication n°1

V. Coulon et J-M Blanchard. *Flux calciques et expression génique. Médecine/Sciences*
Octobre 2001, n°10 vol17, sous presse.

RESUME

L'ion calcium affecte de nombreux phénomènes biologiques dont la transcription des gènes. Cette synthèse présente les principales sources de calcium dont dispose une cellule, les voies de signalisation activées par les flux calciques via le complexe Ca^{2+} -Calmoduline (Ca^{2+} -CaM), et leurs dialogues avec d'autres cascades. Les aspects spatio-temporels du message calcique sont importants : la réponse transcriptionnelle dépend du compartiment subcellulaire affecté, de la durée ainsi que de la fréquence de l'influx. Le calcium peut affecter la transcription en modifiant la localisation et l'activité de facteurs de transcription, mais aussi la processivité des ARN polymérases ou la structure de la chromatine. La plupart de ces régulations font intervenir la calmoduline, mais l'effet du calcium peut être plus direct, comme dans le cas du facteur DREAM. Enfin, nous décrivons les implications physiopathologiques de quelques cibles du calcium.

FLUX CALCIQUES ET EXPRESSION GENIQUE

Calcium fluxes and gene expression

Vincent Coulon et Jean-Marie Blanchard

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

CNRS, UMR 5535, IFR 24

1919 route de Mende

34293 Montpellier cedex 5

L'ion calcium est toxique pour la plupart des cellules. Il est donc probable que les premières protéines capables de le chélater aient servi à l'empêcher de sévir. Au cours de l'évolution, certaines de ces protéines-tampons sont devenues des effecteurs, faisant de cet ion non plus un intrus toxique mais un second messenger universel pouvant coder des informations cellulaires très raffinées.

Ainsi les flux calciques sont à l'origine de multiples réponses cellulaires tant rapides que pouvant se maintenir sur de longues périodes, et ceci dans la grande majorité des cellules, excitables ou non. Ce travail passe en revue les conséquences d'une variation de concentration calcique intracellulaire sur l'expression génique. Bien que le calcium affecte d'autres étapes (stabilité des messagers et des protéines, transport, épissage des messagers...) nous nous limiterons essentiellement au niveau transcriptionnel.

1° Les sources de calcium

Elles sont très diverses : le milieu extracellulaire, le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries, l'appareil de Golgi[1], et semble-t-il l'enveloppe nucléaire sont riches en calcium. Ainsi, la concentration en calcium dans le cytoplasme dépasse rarement les 300nM, alors que dans ces stocks

intracellulaires elle peut localement atteindre et parfois dépasser 1mM [2], ce différentiel étant maintenu principalement par des pompes à calcium nécessitant de l'ATP[3-6].

Dans les cellules excitables, le calcium extracellulaire peut entrer suite à l'ouverture de canaux calciques sensibles au potentiel (types T, L, N, P/Q), ou suite à la fixation d'un neurotransmetteur tel le glutamate sur un récepteur. Ce récepteur peut être lui-même un canal (récepteur-canal, ionotropique) ou activer un canal indépendant par l'intermédiaire d'une protéine G (récepteur métabotropique)[5].

Toutes les cellules possèdent des réserves internes de calcium, dont la principale est le réticulum endoplasmique (sarcoplasmique dans les cellules musculaires). On trouve à sa surface deux types de canaux susceptibles d'enrichir le cytosol en calcium : i) les récepteurs de l'inositol 1,4,5 triphosphate (InsP3R), qui s'ouvrent en réponse à la production d'InsP3 par les Phospholipases C (PLC), et ii) les canaux sensibles à la Ryanodine (RyR), qui eux aussi mobilisent le Ca^{2+} des réserves internes (fig. 1)[6].

Ces deux types de canaux peuvent s'ouvrir en réponse à une entrée de calcium extracellulaire, c'est le *Calcium-Induced Calcium Release* (CICR), moins bien décrit pour les InsP3R que pour les RyR cependant[7]. Ce CICR permet d'introduire des effets de seuil, et donc d'obtenir des signaux "tout ou rien" plutôt que progressifs[8].

Enfin, le mécanisme inverse existe aussi : les canaux ICRAC (*Calcium Release Activated Calcium channel*) ou SOC (*Store-Operated Calcium channel*) de la membrane plasmique s'ouvrent lorsqu'ils sont activés par les canaux InsP3R ou RyR, probablement par interaction directe[9]. Ces canaux SOC permettraient de s'affranchir de la capacité limitée des stocks intracellulaires en utilisant le calcium extracellulaire, par exemple pour des stimulations prolongées susceptibles de vider les stocks intracellulaires.

2° Quels effecteurs pour le calcium?

2.1 La calmoduline et ses partenaires

L'un des principaux médiateurs des effets moléculaires du Ca^{2+} est la calmoduline (CaM), une petite protéine de 17KD capable de changer de conformation lors de la fixation de 4 ions Ca^{2+} dans des poches de type "main EF". Ce complexe (Ca^{2+} -CaM) peut activer de nombreuses cibles moléculaires dont la calcineurine et les CaM-kinases (*Ca-calModulin-dependent Kinases*, CaMK).

La calcineurine est une sérine-thréonine phosphatase exprimée dans un grand nombre de tissus, alors qu'on la croyait auparavant limitée aux neurones. Ses substrats dans le domaine transcriptionnel comprennent entre autres les facteurs de transcription NF-AT, NF-KB et MEF2. Sa sous-unité catalytique, CnA, est libérée de sa sous-unité inhibitrice CnB par fixation du complexe Ca^{2+} -CaM[10].

Les CaM-Kinases constituent une famille de sérine/thréonine kinases dévolues soit à des substrats très particuliers (c'est le cas par exemple de la kinase qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine dans le muscle lisse), soit à un plus large spectre de substrats, dont certains facteurs de transcription (CaMKI, II, IV). Leur interaction avec le complexe Ca^{2+} -CaM abolirait l'effet d'un repliement intramoléculaire autoinhibiteur[11].

La CaMKII possède un grand nombre de substrats connus dans tous les compartiments de la cellule, ce qui lui vaut le nom de CaMK multifonctionnelle. Sa translocation vers les synapses pour y phosphoryler certains substrats localement jouerait un rôle dans la modulation de la transmission synaptique. On connaît depuis peu un inhibiteur naturel de la CaMKII, CaMKIIN, qui serait spécifique de cette CaMK, ce qui va faciliter l'étude des rôles respectifs des différentes CaMK.

L'activation de la CaMKII par le complexe Ca^{2+} -CaM est renforcée et prolongée par autophosphorylation sur la thréonine 286[11].

Dans le cas des CaMKI et IV, ce processus est assuré par une CaM kinase kinase cytoplasmique (CaMKK α ou β selon les tissus), elle aussi sous contrôle du

complexe Ca^{2+} -CaM[12]. Cette modulation de la durée du signal a certainement une importance dans la régulation de la transcription, car seules des activations durables des CaMK conduisent à une phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cyclic AMP responsive element binding protein*), une de leurs cibles les mieux caractérisées. Ainsi la CaMKIV, la seule CaMK détectée dans le noyau *in vivo*, stimule faiblement l'activité transactivatrice de CREB en transfection, alors que l'expression conjointe de la CaMKK potentialise fortement cet effet[12].

Signalons la découverte toute récente d'une nouvelle kinase pro-apoptotique dont l'activité dépend du complexe Ca^{2+} -CaM : la DAP-kinase (*Death Associated Protein kinase*). Exprimée dans de nombreux types cellulaires, cette kinase est associée au cytosquelette et son activation conduit à l'apoptose de fibroblastes primaires[13].

2.2 Dialogues avec d'autres voies

On recense de nombreux phénomènes de couplage entre la cascade des CaMK et d'autres voies de signalisation.

Ainsi, La PKA peut phosphoryler deux sites présents dans la CaMKK et inhiber son activité. Cette relation fonctionnelle avec la voie de l'AMP cyclique existe aussi dans l'autre sens: l'adénylate cyclase de type I peut être activée par fixation du complexe Ca^{2+} -CaM. Mais la CaMKIV peut empêcher cet effet en phosphorylant son domaine de fixation de CaM[12]. De plus, le phénomène de Potentiation à Long Terme (LTP), base présomptive de la mémoire, nécessite l'action indirecte de la PKA sur la CaMKII. En effet, PKA activerait par phosphorylation PP1-I, un inhibiteur de la phosphatase PP1, empêchant ainsi la déphosphorylation de la CaMKII[14].

Il existe aussi des connections entre la cascade des CaMK et les voies des MAP-Kinases. Les MAP-Kinases ERK, p38 et JNK sont activées par trois cascades différentes en aval de Ras, en réponse à de nombreux stimulus mitotiques ou de stress. Or il apparaît que l'activation forcée de la CaMKIV ou de la CaMKK permet

une activation de ERK, p38 et JNK à des degrés divers, favorisant la transcription de leurs gènes-cibles[15]. D'autre part, le calcium peut activer les MAPK par l'intermédiaire de PYK2, une tyrosine-kinase capable de recruter des facteurs d'échange pour Ras, ce qui a pour effet d'activer la MAPK ERK[16]. Le mécanisme d'activation de PYK2 par le calcium reste encore mystérieux (fig. 2).

Les glycoprotéines de la famille Wnt sont des facteurs de croissance dont les effets sont très variés, le plus spectaculaire étant la duplication de l'axe rostro-caudal des embryons de Xénope. Récemment, plusieurs groupes ont montré que certains des récepteurs pour les Wnt n'utilisaient pas la voie bien connue de la β -caténine mais lui préféraient une voie impliquant le calcium. Ainsi, probablement par l'entremise d'une protéine G hétérotrimérique, ces récepteurs activeraient la Phospholipase C, entraînant une production d'InsP3 et donc une libération de calcium par les réserves internes, suffisante pour activer la CaMKII[17]. Cette particularité de certains facteurs Wnt est l'un des éléments qui pourraient expliquer leurs rôles différents au cours du développement.

Très récemment il a été démontré que la voie de signalisation activée par les cytokines de la famille TGF- β , qui implique les protéines SMAD, est sous contrôle des flux calciques. Ainsi la CaMK II phosphorylerait certaines SMAD, modifiant leur localisation subcellulaire, leur activité transcriptionnelle, leur préférences de dimérisation, avec pour résultat une inhibition de la signalisation sous la dépendance du TGF- β [18]. Cette découverte illustre à nouveau l'importance des signaux calciques dans la complexification d'autres signaux, afin de moduler les effets de facteurs de prolifération et de développement.

Enfin, au sein même de la voie CaMK existent des antagonismes : les CaMK I et IV peuvent empêcher la nucléarisation de la CaMKII en phosphorylant un résidu proche de son Signal de Localisation Nucléaire (NLS)[12].

Le calcium apparaît donc comme un modulateur général de nombreuses voies de signalisation, permettant l'intégration de signaux très divers. Outre la voie des CaMK, le calcium affecte beaucoup de cascades dans des systèmes

artificiels, mais ceux-ci tiennent rarement compte de spécificités temporelles et spatiales de ce signal *in vivo*.

3° Flux maintenus ou flux oscillatoires ? Flux nucléaires ou cytoplasmiques ?

La façon dont la concentration en calcium intracellulaire évolue au cours d'une stimulation n'est pas anodine.

Des expériences récentes montrent que suivant que cette variation présente un caractère oscillatoire ou maintenu, les effets se manifestent de façon très différente au niveau transcriptionnel. Ainsi, un InsP3 modifié, capable de pénétrer dans les cellules, et qui est encagé de telle façon qu'il peut être relâché après photolyse par les U.V., a été utilisé pour relarguer à volonté le calcium intracellulaire pendant de courtes périodes de temps[19]. De même, traiter des cellules par la Thapsigargine, un inhibiteur irréversible des pompes moléculaires remplissant de calcium le réticulum endoplasmique, entraîne l'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique activés directement par les RyR ou les InsP3R (*Store Operated calcium Channels*)[9]. Ceci permet de soumettre des cellules à des oscillations de calcium interne, $(Ca)_i$, par simple modification de la concentration externe, $(Ca)_e$. En effet, lorsque $(Ca)_e$ augmente, cela affecte $(Ca)_i$ car les canaux SOC sont ouverts. Lorsque l'on diminue rapidement $(Ca)_e$ par perfusion d'EGTA, le rapide retour au niveau basal se fait par l'action des pompes à calcium de la membrane plasmique.

Ces deux méthodes permettent ainsi de créer des oscillations contrôlées de Ca^{2+} intracellulaire[20].

Les auteurs de ce travail ont estimé l'effet de ces oscillations calciques sur la réponse transcriptionnelle, mesurée au moyen de gènes indicateurs contrôlés par plusieurs facteurs de transcription susceptibles de relayer les effets calciques (NF- κ B, Oct-1 ou NF-AT). Quelle que soit la technique utilisée le résultat est inattendu : la réponse transcriptionnelle est plus intense si les variations de Ca^{2+} intracellulaire sont oscillatoires plutôt que maintenues. En outre, la réponse

spécifique dépend de la fréquence des oscillations: seul par exemple NF-kB répond aux oscillations de faible fréquence[20]!

Or il semble que les CaMK nucléaires agissent comme des décodeurs de fréquence vis-à-vis des bouffées de calcium nucléosolique, comme cela a été montré pour la CaMK II[21]. L'importance des oscillations calciques dans la modulation de la plasticité synaptique suggère un rôle des CaMK dans ces processus [22]. De plus c'est une CaMK qui phosphoryle IκB (un inhibiteur de NF-kB), ce qui active sa dégradation : cette relation établit peut-être une cascade de signalisation oscillatoire.

La réponse va dépendre également du compartiment qui subit la variation de concentration en Ca^{2+} . Ceci a été étudié par microinjection d'un chélateur du calcium (BAPTA) couplé à une molécule de dextrane qui l'empêche de diffuser hors du compartiment où il est injecté. Ainsi, il semblerait que le site CRE (*cAMP Responsive Element*, cible de CREB) ne réponde qu'à des variations de Ca^{2+} intranucléaire consécutives à une activation des canaux calciques de type L, les types N et P/Q restant inefficaces. Dans les mêmes conditions le site SRE (*Serum Responsive Element*, cible de SRF, *Serum Response Factor*) répondrait à des stimulus calciques cytoplasmiques[23] (fig. 3).

Il est intéressant de noter que dans ces conditions une translocation rapide (1 minute) du complexe Ca^{2+} -CaM, du cytoplasme vers le noyau, peut être observée dans des neurones pyramidaux de l'hippocampe, ce qui pourrait rendre compte de certains effets nucléaires du calcium[24]. Cependant, Hardingham et coll. ont montré qu'aucune translocation de protéine n'était nécessaire pour obtenir l'activation de CREB lors d'une dépolarisation. En l'absence de toute translocation de calmoduline, la propagation du calcium libre vers le noyau pourrait seule rendre compte de l'activation de CREB par les CaMK nucléaires [25].

Ces résultats introduisent la notion de compartimentation des réserves calciques dans la cellule[26], mais aussi dans le noyau : en effet, l'enveloppe nucléaire possède ses propres récepteurs pour l'InsP3, ses propres pompes d'établissement du gradient, et possède aussi la faculté d'engendrer des bouffées transitoires de calcium dont la fréquence constitue en soi une information. Ainsi, une faible stimulation déclenche une " bouffée " (*puff*) locale de calcium, tandis qu'une stimulation soutenue provoque une " vague " (*wave*) globale qui peut éventuellement se propager de cellule à cellule, dans certains types cellulaires[27]. Pour l'instant ces phénomènes sont à peine identifiés, et un enjeu important de la recherche dans ce domaine est de comprendre comment un type particulier d'influx calcique (site, durée, fréquence) active une voie de signalisation adaptée.

4° Calcium et facteurs de transcription

Certaines des voies de signalisation décrites ci-dessus convergent vers des facteurs de transcription, qui en intègrent les signaux. L'état de phosphorylation d'un facteur de transcription peut moduler sa localisation subcellulaire, sa stabilité, son activité intrinsèque ou son association avec des cofacteurs, ou encore une combinaison de ces divers paramètres.

Selon son état d'activation, un facteur de transcription aura donc un effet différent sur la machinerie basale de transcription, constituée de l'ARN polymérase et des facteurs généraux de transcription. La résultante de l'activité de tous les facteurs présents sur un promoteur détermine donc le niveau d'activation de la transcription du gène correspondant.

4.1 Translocation cytoplasme -noyau

Les facteurs de transcription comme NF-AT (Nuclear Factor AT) ou Oct-1 (protéine liant la séquence octamère présente dans le promoteur de nombreux gènes dont ceux des immunoglobulines) sont la cible de la calcineurine, une phosphatase activée par le complexe Ca^{2+} -CaM. Prenons le cas de NF-AT. Ce

complexe comprend une protéine constitutivement nucléaire, NF-ATn, et une protéine qui fait la navette, NF-ATc. En l'absence de stimulation, ce dernier réside dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau est activée par déphosphorylation de sérines présentes dans un motif répété (SP repeat: SPXXSPXXSPXXXXD/ED/E) situé dans la région aminoterminal. Ces répétitions encadrent un motif faisant office de NLS (signal de localisation nucléaire) qui est ainsi exposé[10].

La translocation de NF-AT se fait en association avec le complexe Ca^{2+} -CaM-calcineurine qui entre alors en compétition dans le noyau avec des kinases qui vont phosphoryler à nouveau les sérines régulatrices[10]. Le temps de résidence nucléaire de NF-ATc est donc sous la dépendance : i) du NLS et d'un signal d'export nucléaire (NES), ii) de la déphosphorylation des sérines présentes dans les répétitions SP par le complexe Ca^{2+} -CaM-calcineurine et iii) de leur rephosphorylation antagoniste par des kinases.

La nature de ces kinases peut varier suivant les variants de NF-AT concernés. Ainsi pour NF-ATc1, une première phosphorylation par PKA serait requise pour créer des sites reconnus par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), qui donnerait ainsi le coup de grâce, renvoyant ce facteur dans le cytoplasme. En revanche, pour NF-ATc3, ce sont JNK, MEKK1 et Caséine Kinase 1 α qui seraient impliquées[10] (fig. 4).

De nombreuses observations montrent que la transcription sous la dépendance des facteurs NF-AT n'est effective que si d'autres voies de signalisation sont sollicitées de façon conjointe[28]. En fait, il semblerait que dans des conditions physiologiques, NF-ATc ne soit pas capable de lier les séquences d'ADN qu'il est sensé reconnaître avec une affinité suffisante. Ceci est obtenu par synergie avec d'autres facteurs de transcription tels que c-MAF, GATA4 ou AP1 (jouant alors le rôle de NF-ATn cité plus haut). La nécessité d'un partenaire introduit ainsi une convergence entre la voie contrôlée par la calcineurine et d'autres comme celles de la PKC[28] ou de Ras, permettant ainsi au contexte

cellulaire de s'exprimer pleinement, à travers des modulations qui affinent la complexité du signal (fig. 5).

De plus il semble que la déphosphorylation de NF-AT par la calcineurine ait aussi un effet sur sa capacité de transactivation en plus de sa localisation[29].

4.2 Modulation de l'activité transcriptionnelle

La possibilité d'intégrer plusieurs voies de signalisation peut se décliner de toute autre manière. Ainsi, un même site de phosphorylation peut être la cible de nombreuses kinases, comme c'est le cas pour le facteur de transcription CREB. Ce dernier appartient à la superfamille des protéines à domaine bipartite bZIP (basic domain-leucine zipper : le premier en position aminoterminal contient une série de lysines et d'arginines et contacte directement l'ADN, alors que le second, constitué par une répétition de leucines tous les 7 acides aminés, est responsable de la dimérisation)[30]. Plusieurs variants engendrés par épissage alternatif peuvent former des homodimères ou bien s'associer à ATF-1 (*Activating Transcription Factor 1*) ou à l'un des variants de CREM (*cAMP Response Element Modulator*). Ces derniers, engendrés par épissage, sont soit des répresseurs (CREM α , β , γ), soit des activateurs (CREM τ) de la transcription, et au contraire de CREB et d'ATF-1, présentent des profils d'expression très spécifiques de certains tissus (testicule, cerveau, axe neuroendocrine)[30]. Ainsi, par des mécanismes d'épissage alternatif ou d'usage de promoteurs alternes, cette famille de protéines montre une grande diversité qui assure une flexibilité importante.

Dans la protéine CREB, deux sites majeurs de phosphorylation constitués par les sérines 133 et 142 sont présents au sein d'un motif susceptible d'être phosphorylé par de multiples kinases (KID: *Kinase Inducible Domain*). Initialement décrite suite à une augmentation de la concentration intracellulaire en cAMP, la phosphorylation de la sérine 133 est également observée après augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. En fait, la même sérine est phosphorylée in vitro par les kinases CaMKI, II, IV, PKA, PKC et les MAPKAPK (*MAPK-Activated*

Protein Kinases)! Il est donc vraisemblable que selon le type cellulaire et le mode de stimulation, de nombreuses voies de signalisation convergent vers la sérine 133 (fig. 6). De plus, la sérine 142 de CREB (dont la phosphorylation a un effet inhibiteur) est phosphorylée par la CaMKII en plus de la sérine 133, alors que la CaMKIV ne ciblerait que cette dernière, avec pour résultat une stimulation de la transactivation[30].

De nombreux travaux, parfois contradictoires, ont cherché à déterminer le rôle joué par la phosphorylation de CREB : recrutement sur le CRE, augmentation de la stabilité du complexe CREB-CRE, recrutement de partenaires. L'hypothèse d'une liaison constitutive de CREB sur l'ADN *in vivo* (pour ses sites de haute affinité) a permis d'identifier des partenaires, ce qui a conduit à la purification de la protéine CBP (*CREB Binding Protein*). CBP fixe CREB quand il est phosphorylé sur la sérine 133 et sert alors de pont moléculaire entre CREB et le reste de la machinerie transcriptionnelle[31] (fig. 7).

Il semble toutefois que l'action de CBP dépasse largement le cadre des effets de CREB. En effet, CBP seule, quand elle est artificiellement fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN, peut activer la transcription en réponse à un stimulus calcique relayé par la CaMKIV et la voie des MAPK[32]. Ceci suggère que d'autres facteurs de transcription peuvent ainsi contribuer, via CBP, à relayer des effets transcriptionnels sous le contrôle du calcium nucléaire. Des résultats récents montrent que tel est le cas pour c-JUN, en l'absence de toute activation des JNK (*JUN amino terminal Kinases*) et sans que les sites canoniques sérine 63 et sérine 73 soient impliqués[33].

Dans les neurones, les influx calciques issus des canaux sensibles au potentiel de type L ou des récepteurs ionotropiques du glutamate (de type NMDA) stimulent la phosphorylation de CREB. Or, seule l'activation des canaux L conduit à une expression de *c-fos* tandis que les récepteurs NMDA sont inefficaces, même à de fortes concentrations de glutamate. Il semble donc que le site d'entrée du calcium détermine l'activation génique[34], vraisemblablement

par un couplage différentiel aux réserves intracellulaires, en particulier celle de l'enveloppe nucléaire.

La famille des facteurs de transcription MEF2 (*Myocyte Enhancer binding Factor2*) est caractérisée par un domaine de liaison à l'ADN apparenté à celui de SRF, appelé MADS box. Ces facteurs sont exprimés entre autres dans les myocytes, les neurones et les lymphocytes, et représentent un autre exemple de la multiplicité des signaux déclenchés par le calcium[35]. En effet, il a récemment été décrit que certains membres de cette famille sont directement activés à la fois par la calcineurine et la CaMKIV, stimulant fortement l'activité transcriptionnelle de MEF2. En outre, MEF2 est susceptible de former un complexe tripartite avec NF-AT (lui-même activé par la calcineurine) et l'ADN. Enfin, ces deux facteurs interagissent avec CBP, lui-même activé directement par la CaMKIV[32] : ce système intégrateur récapitule donc la plupart des effets transcriptionnels du calcium, et interviendrait dans la différenciation musculaire et l'apoptose des lymphocytes T[36]

D'autres facteurs de transcription, comme les C/EBP, semblent être la cible directe des CaMK, sans toutefois que cela ait été démontré formellement.

L'activation de la transcription par le calcium intervient très souvent sous forme d'une synergie. Parfois même, une voie impliquant le calcium est très peu efficace seule mais potentialise très fortement l'effet d'un autre signal. C'est le cas de la signalisation déclenchée par les nucléotides extracellulaires dans les ostéoblastes : leurs récepteurs membranaires métabotropiques (P2Y) activent très faiblement l'accumulation du messager *c-fos*, par libération de calcium intracellulaire. Par contre, l'effet de la PTH (*ParaThyroid Hormone*) est fortement potentialisé. Etant donnée la courte durée de vie des nucléotides hors des cellules, ils pourraient agir comme des potentiateurs locaux de réponses systémiques. Bien que la PTH déclenche une production de cAMP, la synergie calcium/cAMP

n'intervient pas sur le site CRE mais sur le site SRE, par un mécanisme n'impliquant pas les MAPK, et qui pourrait être lié aux CaMK[37].

En effet, il existe un mécanisme d'activation de SRF en réponse au calcium par une voie indépendante des MAPK, via une phosphorylation par la CaMKIV[38].

Il semble donc que l'essentiel des effets connus du calcium sur la transcription soient contrôlés par la calmoduline. Cependant, un répresseur transcriptionnel a récemment été caractérisé pour le gène codant la prodynorphine humaine et qui se passerait de cette médiation de la calmoduline. Baptisé DREAM (*downstream regulatory element antagonist modulator*), ce dernier ne fixerait plus l'ADN en présence de calcium et ceci grâce à la présence de motifs susceptibles de lier directement Ca^{2+} (EF-hands). La cible nucléaire de DREAM, appelée DRE, n'est efficace que lorsqu'elle est placée en aval du site de démarrage (fig. 8). *c-fos* serait également une cible de ce répresseur calcium-dépendant[39]. Il est à noter que la PKA peut contrecarrer l'action de DREAM via CREM α , illustrant à nouveau l'utilisation de couplages entre plusieurs stimulus[40]. En outre, DREAM est une protéine multifonctionnelle : elle fait partie d'une famille de modulateurs de l'activité d'un canal potassique, mais ceci est une autre histoire[41]...

5° Effets sur la progression des RNA polymérases et la structure de la chromatine

Le démarrage de la transcription n'est pas le seul niveau touché par le calcium. La régulation peut intervenir également plus en aval, alors que les RNA polymérases ont commencé à transcrire. Dans certains tissus ou types cellulaires en culture, le gène *c-fos* présente des polymérases engagées dans le processus de transcription bien que ne conduisant pas à la formation d'un transcrit complet[42, 43]. Ce blocage intervient à la fin du premier exon et présente certaines analogies avec le mécanisme d'atténuation décrit chez les procaryotes. Ainsi, dans les

macrophages murins en culture primaire, la reprise de la transcription de *c-fos* est induite par de nombreux stimulus qui tous nécessitent la mobilisation du calcium intracellulaire. La levée du blocage ne peut être obtenue si l'on chélate spécifiquement cet ion, sans que le démarrage de la transcription en soit affecté[43]. Le même processus a été décrit dans des lymphocytes T[44]. Une analyse détaillée (dans des fibroblastes murins, où ce phénomène existe, bien que moins efficace) suggère que les effets du calcium nécessitent le complexe Ca^{2+} -CaM, mais pas la calcineurine ni les CaMK. En outre, le W7, un antagoniste de la calmoduline, active très fortement la transcription de *c-fos*, suggérant la levée d'une répression relayée par le complexe Ca^{2+} -CaM indépendamment de ses effecteurs connus, très probablement au niveau de certains facteurs d'élongation non identifiés (fig. 8) [45].

Il apparaît donc que, lorsque le contrôle de l'expression d'un gène doit être très serré, comme c'est le cas pour un proto-oncogène, un verrou supplémentaire puisse être utilisé, intervenant au niveau de la progression des polymérase en plus de la régulation du démarrage de la transcription.

Le calcium peut avoir des effets plus généraux sur la transcription en agissant sur le remodelage de la chromatine. En effet, en plus de recruter la RNA polymérase, CBP affecte aussi la structure chromatinienne adjacente à son site de fixation. CBP possède une activité histone acétyl transférase (HAT) (fig. 7) et s'associe à une autre protéine qui possède le même type d'activité : P/CAF[46]. En acétylant les résidus lysine présents dans la partie amino terminale des histones, elles rendent la chromatine plus lâche, donc plus accessible à la machinerie transcriptionnelle. Il semblerait toutefois que seule CBP soit requise pour la médiation des effets calciques passant par le CRE[32]. A l'inverse, il semble que la phosphorylation de MEF2 par les CaMK détruise son interaction avec une Histone DésACétylase (HDAC), ce qui empêcherait la répression chromatinienne

associée à cette activité[36]. De plus, le complexe Ca^{2+} -CaM pourrait directement entrer en compétition avec MEF2 pour sa liaison avec HDAC4[47]!

Le calcium peut donc agir à différents niveaux sur la transcription qui vont de la translocation spécifique de certains facteurs du cytoplasme vers le noyau, au remodelage ciblé de la chromatine. Nombre de ces effets sont relayés par des enzymes dont l'activité est stimulée par la fixation du complexe Ca^{2+} -CaM. Ce dernier peut également avoir des effets inhibiteurs directs en se fixant par exemple à certaines protéines de la famille bHLH, en diminuant considérablement leur affinité pour l'ADN[48], ou encore à des facteurs qui pourraient agir au niveau de la progression des RNA polymérases bien après que le démarrage de celles-ci a eu lieu[45]. Toutefois, la calmoduline n'est pas toujours le médiateur, et le calcium peut agir directement sur un facteur de transcription, comme c'est le cas pour DREAM[39]. Finalement, la distribution spatiale et temporelle des flux calciques semble jouer un rôle au moins aussi important que leur intensité.

6° Aspects physiopathologiques

La plupart des maladies neurodégénératives s'accompagnent de niveaux anormalement élevés de calcium intracellulaire, sous l'influence de stimulations synaptiques soutenues : ce phénomène est connu sous le nom d'excitotoxicité, [27]. Les bases moléculaires de cette toxicité sont mal connues : est-elle due à l'activation forcée des voies de signalisation classiques ou à une voie particulière encore inconnue ? La mort cellulaire résulte-t-elle d'un processus nécrotique ou apoptotique ? Quelle est la part des effets transcriptionnels dans ces processus ? Bien sûr ces questions suscitent un intérêt important de la part de la communauté concernée.

L'activité de CREB serait requise pour le développement correct de la mémoire à long terme, et non à court terme. CREB a été impliqué dans des

processus très primitifs de mémorisation chez l'aplysie, un mollusque marin, et la drosophile, mais des expériences menées chez la souris et le rat montrent que ce facteur a un rôle dans des processus aussi complexes que l'apprentissage social et spatial. Ainsi, l'invalidation génique partielle de CREB (CREB ^{$\alpha\Delta$ -}) compromet sérieusement les tâches faisant appel à la mémoire à long terme. Ces souris CREB ^{$\alpha\Delta$ -} montrent des déficits importants dans les tests de conditionnement à la douleur (associée à un autre stimulus) et de transmission sociale des préférences alimentaires au bout de 24h, alors qu'aucun déficit n'est détecté au bout de 30 minutes. Il semble que la durée des cycles de phosphorylation/déphosphorylation de CREB dans les neurones soit contrôlée par l'antagonisme CaMKIV/calcineurine. La durée de phosphorylation de CREB serait un déterminant majeur du déclenchement (ou non) de la potentiation à long terme, base neuronale de la mémoire[49].

Les facteurs NF-AT sont connus pour leurs rôles dans la plasticité synaptique, le développement et l'hypertrophie cardiaques, et bien sûr dans l'inflammation[10]. Ainsi, de nombreuses étapes de l'activation des leucocytes s'accompagnent d'augmentations de la concentration en calcium intracellulaire. L'effet immunosuppresseur de la cyclosporine A, qui inhibe la calcineurine, va dans le sens d'un rôle pour le calcium dans l'activation et le maintien des défenses immunitaires.

L'activité de la calcineurine peut aussi être inhibée par ses propres effecteurs, sous forme d'une boucle d'action en retour. C'est le cas de DSCR1 et Rcnp1, caractérisés respectivement chez l'homme et la levure ; DSCR1, localisé sur le chromosome 21 et exprimé fortement dans le cœur, le muscle et le cerveau, serait responsable de certains symptômes du syndrome de Down (trisomie 21)[10].

Au cours du cycle cellulaire et du développement, le déclenchement de la mitose et d'autres phases coïncident aussi avec de forts influx de calcium intracellulaire. La CaMKII semble impliquée, bien qu'on n'ait pu établir un lien direct avec la machinerie des cyclines[11].

Enfin, la récente découverte de DAP-kinase introduit également un lien avec le cancer. En effet, les propriétés pro-apoptotiques de cette protéine en font un suppresseur de tumeur présomptif. Ainsi, il semble que le gène correspondant puisse être inactivé par méthylation dans certaines lignées cancéreuses[50].

Dans toutes ces situations, le message calcique active rapidement l'expression de gènes de réponse précoce, dont les produits vont à leur tour induire l'expression de gènes-clés dans une situation physiologique donnée. Le calcium constitue donc une étape primordiale dans l'élaboration d'une réponse à long terme pour un ensemble donné de stimulus brefs, dans un contexte cellulaire qui conditionne la spécificité de la réponse.

Remerciements

Nous remercions vivement Marc Moreau, Catherine Leclerc, Robert A. Hipskind, Julie Perroy et Emmanuel Vignal pour leur lecture critique du manuscrit. V. C. est soutenu par la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Bibliographie sommaire

1. Lin P, Yao Y, Hofmeister R, Tsien RY et Farquhar MG, Overexpression of CALNUP (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca^{2+} storage in the Golgi. *J Cell Biol* 1999 **145**, 279-89.
2. Pozzo-Miller LD, Pivovarov NB, Leapman RD, Buchanan RA, Reese TS et Andrews SB, Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices. *J Neurosci* 1997 **17**, 8729-38.
3. Berridge MJ, Lipp P et Bootman MD, The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000 **1**, 11-21.
4. Berridge MJ, Lipp P et Bootman MD, The Calcium Signalling Toolkit: http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n1/poster_berridge/index.html. 2000.
5. Capiod T, Méry PF, Pacaud P et Takeda K, Des portes s'ouvrent sur les allées et venues des ions calcium. *médecine/sciences* 1995 **11**, 1027-1033.
6. Clapham DE, Calcium signaling. *Cell* 1995 **80**, 259-68.
7. Nakamura T, Barbara JG, Nakamura K et Ross WN, Synergistic release of Ca^{2+} from IP_3 -sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. *Neuron* 1999 **24**, 727-37.
8. Usachev YM et Thayer SA, Controlling the urge for a Ca^{2+} surge: all-or-none Ca^{2+} release in neurons. *Bioessays* 1999 **21**, 743-50.
9. Kiselyov KI, Shin DM, Wang Y, Pessah IN, Allen PD et Muallem S, Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol Cell* 2000 **6**, 421-31.
10. Crabtree GR, Calcium, calcineurin and the control of transcription. *J Biol Chem* 2000 **96**, 3.
11. Soderling TR, Chang BH et Brickey DA, Cellular Signaling Through Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent Protein Kinase II. *J Biol Chem* 2000 **28**, 28.
12. Corcoran EE et Means AR, Defining Ca^{2+} /CaM-Dependent Protein Kinase Cascades in Transcriptional Regulation. *J Biol Chem* 2000 **28**, 28.

13. Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA et Kimchi A, DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001 **3**, 1-7.
14. Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, et al., Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 1998 **280**, 1940-2.
15. Enslen H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ et Soderling TR, Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 **93**, 10803-8.
16. Lev S, Moreno H, Martinez R, et al., Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995 **376**, 737-45.
17. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR et Moon RT, The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000 **16**, 279-83.
18. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM et Chantray A, Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II [In Process Citation]. *Mol Cell Biol* 2000 **20**, 8103-11.
19. Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G et Tsien RY, Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca2+ spike frequency can optimize gene expression [see comments]. *Nature* 1998 **392**, 936-41.
20. Dolmetsch RE, Xu K et Lewis RS, Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression [see comments]. *Nature* 1998 **392**, 933-6.
21. Dupont G et Goldbeter A, CaM kinase II as frequency decoder of Ca2+ oscillations. *Bioessays* 1998 **20**, 607-10.
22. Bear MF et Malenka RC, Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1994 **4**, 389-99.
23. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM et Bading H, Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997 **385**, 260-5.
24. Deisseroth K, Heist EK et Tsien RW, Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 1998 **392**, 198-202.
25. Hardingham GE, Arnold FJ et Bading H, Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2001 **4**, 261-7.
26. Finkbeiner S et Greenberg ME, Spatial features of calcium-regulated gene expression. *Bioessays* 1997 **19**, 657-60.
27. Berridge MJ, Bootman MD et Lipp P, Calcium--a life and death signal [news]. *Nature* 1998 **395**, 645-8.
28. Werlen G, Jacinto E, Xia Y et Karin M, Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *Embo J* 1998 **17**, 3101-11.
29. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, et al., Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity [In Process Citation]. *Mol Cell* 2000 **6**, 539-50.
30. Shaywitz AJ et Greenberg ME, CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999 **68**, 821-61.
31. Hardingham GE, Chawla S, Cruzalegui FH et Bading H, Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron* 1999 **22**, 789-98.
32. Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR et Bading H, CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 1998 **281**, 1505-9.
33. Cruzalegui FH, Hardingham GE et Bading H, c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *Embo J* 1999 **18**, 1335-44.
34. Bito H, Deisseroth K et Tsien RW, Ca2+-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 1997 **7**, 419-29.
35. Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, et al., MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *Embo J* 2000 **19**, 1963-73.
36. Blaeser F, Ho N, Prywes R et Chatila TA, Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* 2000 **275**, 197-209.
37. Bowler WB, Dixon CJ, Halleux C, et al., Signaling in human osteoblasts by extracellular nucleotides. Their weak induction of the c-fos proto-oncogene via Ca2+ mobilization is strongly potentiated by a parathyroid hormone/cAMP-dependent protein kinase pathway independently of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999 **274**, 14315-24.

38. Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T et Greenberg ME, Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* 1995 **15**, 3672-84.
39. Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B et Naranjo JR, DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor [see comments]. *Nature* 1999 **398**, 80-4.
40. Ledo F, Carrion AM, Link WA, Mellstrom B et Naranjo JR, DREAM-alphaCREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 2000 **20**, 9120-6.
41. An WF, Bowlby MR, Betty M, et al., Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000 **403**, 553-6.
42. Mechti N, Piechaczyk M, Blanchard JM, Jeanteur P et Lebleu B, Sequence requirements for premature transcription arrest within the first intron of the mouse c-fos gene. *Mol Cell Biol* 1991 **11**, 2832-41.
43. Collart MA, Tourkine N, Belin D, Vassalli P, Jeanteur P et Blanchard JM, c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent block to elongation in intron 1. *Mol Cell Biol* 1991 **11**, 2826-31.
44. Lee G et Gilman M, Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells. *Mol Cell Biol* 1994 **14**, 4579-87.
45. Coulon V, Veyrune JL, Tourkine N, Vie A, Hipkind RA et Blanchard JM, A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. *J Biol Chem* 1999 **274**, 30439-46.
46. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH et Nakatani Y, The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 1996 **87**, 953-9.
47. Youn HD, Grozinger CM et Liu JO, Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem* 2000 **275**, 22563-7.
48. Corneliussen B, Holm M, Waltersson Y, et al., Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature* 1994 **368**, 760-4.
49. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW et Kida S, CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998 **21**, 127-48.
50. Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, et al., DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 1997 **15**, 403-7.
51. Blanchard J-M, Le proto-oncogène c-fos : un "entremetteur" moléculaire. *médecine/sciences* 1992 **8**, 455-470.

Légendes des figures

Figure 1 : Sources de calcium et voies d'entrée dans le cytosol.

Les disques noirs désignent les ions calcium.

Le calcium peut entrer depuis le milieu extracellulaire par (de gauche à droite) : un canal couplé à un récepteur (métabotrope) à 7 domaines transmembranaires via une protéine G, un récepteur-canal (ionotrope), un canal sensible au potentiel, ou un canal activé par les réserves intracellulaires (*Store-Operated calcium Channel*, SOC).

Le Réticulum Endoplasmique (RE) (ou Sarcoplasmique, RS, dans le muscle) peut libérer du calcium par les récepteurs de l'InsP3 (InsP3R) ou par les canaux sensibles à la ryanodine (RyR). Ces réserves internes sont maintenues grâce à l'activité des SERCA (*Smooth ER Calcium ATPase*), qui pompent le calcium à l'inverse du gradient en consommant de l'énergie. Ces SERCA sont la cible de la thapsigargine. Le CICR (*Calcium-Induced Calcium Release*) est l'activation des canaux InsP3R ou RyR par l'ouverture des canaux sensibles au potentiel. Inversement, les SOC de la membrane plasmique s'ouvrent lorsqu'ils sont activés par les canaux InsP3R ou RyR.

Les canaux nucléaires, encore hypothétiques, ne sont pas représentés.

Figure 2 : Principales voies activées par Ca^{2+} -CaM.

Cette figure récapitule la cascade des CaM-kinases et les spécificités fonctionnelles de CaMKII. En grisé sont représentées les principales voies qui affectent ou sont affectées par cette cascade.

Les flèches désignent des activations, ou des inhibitions lorsqu'elles sont barrées.

Ainsi, les CaMK I et IV nécessitent l'activité CaMKK pour être pleinement activées, tandis que CaMK II peut s'autophosphoryler (flèche circulaire). Sont représentés les dialogues entre la PKA et les CaMK, ainsi que l'influence du calcium sur Pyk2 et donc sur la voie des MAP-Kinases, en aval de Ras.

Figure 3 : Spécificité spatiale des effets du calcium sur la transcription.

Basée sur le travail de Hardingham et coll. , cette figure montre comment le calcium affecte la transcription dépendante de SRE (*Serum Responsive Element*) ou CRE (*Ca-cAMP Responsive Element*) selon la localisation cytoplasmique ou nucléaire de l'influx calcique. Ainsi, les flux calciques nucléaires suffiraient à déclencher la transcription dépendant de CREB sans translocation de la CaM.

Figure 4 : Calcineurine et localisation de NF-AT .

La sous-unité catalytique CnA de calcineurine est activée lorsque sa sous-unité régulatrice, CnB, est chassée par fixation de Ca^{2+} -CaM. Cette forme active déphosphoryle alors NF-AT, permettant son importation dans le noyau grâce à un NLS (Séquence de Localisation Nucléaire).

Certaines kinases nucléaires décrites dans le texte entrent en compétition avec CnA- Ca^{2+} -CaM car elles phosphorylent NF-AT de manière à rendre son NES (Séquence d'Export Nucléaire) fonctionnel, et à le renvoyer dans le cytoplasme.

La localisation subcellulaire de NF-AT est donc la résultante d'un équilibre dynamique entre les activités de la calcineurine et de kinases nucléaires.

Figure 5 : NF-AT : un facteur bipartite intégratif.

Les facteurs NF-AT sont constitués d'une composante nucléaire, qui peut être AP1, c-MAF, GATA4, MEF2,... et d'une composante qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme : NF-ATc. La diversité des partenaires de NF-ATc et l'activation de NF-AT c et n par des voies très différentes permettent i) une combinatoire étendue dans la formation de dimères et ii) une modulation fine de l'expression génique, en intégrant différents aspects du contexte cellulaire.

Figure 6 : CREB : une cible multiple des voies activées par le calcium.

Le complexe calcium/CaM peut activer la phosphorylation de CREB par les CaMK II et IV. Cependant, outre la Sérine 133, CaMKII phosphoryle aussi la Ser 142, qui a un effet inhibiteur. CREB est aussi phosphorylé sur Ser133 suite à l'activation de la cascade des MAPK via Pyk2 ou Ras-GRF.

Figure 7 : Rôles de CBP

A la fois activé par CaMKIV et par recrutement sur CREB phosphorylé, CBP sert à la fois :

- i) de pont moléculaire entre les activateurs spécifiques (ici CREB) et la machinerie de base de la transcription (ARN polymérase et facteurs généraux associés), vraisemblablement via RHA, une ARN hélicase, et
- ii) d'histone acétyl-transférase, permettant une décompaction de la chromatine propice à l'activation de la transcription.

CREB lui-même interagit directement avec certains facteurs associés à l'ARN polymérase (Pol II), comme TAF130.

Figure 8 : Effets du calcium en aval du site de démarrage de la transcription : l'exemple du gène *c-fos*.

En plus des effets du calcium sur les séquences promotrices situées en amont du site de démarrage de la transcription (principalement SRE et CRE), il existe une régulation intragénique de la transcription de *c-fos* :

DREAM, un répresseur qui lie le site DRE (*Downstream Repressor Element*), libère ce site et permet l'accumulation du messenger lorsqu'il chélate des ions calcium. Son activité de répression peut aussi être levée par interaction avec CREM α .

Le calcium a aussi un effet plus en aval dans le gène *c-fos* : l'allongement des transcrits au-delà d'un site de blocage n'est efficace qu'en présence de fortes concentrations de calcium cellulaire. La levée de cette pause est liée à la calmoduline, indépendamment des CaMK et de la calcineurine.

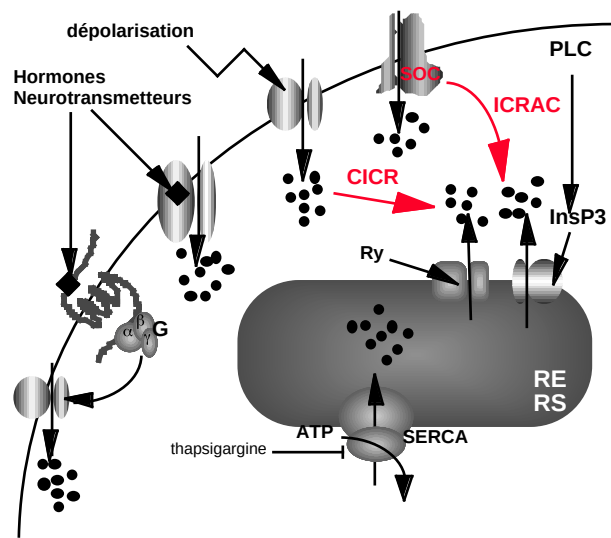


Figure 1

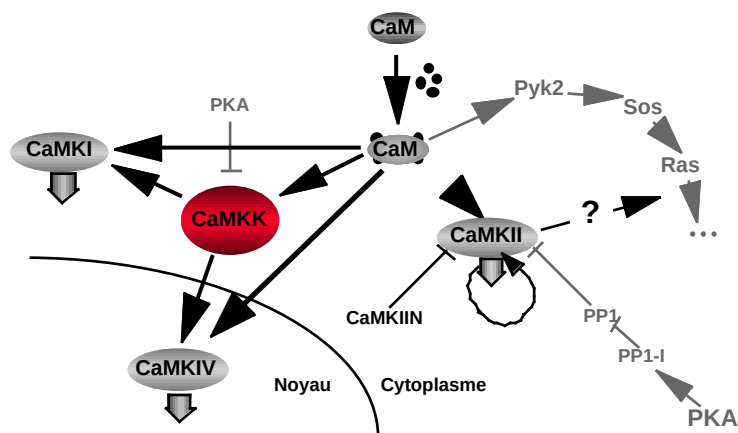


Figure 2

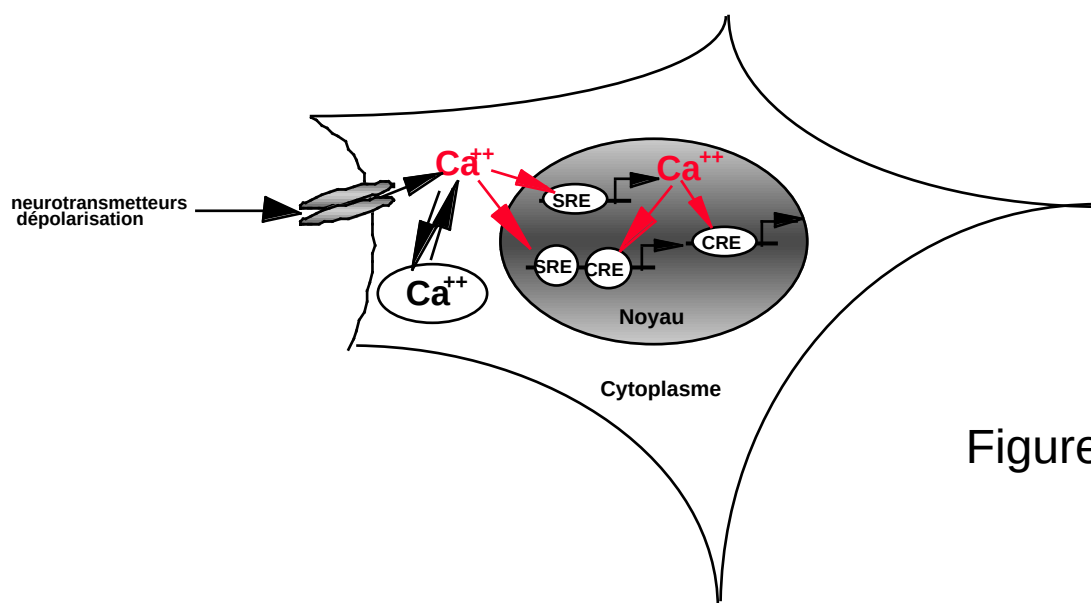


Figure 3

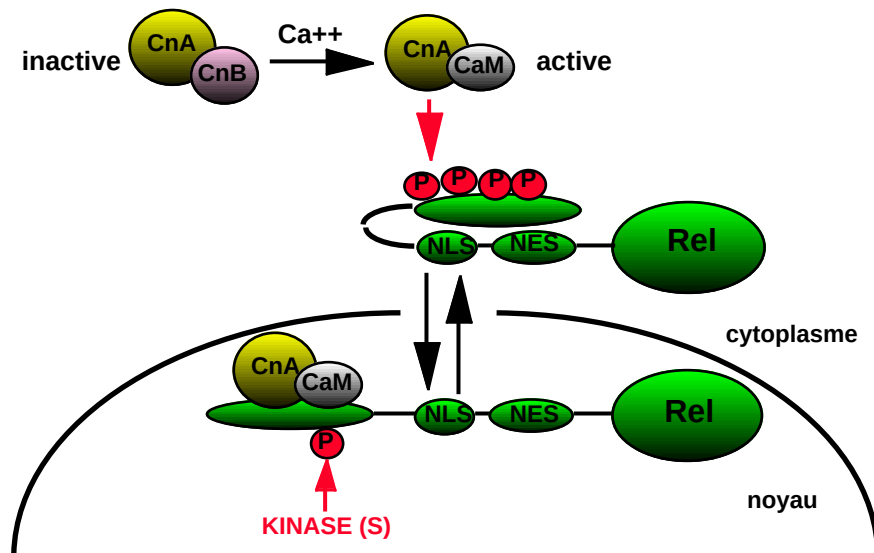


Figure 4

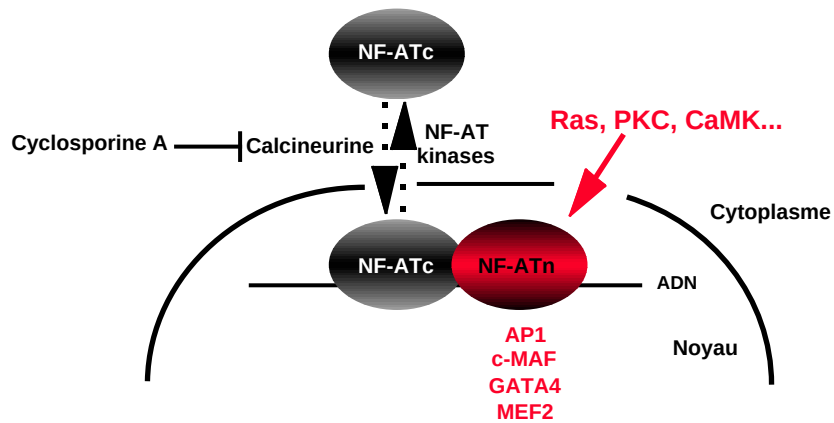


Figure 5

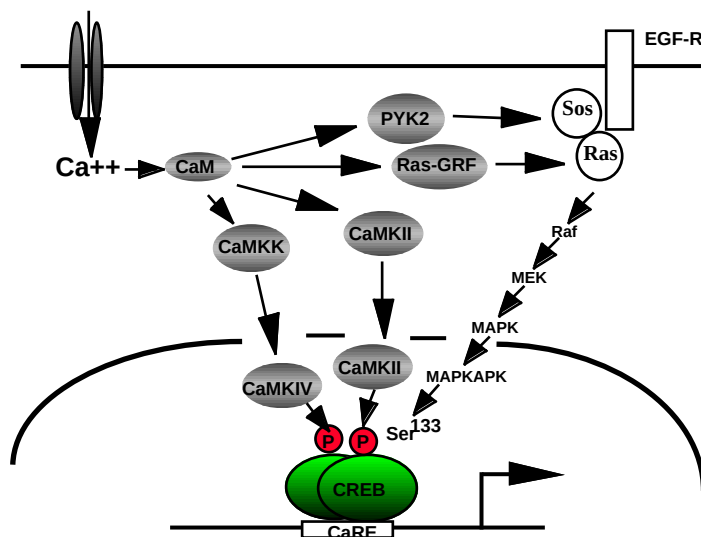


Figure 6

Figure 7

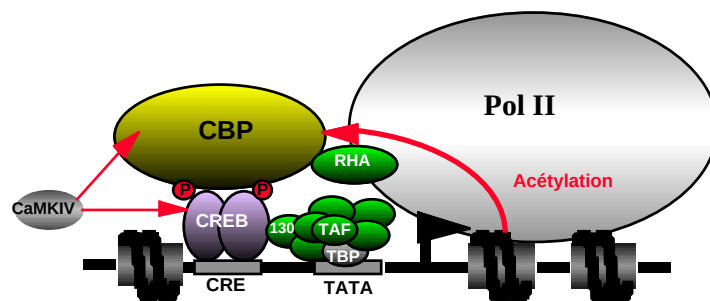
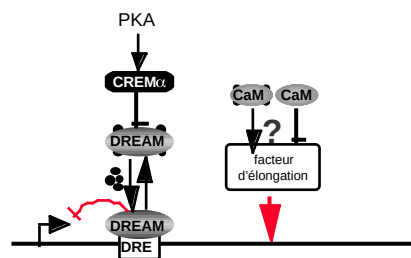


Figure 8



Discussion de la publication n°1

La transcription de *c-fos* peut être activée par le calcium de différentes façons, qui coexistent et varient suivant le type cellulaire et les autres stimulations. En résumé, le démarrage de la transcription peut être activé par CREB, phosphorylé sur ser133 par les CaM-Kinases, la PKC ou Rsk2 (MAPKAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase*). De plus, SRF est aussi phosphorylé par les CaMK en réponse au calcium. Un niveau de complexité supplémentaire est apporté par les dialogues entre des voies réputées différentes : ainsi le calcium peut activer la voie MAPK via Pyk.

Un nouveau facteur de transcription liant directement le calcium, DREAM (*Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator*), a été proposé comme régulateur de *c-fos* (Carrion et al., 1999). Cependant, les données sur ce point sont trop préliminaires et sujettes à caution : obtenues en transfection transitoire, elles ne renseignent pas sur l'effet de DREAM sur *c-fos* endogène.

Selon les types cellulaires, l'importance relative de la voie calcique vis-à-vis des autres voies peut varier. Ainsi, dans les cellules PC12 elle est prédominante (ce qui reflète l'importance du calcium dans les cellules de type neuronal) alors que dans d'autres types cellulaires elle ne suffit pas pour obtenir une induction maximale (fibroblastes, surtout Ltk- : Coulon et al., 1999).

Au niveau de l'élongation, un mécanisme faisant intervenir la CaM permet de bloquer les ARN polymérases, blocage qui est levé par l'augmentation de calcium intracellulaire (Coulon et al., 1999). C'est ce mécanisme que nous avons caractérisé dans la publication n°2.

En conclusion, certains aspects de la régulation de *c-fos* sont bien représentés par son seul promoteur en transfection transitoire, mais Curran et coll. ont montré qu'il fallait un maximum de séquences régulatrices de *c-fos* pour obtenir la même régulation *in vivo* (Robertson et al., 1995). De même, la qualité transitoire de l'accumulation du messager est en partie due aux séquences d'instabilité qui se trouvent dans la 3'UTR. Il apparaît donc que des séquences intragéniques sont importantes pour la régulation *in vivo*.

Nous avons au laboratoire des données qui vont dans le sens d'une importance des régions intragéniques dans la régulation transcriptionnelle de *c-fos*, en plus de toutes celles présentées ci-dessus. Certaines de ces régions jouent un rôle dans une étape moins étudiée de la transcription : l'allongement des ARN ou élongation transcriptionnelle (voir §III.3).

3. Elongation de la transcription

La transcription, en tant qu'étape première de l'expression des gènes de classe II (ceux qui codent des protéines), est un phénomène très abondamment étudié. Cependant la très grande majorité de ces travaux concernent le recrutement et l'activation des facteurs de transcription de base et spécifiques, et donc le démarrage de la transcription. Or la transcription n'a pas lieu "en roue libre", et le maintien de la processivité de l'ARN polymérase nécessite des mécanismes actifs dont certains sont réglés en fonction de signaux extra- et intracellulaires.

3.1. Elongation de la transcription : aspects généraux

3.1.1. La transcription n'est pas un processus continu

Au cours de la transcription, L'ARN polymérase II a tendance à faire des pauses dues à la présence d'obstacles, comme certaines structures de l'ADN-matrice ou des protéines liées à cette matrice sur son passage. En effet, l'élongation est un mécanisme actif et régulé, comme en témoignent les multiples blocages de transcription observés *in vitro* avec des polymérases purifiées.

Parmi ces interruptions de transcription, on distingue : les pauses suivies de redémarrages, les arrêts plus définitifs, et la terminaison prématurée, qui s'accompagne du relarguage de l'ARN avorté (Uptain et al., 1997). Les frontières entre ces phénomènes sont floues, et ils peuvent représenter plusieurs étapes d'un même événement : arrêt suivi de terminaison, par exemple. De plus la durée de vie des transcrits avortés doit être très courte car ils sont difficiles à détecter.

Ces événements ont le plus souvent été caractérisés *in vitro*, et les blocages d'élongation observés *in vivo* sont souvent difficiles à classer dans l'une ou l'autre de ces catégories.

3.1.2. Rôle du CTD de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II

La grande sous-unité de l'ARN polymérase II possède en son domaine carboxy-terminal (CTD) des répétitions de l'heptade YSPTSPS (26 répétitions chez la levure, 52 chez l'homme et la souris). Cette caractéristique unique en fait la cible de modifications post-traductionnelles dont des phosphorylations. Ainsi, on distingue les formes IIa (non phosphorylée) et IIo (fortement phosphorylée) de la polymérase.

La phosphorylation du CTD joue un rôle dans la maturation des ARN : coiffage, épissage, polyadénylation. Le CTD tiendrait lieu de plate-forme d'interactions avec les complexes responsables de ces processus (Bensaude et al., 1999).

De façon troublante, la forme Ilo est associée aux polymérases en train de transcrire alors que Ila correspond aux polymérases installées sur le promoteur (O'Brien et al., 1994). De plus, Ilo serait plus efficace que Ila en termes de processivité (Lee and Greenleaf, 1997). Il a donc été suggéré un rôle pour ces phosphorylations dans l'élongation des ARN. Il faut noter toutefois qu'un CTD phosphorylé inhibe la liaison de la polymérase au site de démarrage (Bensaude et al., 1999) : il apparaît donc que le CTD doit être déphosphorylé pour établir le complexe de pré-initiation, et phosphorylé pour stimuler l'élongation. Ainsi, cycline C/cdk8 est une CTD-kinase mais elle ne stimule pas l'élongation : il semble plutôt qu'elle inhibe le démarrage. Cependant, cycline C/cdk8 inhibe TFIIH par phosphorylation (Akoulitchev et al., 2000): elle intervient donc aussi dans l'amorçage de l'élongation (*promoter clearance*, voir §3.1.3.2).

Les 52 répétitions d'un heptapeptide contenant 5 accepteurs de phosphate (YSPTSPS) permettent d'obtenir des profils de phosphorylation très variés, susceptibles de fournir un code riche en information, comme celui qui a été proposé pour les modifications des histones (Strahl and Allis, 2000). Pour l'instant la spécificité des CTD-kinases pour certains résidus de l'heptapeptide ou pour certains heptapeptides est peu claire.

L'état de phosphorylation global du CTD varie dans la réponse aux chocs thermiques (Dubois et al., 1994). Dans ce dernier cas, l'augmentation de phosphorylation permettrait l'induction des gènes codant pour des HSP (*Heat Shock Proteins*), dont certains sont réglés au niveau de l'élongation (Uptain et al., 1997).

Le contrôle de l'état de phosphorylation du CTD repose sur les effets antagonistes d'une phosphatase spécifique, FCP1, et de différentes kinases. ERK1/2, DNA-PK, plusieurs couples cycline-cdk, et certains des facteurs d'élongation présentés en 3.1.3 sont des CTD-kinases *in vitro* (Bensaude et al., 1999). Le rôle réel de la plupart de ces kinases *in vivo* reste à démontrer.

3.1.3. Principaux facteurs d'élongation

La vitesse réduite de polymérases purifiées *in vitro* et l'existence de blocages à l'élongation suggèrent qu'*in vivo* il existe des facteurs susceptibles, soit de régler la vitesse des polymérases, soit de faciliter leur passage à travers des obstacles accidentels ou non (Uptain et al., 1997). Cette hypothèse a conduit à la recherche et à l'identification de plusieurs facteurs d'élongation dont les rôles respectifs sont en train d'être élucidés ; les principaux sont représentés dans la figure 8.

Il existe différents facteurs positifs et négatifs identifiés pour leurs rôles dans le contrôle de la processivité des polymérases i) en cours de transcription (accélération, ralentissement) ou ii) pour régler le passage de blocages de transcription qui peuvent être régulés. Dans cette dernière catégorie on distingue ceux qui, comme TFIIIS, réactivent la polymérase suite à des accidents de parcours (erreurs, structure difficile à passer,..) et ceux qui suppriment les pauses transitoires de la transcription.

3.1.3.1. Les freins

Plusieurs facteurs d'élongation ont été identifiés grâce à l'utilisation du DRB (5, 6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole), un inhibiteur chimique de l'élongation dont l'effet s'accompagne d'une déphosphorylation du CTD (Dubois et al., 1994).

Ainsi, DSIF (*DRB Sensitivity Inducing Factor*, Wada et al., 1998) et NELF (*Negative ELongation Factor*, Yamaguchi et al., 1999) sont des facteurs inhibiteurs de l'élongation qui coopèrent pour réprimer la transcription *in vitro*. Ils interagissent spécifiquement avec la forme IIa du CTD. Ces deux facteurs agissent à la même étape que P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*), et vont à l'encontre de son action.

3.1.3.2. Les accélérateurs

TFIIH est un facteur général de transcription qui contient une activité CTD-kinase, cycline H/cdk7. Cette activité semble s'exercer au tout début de l'élongation, une étape appelée "*promoter clearance*". En effet TFIIH disparaît précocément des complexes d'élongation (Conaway et al., 2000). De même TFIIIE et TFIIIF semblent stimuler cette étape d'amorçage de l'élongation (fig. 8b).

P-TEFb est un complexe contenant une activité CTD-kinase, portée par cdk9 (et proposée comme cible majeure de DRB), et une cycline (T1, T2, ou K). L'activité CTD-kinase de P-TEFb intervient plus tard que celle de TFIIF (Price, 2000, fig. 9). Il antagonise l'effet des facteurs DSIF et NELF, vraisemblablement en les séparant du CTD par phosphorylation de ce dernier. P-TEFb est nécessaire à la protéine Tat du VIH (fig. 9) pour stimuler la transcription des gènes viraux (Mancebo et al., 1997; Zhu et al., 1997), mais participe vraisemblablement aussi à la régulation de gènes cellulaires. En effet NF- κ B recrute P-TEFb pour stimuler l'élongation (Barboric et al., 2001), et chez la drosophile P-TEFb est associé à plus de 200 sites différents sur des chromosomes polytènes (Lis et al., 2000). Dans ce système il est recruté sur les gènes *hsp* en réponse aux chocs thermiques (Lis et al., 2000) : P-TEFb participe donc certainement à la phosphorylation du CTD observée dans ces conditions (Dubois et al., 1994).

TFIIS est un facteur d'élongation d'un genre particulier : il intervient lors de blocages de la polymérase par des obstacles divers *in vitro* et démasque une activité endonucléase intrinsèque à la pol II qui clive le transcrit naissant, ce qui replace son extrémité 3'OH dans le site catalytique et permet le redémarrage (Wind and Reines, 2000).

Un facteur récemment identifié, FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*), permet la reprise de l'élongation lorsque celle-ci est bloquée par la structure de la chromatine (Orphanides et al., 1998). Cette activité ne nécessite pas d'hydrolyse d'ATP, elle ne correspond donc pas à une machine à remodeler la chromatine comme SWI/SNF. FACT coopérerait avec P-TEFb dans l'inactivation de DSIF/NELF, mais sans stimuler l'activité kinase de cdk9 (Wada et al., 2000). Son mode d'action serait plutôt de "démonter" les nucléosomes pour relâcher la chromatine (Orphanides et al., 1999). La processivité des pol II serait donc la résultante de l'équilibre dynamique entre les activités FACT/ P-TEFb et DSIF/NELF.

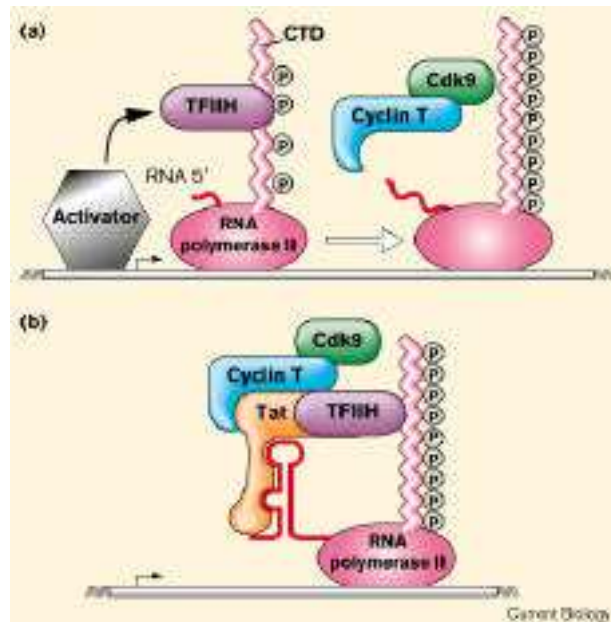


Figure 9 : (a) Modèle décrivant les étapes distinctes où interviennent TFIID et P-TEF-b pour phosphoryler le CTD. (b) Dans le cadre de la transcription du VIH, Tat se fixe sur l'ARN naissant structuré TAR et active les CTD-kinases de P-TEFb et TFIID (Yankulov and Bentley, 1998).

Le complexe des élonguines A, B et C stimule la processivité de pol II. L'élonguine A serait le principal facteur d'élongation de l'hétérotrimère et son activité serait fortement stimulée par la liaison du couple BC. Le suppresseur de tumeur VHL (*Von Hippel-Lindau*) interagit avec BC d'une manière qui exclut la liaison de l' élonguine A et donc inhibe l'élongation (Aso et al., 1995; Duan et al., 1995; Kibel et al., 1995). Les patients atteints du syndrome de von Hippel-Lindau sont prédisposés à toutes sortes de cancers : la protéine VHL, mutée ou absente, permettrait une transcription plus rapide de gènes-clés dans la tumorigénèse. Cependant, VHL fait aussi partie d'un complexe ubiquitine-ligase E3, et cette activité pourrait aussi être à l'origine de son activité de suppresseur de tumeurs (Kondo and Kaelin, 2001). De plus, les élonguines B et C sont en large excès par rapport à VHL (Kamura et al., 1998) : l'existence *in vivo* d'un titrage de BC par VHL est donc peu probable.

Elongator est un hétérohexamère qui interagit avec la pol II en cours d'élongation (Winkler et al., 2001), et cette interaction nécessite la phosphorylation du CTD (Otero et al., 1999). Elongator contient une activité HAT (Wittschieben et al., 1999), ce qui suggère qu'il puisse décompacter la chromatine pour permettre l'élongation.

D'autres protéines ont une activité de stimulation de l'étape d'élongation de la transcription : CSB, impliquée aussi dans la réparation et le remodelage de la chromatine (Selby and Sancar, 1997), ELL (Shilatifard et al., 1996), apparentée aux élonguines, et ses homologues ELL2 et 3,...

3.1.3.3. Conclusion

L'importance biologique de l'élongation est soulignée par l'existence de maladies dues à des mutations de facteurs d'élongation : des mutations de VHL causent le syndrome de von Hippel-Lindau, ELL est transloqué dans certaines leucémies myéloïdes aiguës (Thirman et al., 1994), et le syndrome de Cockayne est lié à CSB (Conaway and Conaway, 1999). De plus, *foggy*, un nouveau facteur d'élongation de la transcription apparenté à DSIF, joue un rôle important dans le développement neural du poisson-zèbre (Guo et al., 2000).

Pour la plupart de ces facteurs d'élongation, on ignore s'ils interviennent, *in vivo*, dans la stimulation de la vitesse de transcription ou dans le passage d'obstacles par la pol II. De même, leur spécificité vis-à-vis de certains gènes-cibles *in vivo* reste à définir : certains sont sans doute des facteurs généraux d'élongation et d'autres plus spécifiques de certains gènes.

Enfin, certains blocages de transcription ne dépendent pas du promoteur utilisé, comme celui de *c-fos* (voir §III.3.2.4). A l'inverse, le blocage dans le gène *hsp70* est spécifique du promoteur (Brown et al., 1996). Dans ce cas le facteur de transactivation HSF1 stimule l'élongation en plus du démarrage, comme cela a été montré pour d'autres facteurs (Yankulov et al., 1994). Très récemment il a été montré que NF- κ B stimule aussi l'élongation en recrutant P-TEFb (Barboric et al., 2001).

Sans doute des mécanismes différents sont-ils en œuvre dans ces deux types de blocage : le premier ne dépend pas du promoteur mais de séquences intragéniques ; quant au second, il requiert des événements de recrutement qui nécessitent des facteurs liés au promoteur.

3.2. Régulation de l'élongation de la transcription de *c-fos*

3.2.1. Premiers indices

Les premiers signes d'une régulation de l'élongation de la transcription de *c-fos* ont été obtenus au laboratoire dans des fibroblastes (Blanchard et al., 1988; Fort et al., 1987). En utilisant la technique de *run-on*, qui permet d'estimer la répartition des ARN polymérases le long de l'unité de transcription, on observe une population de polymérases qui transcrit les ~500 premières paires de bases du gène, mais très peu de transcription en aval de cette région. Ce blocage, obtenu dans des cellules rendues quiescentes par privation de sérum, n'est visible qu'après traitement à la cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, ce qui suggère un contrôle par une protéine instable. La stimulation par le sérum permet une levée partielle du blocage de transcription, en même temps qu'une augmentation du démarrage. L'efficacité de ce blocage varie selon les lignées cellulaires (Blanchard et al., 1988).

3.2.2. Un blocage de l'élongation répandu *in vivo*

Outre les fibroblastes, ce phénomène a été décrit dans d'autres types cellulaires : dans les hépatocytes (Sobczak et al., 1989), dans les macrophages en culture primaire (Collart et al., 1991) et les cellules myéloïdes HL-60 (Werlen et al., 1993), une lignée de lymphocytes T, 2B4 (Lee and Gilman, 1994), et le modèle "pseudo-neuronal" des cellules PC12 (Thompson et al., 1995). Dans de nombreux cas le blocage est visible sans traitement à la cycloheximide, ce qui renforce sa validité *in vivo*.

Le blocage de l'élongation a été observé dans des cellules et tissus humains (Blanchard et al., 1988; Werlen et al., 1993), murins (Blanchard et al., 1988; Collart et al., 1991; Mechti et al., 1991; Plet et al., 1995; Sobczak et al., 1989), de rat (Lamb et al., 1990; Thompson et al., 1995) et de hamster (Blanchard et al., 1988; Fort et al., 1987).

Il semble donc que ce phénomène soit général, même si son efficacité peut fortement varier d'un système à l'autre.

3.2.3. Stimulus affectant le blocage de transcription

Le blocage observé dans les hépatocytes murins au repos est levé lorsque l'on pratique une hépatectomie partielle (Sobczak et al., 1989).

Dans les fibroblastes CCL39, le sérum réduit l'efficacité de cette pause mais cet effet est très partiel (Fort et al., 1987).

Lorsque des macrophages murins sont mis en culture primaire, l'expression de *c-fos* s'éteint lentement. En *run-on*, on détecte des transcrits seulement dans la partie 5' du gène : il s'agit donc bien d'un blocage de l'élongation. De nombreux stimulus permettent de traverser ce blocage : la phagocytose, l'AMPc, le PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), le LPS (LipoPolySaccharide), certaines toxines,... Tous nécessitent la mobilisation de calcium intracellulaire : en fait, une augmentation de calcium est nécessaire et suffisante pour lever ce blocage (Collart et al., 1991).

Enfin, dans une lignée de lymphocytes T, seul le calcium (parmi d'autres signaux) stimule non seulement le démarrage de la transcription de *c-fos* mais aussi l'élongation au-delà du blocage (Lee and Gilman, 1994).

Dans tous ces cas le mécanisme de signalisation est inconnu ; nous avons cependant éclairci une partie de la voie calcique menant à la levée du blocage dans la publication n°2.

3.2.4. Séquences requises

Les séquences nécessaires au blocage de l'élongation ont été déterminées grâce à la mise en place d'un système *in vitro* qui reproduit ce phénomène (Mechti et al., 1991). Ainsi il a été montré que :

i) ce blocage ne dépend pas du promoteur de *c-fos* puisqu'il persiste avec d'autres promoteurs (MT et Ad2MLP),

ii) les polymérases s'arrêtent en un point unique et précis, 385 pb après le site de démarrage,

iii) un motif de 103 pb, situé de +310 à +413, est nécessaire et suffisant pour le blocage. L'ARN correspondant pourrait former une structure secondaire stable, de type tige-boucle ; de telles structures ont une activité favorisant la terminaison, ou atténuation, chez les procaryotes (Nudler, 1999).

Ces données de séquences ont été partiellement confirmées *in vivo* dans la publication n°2.

3.2.5. Pause ou terminaison prématurée?

Les *run-on* à haute résolution sur des temps courts (Plet et al., 1995) vont dans le sens d'une pause, avec un redémarrage rapide en réponse aux signaux, mais aucune donnée objective ne permet de trancher sur ce point.

Les tentatives de détection d'un transcrit avorté résultant du blocage des polymérases ont toutes échoué, jusqu'à l'utilisation d'œufs de Xénope où l'activité ribonucléase est très

faible. Ainsi, l'existence du blocage a été confirmée *in vivo* (Plet et al., 1995), et le site d'arrêt obtenu coïncide avec celui déterminé par Mechti et coll. (Mechti et al., 1991). De plus, ce travail a confirmé l'existence d'une bulle de transcription dans cette même région par empreinte génomique *in vivo* au permanganate (Plet et al., 1995). Cette technique exploite l'accessibilité au permanganate des thymidines qui ne sont pas appariées, et détecte ces nucléotides par clivage à la pipéridine.

De façon étonnante, le mécanisme du blocage dans *c-fos* semble très différent de celui qui affecte *c-myc*. En effet, dans ce dernier cas, le choix du promoteur détermine la processivité de la transcription (Miller et al., 1989; Spencer et al., 1990). De plus, l'infection de cellules d'ascites par le virus MVM renforce le blocage de transcription de *c-fos* mais pas celui de *c-myc* (Krauskopf et al., 1994).

Afin de déterminer le mécanisme du blocage, il faudrait utiliser, dans un système reconstitué *in vitro*, du sarkosyl, qui inhibe le redémarrage et ne permet qu'un seul cycle de transcription (Uptain et al., 1997).

3.2.6. Le cas de la séquence FIRE

Lamb et coll. ont identifié une nouvelle séquence intragénique de régulation de *c-fos*, FIRE (voir fig. 5). Il s'agit d'un palindrome conservé (de +212 à +225) qui, par titrage de protéines en microinjection (en conjonction avec un oligonucléotide SRE), déclenche une induction forcée de *c-fos* (Lamb et al., 1990). Cette région correspond à un des sites hypersensibles à la DNase identifiés précédemment (Renz et al., 1985) et se lie *in vitro* (retard sur gel) et *in vivo* (empreinte génomique) à des protéines (Lamb et al., 1990). Les tentatives de purification de ces protéines au laboratoire ont échoué.

Il était tentant de proposer un rôle pour cette séquence intragénique dans l'élongation. Cependant, plusieurs arguments vont à l'encontre de cette hypothèse :

- i) certaines constructions dépourvues de FIRE montrent toujours un blocage dans l'étude *in vitro* de Nadir Mechti (Mechti et al., 1991),
- ii) aucune corrélation n'a pu être établie entre la fixation de facteurs sur FIRE et le blocage de l'élongation dans les macrophages (Collart et al., 1991).

FIRE contrôlerait donc plutôt le démarrage de la transcription ; en tout cas il n'est pas nécessaire pour le blocage.

A l'issue de tous ces travaux, de nombreuses questions restaient ouvertes, dont principalement :

Le blocage de transcription observé en *run-on* est-il dû à la perte d'un facteur d'élongation lors de la préparation des noyaux ou à une réelle régulation in vivo?

Quelles voies de signalisation et quels facteurs contrôlent le blocage et sa levée en réponse aux signaux?

Nous avons commencé à répondre à ces questions dans la publication n°2.

RESULTATS

I. Calcium et blocage de la transcription de *c-fos*

1. Introduction et résumé de la publication n°2

Dans tous les travaux décrits dans le paragraphe III.3.2 de l'introduction, les arguments majeurs en faveur d'un blocage de transcription de *c-fos in vivo* ont été obtenus par la méthode de *run-on*. Or, cette technique comprend une étape de préparation des noyaux cellulaires pendant laquelle des facteurs pourraient être perdus. Ainsi, le blocage de transcription pourrait être un artefact dû à l'absence d'un facteur positif d'élongation dans ces préparations, ainsi que dans le système reconstitué de l'étude *in vitro* (Mechti et al., 1991). Ceci remettrait en cause l'existence d'un blocage efficace de transcription *in vivo* mais pas la possibilité de régulation à ce stade.

C'est pourquoi nous avons voulu vérifier l'existence de ce phénomène *in vivo*. Nous avons tiré parti du fait que le blocage existe indépendamment du promoteur utilisé (comme démontré *in vitro* par Mechti et coll.) en transfectant de façon stable une construction pMT-*fos* dans des fibroblastes Ltk-. Le promoteur MT, bien qu'inductible par les métaux lourds, est doté d'une activité de base importante dans nos conditions. Grâce à cette dernière propriété, il permet de vérifier par *northern blot* que le blocage intervient toujours *in vivo*. Ce phénomène existe donc réellement dans les fibroblastes.

Cette construction pMT-*fos* nous a fourni le moyen de découpler le démarrage et l'élongation de la transcription, afin d'étudier exclusivement le blocage de l'allongement des transcrits.

Ainsi, nous avons pu pratiquer diverses délétions dans les séquences intragéniques de *fos* pour identifier celles qui sont requises pour le blocage. Les résultats confirment ceux de l'étude *in vitro* (Mechti et al., 1991).

De plus, la sensibilité au calcium a pu elle aussi être testée par simple *northern blot*. Nous avons montré que, comme dans les macrophages (Collart et al., 1991) et les lymphocytes T (Lee and Gilman, 1994), une augmentation de calcium intracellulaire lève le blocage et permet à la transcription de continuer le long du gène (fig. 10).

Nous avons voulu déterminer quelle voie de signalisation activée par le calcium débouchait sur la reprise de la transcription de *c-fos*. A l'aide d'inhibiteurs et de kinases mutantes, nous avons montré que ni les CaM-Kinases, ni la calcineurine n'étaient requises pour ce phénomène. Par contre, nous montrons que la calmoduline, médiateur majeur des effets du calcium, est impliquée (fig. 11).

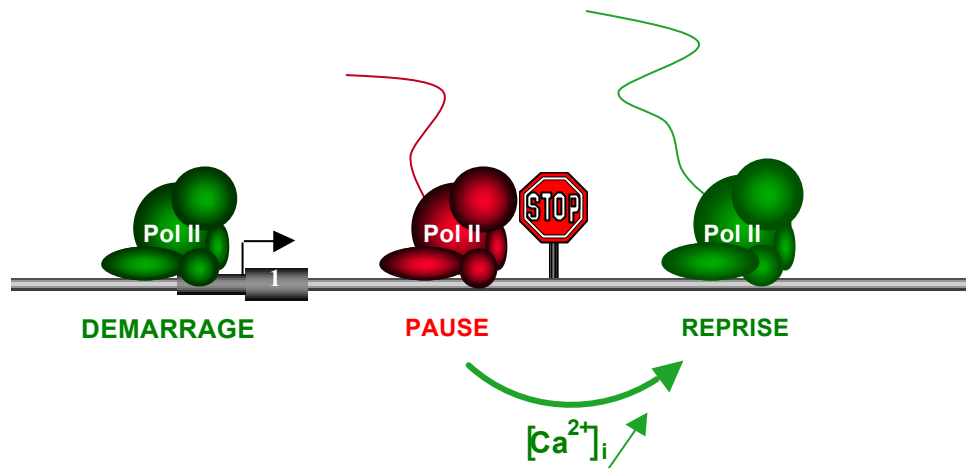


Figure 10 : Hypothèse d'une pause sensible au calcium dans le premier intron de *c-fos*.

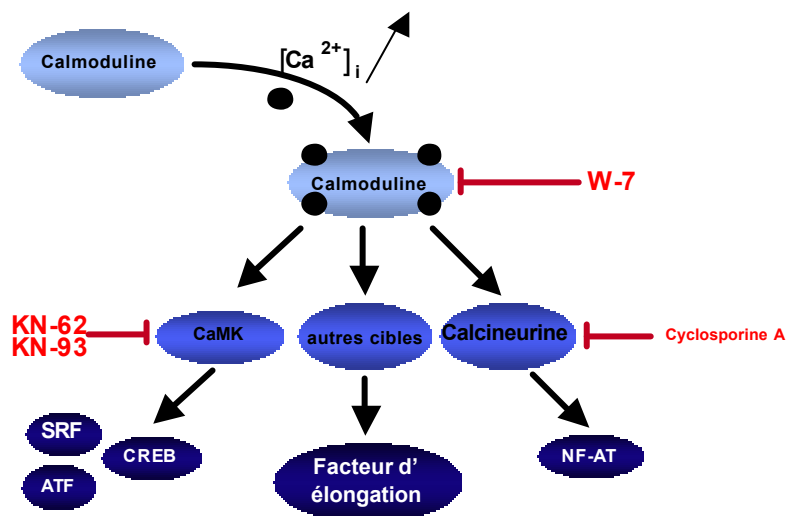


Figure 11 : Voies de signalisation calcique envisagées et inhibiteurs utilisés dans la publication n°2.

2. Publication n°2

A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. J Biol Chem. 1999 Oct 22;274(43):30439-46.

A Novel Calcium Signaling Pathway Targets the *c-fos* Intragenic Transcriptional Pausing Site*

(Received for publication, June 15, 1999, and in revised form, July 29, 1999)

Vincent Coulon‡§, Jean-Luc Veyrune‡¶, Nikolai Tourkine, Annick Vié, Robert A. Hipkind, and Jean-Marie Blanchard||

From the Institut de Génétique Moléculaire, CNRS, UMR 5535, IFR24, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

In many cell types, increased intracellular calcium gives rise to a robust induction of *c-fos* gene expression. Here we show that in mouse Ltk⁻ fibroblasts, calcium ionophore acts in synergy with either cAMP or PMA to strongly induce the endogenous *c-fos* gene. Run-on analysis shows that this corresponds to a substantial increase in active polymerases on downstream gene sequences, i.e. relief of an elongation block by calcium. Correspondingly a chimeric gene, in which the human metallothionein promoter is fused to the *fos* gene, is strongly induced by ionophore alone, unlike a *c-fos* promoter/ β -globin coding unit chimeric construct. Internal deletions in the hMT-*fos* reporter localize the intragenic calcium regulatory element to the 5' portion of intron 1, thereby confirming and extending previous *in vitro* mapping data. Ionophore induced cAMP response element-binding protein phosphorylation on Ser¹³³ without affecting the extracellular signal-regulated kinase cascade. Surprisingly, induction involved neither CaM-Ks nor calcineurin, while the calmodulin antagonist W7 activated *c-fos* transcription on its own. These data suggest that a novel calcium signaling pathway mediates intragenic regulation of *c-fos* expression via suppression of a transcriptional pause site.

The proto-oncogene *c-fos* represents the prototype for the family of immediate early genes. Its activation follows stimulation of the cell by a wide range of extracellular stimuli but is independent of protein neosynthesis (1–3). *c-fos* expression is regulated at multiple levels by intracellular signaling events acting in synergy (for reviews, see Refs. 4–7). The majority of studies on how signal transduction cascades modulate *c-fos* gene expression have focused on its upstream promoter sequences. Several cis-acting elements present in this region have been characterized as targets for numerous stimuli (8–11): the *v-sis* inducible element (12, 13), the serum response element (SRE)¹ (7, 14–16), the Fos AP1-like site (16) and the cAMP response element (CRE) (17–21).

* This work was supported in part by grants from the CNRS, BIOMED2 program, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), and the Ligue Nationale contre le Cancer (to J. M. B.) and the Fondation pour la Recherche Médicale and ARC (to R. A. H.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Contributed equally to the results of this work.

§ Supported by a grant from the French Ministry for Education and Research.

¶ Supported by a contract from the BIOMED2 program.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-67-61-36-49; Fax: 33-4-67-04-02-31; E-mail: blanchard@igm.cnrs-mop.fr.

¹ The abbreviations used are: SRE, serum response element; CRE, cAMP response element; CREB, cAMP response element-binding pro-

In several cell types calcium mobilization plays a central role in the modulation of *c-fos* gene expression; however, the mechanisms involved are still not fully understood. Calcium ions act as intracellular secondary messengers either after entering cells through various ion channels and/or upon release from internal stores. Ca²⁺ differentially activates cellular processes, and immediate early genes such as *c-fos* gene provide important targets to characterize how the calcium signal is transduced to the nucleus to activate various transcription programs (22, 23). Based on results from mutagenesis and transient transfection analyses, calcium has been proposed to activate a variety of pathways targeting different promoter elements (8, 21). Some are mediated by SRE-dependent processes. In some instances this occurs via the well characterized Ras-Raf-Erk-Elk-1 signaling module (23–26). In other situations increased levels of intracellular calcium induced by membrane depolarization with elevated levels of KCl or exposure to the calcium ionophore ionomycin have been shown to activate the *c-fos* promoter in PC12 pheochromocytoma cells. These have been linked to SRF independently of Elk-1 (24). SRF-driven activation did not involve Ras but did appear to involve calcium/calmodulin-dependent kinases (25). The mechanism is still uncertain, since mutation of the major phosphorylation site in SRF showed continued activity in this study. Finally some evidence implies that calcium signals to the Fos AP1-like element immediately downstream of the SRE-binding site (26), even though no transcription factor has been directly implicated in control via the Fos AP1-like site alone.

Other pathways activate *c-fos* transcription independently of the SRE, primarily via the CRE located at position –65 (reviewed in Refs. 27 and 28). This element is sufficient to mediate calcium-dependent reporter gene activation in some cell contexts, while in other cells additional cryptic CREs in the upstream promoter contribute to reporter gene activity (19). To further complicate the role of the CRE, intracellular calcium fluxes can also activate kinases downstream of Ras and ERK that phosphorylate CREB at serine 133 and thus potentially modulate transcription through the CRE (14, 29).

An explanation for the multiplicity of the effects mediated by calcium on gene expression has recently been provided by elegant microinjection experiments aimed at unraveling how spatially distinct calcium signals generate diverse transcriptional responses (30). Nuclear injection of a non-diffusible calcium chelator blocked increases in nuclear, but not cytoplasmic, calcium concentrations following activation of L-type voltage-

tein; DRE, downstream regulatory element; IBMX, isobutylmethylxanthine; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; 8-Br-cAMP, 8-bromo-cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinase; CaM, calmodulin; CaM-K, CaM-activated kinase family; SRF, serum response factor; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; MTLIIa, human metallothionein IIa promoter; *gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

gated calcium channels in a mouse pituitary cell line. Using reporters driven by different *c-fos* promoter regions, Hardingham *et al.* (30) showed that increases in nuclear calcium control CRE-mediated transcription, whereas a rise of cytoplasmic calcium activated SRE-driven transcription. In fact, this suggests that the mode of calcium entry and the cell type determine which upstream promoter element is required for the activation of a transiently introduced reporter gene. Accordingly the CRE alone can mediate activation by calcium signals triggered by membrane depolarization of PC12 pheochromocytoma cells (21, 22, 31), an effect that is not reproduced in HeLa cells (8).

More recently, a new calcium-sensitive transcriptional repressor has been proposed to bind a downstream regulatory element (DRE) present within the human prodynorphin gene (32). Upon stimulation by calcium this repressor, named DREAM for DRE-antagonist modulator, is no longer able to bind the DRE. In addition to prodynorphin promoter, DREAM represses also transcription from the *c-fos* gene in a transient transfection assay. However, whether this is true for the endogenous gene remains to be established.

A close inspection of the *c-fos* transcription unit through high resolution run-on analysis has also suggested the involvement of intragenic regulatory elements as important targets of *c-fos* regulation by calcium (33–36). In cultured macrophages, *c-fos* transcription is stimulated by multiple pathways requiring the mobilization of calcium from internal sources (34, 37). A strong block to transcriptional elongation, mapping beyond *c-fos* exon 1, was observed when freshly isolated peritoneal macrophages were put into primary culture (34). Calcium-dependent relief of this block strongly increased *c-fos* mRNA levels. In T cells, elevated cytoplasmic calcium is a critical mediator of activation upon stimulation of the antigen receptor. The synergistic action of calcium ionophore and agonists of protein kinase C mimics authentic antigen treatment in some T cell hybridomas (38). In the latter case, the principal effect of calcium was shown to be on the elongation of *c-fos* transcripts (35).

Using nuclear extracts from Ltk⁺ cells, we had previously mapped an *in vitro* arrest site within the murine *c-fos* gene (39). In this work we confirm and extend these results *in vivo*. However, because most previous studies on *c-fos* transcription have dealt with transient transfection experiments, we sought to use permanent cell lines carrying integrated reporter genes. We find that a sequence within *c-fos* intron 1, while barely active on its own, can strongly augment a calcium ionophore-driven transcriptional response together with its homologous or a heterologous upstream promoter. Even though this is correlated with CREB phosphorylation on Ser¹³³, it is mediated by a novel signaling pathway that surprisingly is potentiated by the calmodulin antagonist W7.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and Reagents—Tissue culture medium, penicillin, streptomycin, glutamine, G418, Random primers DNA labeling system, and TRIZOL were obtained from Life Technologies, Inc. (Cergy Pontoise, France). Phorbol myristate acetate (PMA), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 8-bromo cyclic adenosine monophosphate (8-Br-cAMP), A23187, W5, W7, KN62, KN93, and secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Antisera directed against phosphorylated forms of CREB and ERK came from New England Biolabs (Ozyme, Paris), all radioactive nucleotides and ECL reagents were from Amersham Pharmacia Biotech, the pHOOK-2 vector and Capture-Tec beads came from Invitrogen (Groningen, The Netherlands), and all restriction enzymes and bovine serum albumin from Roche Molecular Biochemicals (Meylan, France). The calmodulin-dependent protein kinase assay kit was purchased from Upstate Biotechnology Inc. (EUROMEDEX, France). Bradford protein assay kit was from Bio-Rad (Ivry Sur Seine, France) and Immobilon polyvinylidene difluoride membranes from Millipore. Radioactive signals were revealed by autoradiography using intensifying screens at -80°C and quantitated by PhosphorImager technology.

Cell Culture—Mouse Ltk⁺ fibroblasts were grown at 37°C in a 5% CO_2 containing atmosphere in the presence of 10% fetal calf serum in Dulbecco's modified Eagle's medium. When indicated, cells were serum starved for 24 h and stimulated by refeeding with 10% serum for the indicated times. $3\text{--}5 \times 10^6$ exponentially growing cells were treated with either 100 nM PMA, 100 mM IBMX + 1 mM 8-Br-cAMP, 0.1–10 μM rapamycin or cyclosporin A, 10 μM KN62 or KN93, 2.5–250 μM W5 or W7, 20 μM PD98059, or 10 mg/ml of the calcium ionophore A23187 alone, or a combination of these agents as indicated in the legends of the figures. All media were supplemented with streptomycin, penicillin, and L-glutamine. Cells were transfected with the various constructs described in the figures using calcium phosphate and pools of G418-resistant cells were used throughout this work.

pHOOK-2 Transient Transfection and Selection—6 μg of pHOOK-2-Lac Z (control), CaM-KIIi-HOOK, CaM-KIIa-HOOK, or CaM-KIVa-HOOK were transfected in $3\text{--}5 \times 10^6$ Ltk⁺ p19/1 cells by the calcium phosphate technique. 16 h later, cells were washed with HS buffer (25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH 7.4), fresh Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum was added and after 2 h A23187 stimulation was performed, where indicated, for 1 h. Cells were then detached with 6 mM EDTA, spun down, and resuspended in 5 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal calf serum, also containing A23187 where indicated. 50 μl of magnetic beads (Invitrogen Capture-Tec system) were added and tubes were gently stirred at 37°C for 1 h. After selection on a magnetic stand and 3 washes with Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal calf serum, the cells were split into two batches: one was resuspended in TRIZOL reagent for RNA extraction while the other one was treated with Laemmli's polyacrylamide gel electrophoresis-SDS sample buffer.

Nuclear Run-on Transcription—Extraction of nuclei, run-on transcript labeling and hybridization were carried out as described (39). Preparations of crude nuclei were split into aliquots containing 5×10^7 nuclei which were frozen in liquid nitrogen and thawed immediately prior to the labeling reaction. Incubations were carried out at 30°C for 30 min in the presence of 100 μCi of [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP (400 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$). Labeled run-on transcripts were purified and hybridized to nitrocellulose filters containing equimolar amounts of the plasmids indicated. Hybridization was carried out for 48 h at 42°C . Filters were washed twice at 65°C in $0.2 \times \text{SSC}$ and at 25°C in $2 \times \text{SSC}$ containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase-free RNase A. Signals were corrected for the thymidine content of each hybridizing DNA strand and standardized to those obtained with the *gapdh* cDNA probe.

RNA Blots and RNase Protection Assay—Total RNA was extracted using a standard 5 M guanidinium thiocyanate-phenol procedure at pH 5. Blots were sequentially hybridized to a mouse *c-fos* and *gapdh* cDNA probes labeled by random priming with [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol). The RNA probe was prepared from PM37.37 (containing a mouse genomic *c-fos* DNA spanning nucleotides -599 to $+251$, cloned into pBluescript) linearized with *Bss*HII, uniformly labeled with [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP (400 Ci/mmol), and purified by polyacrylamide gel electrophoresis. 20 μg of RNA for each sample was hybridized, processed for degradation by RNase A, and the resulting protected bands analyzed by electrophoresis in 5% polyacrylamide sequencing gels as described (40).

Plasmid Constructs—For *c-fos* constructs the starting construct was p19/1, which contains a 4-kilobase *NaeI*-*Bam*HI mouse genomic DNA fragment under the control of the human metallothionein IIa promoter (41). Large deletions were generated using unique *Xho*I, *Xba*I, and *Sal*I restriction sites and religation as indicated. Intron 1 small deletions were generated with exonuclease III on *Xho*I-linearized p19/1, followed by blunt-ending by S1 nuclease treatment and religation. Plasmids containing overlapping deletions were selected and sequenced. pMT-globin was derived from p19/1 after deleting the *Bam*HI-*Bam*HI *c-fos* fragment and replacing it with a rabbit β -globin genomic fragment. pFos-globin contained the rabbit β -globin gene under the control of the *c-fos* promoter contained in the *Sma*I-*Pvu*II DNA fragment spanning nucleotides -500 to -19 relative to the transcription initiation site (42).

The CaM kinase II catalytic subunit (amino acids 1–290) was derived from plasmids pSG5-192 I (inactive) or pSG5-192 A (active) (Ref. 43, kind gift from A. Means) by *Hind*III and *Bam*HI digestion. These fragments were cloned in the pHOOK-2 vector to produce CaM-KIIi-HOOK and CaM-KIIa-HOOK. The CaM kinase IV catalytic subunit (amino acids 1–313) was obtained from plasmid RSV-CaM-KIV (Ref. 44, kindly provided by S. Soderling) by *Hind*III and *Bgl*II digestion and cloned in pHOOK-2 vector to produce CaM-KIVa-HOOK.

Western Blots and Kinase Assays— 5×10^5 exponentially growing cells were treated with various inhibitors for 1 h prior to A23187 stimulation for 10 min as indicated and then lysed as described previously (45). Protein concentrations were determined using the Bradford

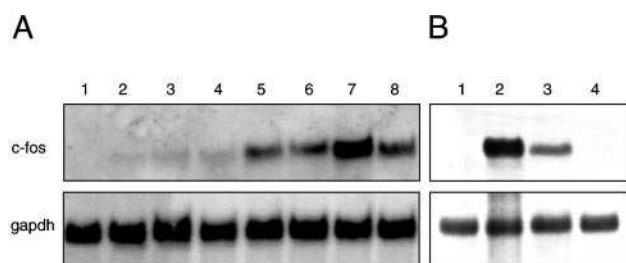


FIG. 1. Calcium ionophore is required for robust, sustained induction of *c-fos* by PMA or cAMP in Ltk⁻ cells. A, exponentially growing Ltk⁻ cells were left uninduced (lane 1) or stimulated for 1 h (lanes 2–6), 2 h (lane 7), or 4 h (lane 8) with PMA (lane 2), IBMX + 8-Br-cAMP (lane 3), A23187 (lane 4), or a combination of A23187 and PMA (lane 5) or IBMX + 8-Br-cAMP (lanes 6–8). 20 μ g of total RNA was fractionated by electrophoresis through a formaldehyde-agarose gel, transferred onto nylon membranes and hybridized successively to *c-fos* (top panels) and *gapdh* (bottom panels) probes. B, transient expression of *c-fos* mRNA induced by serum restimulation of Ltk⁻ cells starved for 24 h. Total RNA was prepared from either serum-starved cells (lane 1) or cells restimulated for 30 (lane 2), 60 (lane 3), or 90 min (lane 4) and analyzed as above.

assay. 5 μ g of whole cell extracts were fractionated by electrophoresis through 8.5% SDS gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. After a quick dip into methanol, membranes were saturated for 1 h at room temperature in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) containing 5% bovine serum albumin (fraction V). Primary antibodies (anti-phospho-Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ ERK or anti-phospho-Ser¹³³ CREB) were incubated overnight at 4 °C in the same medium at a 1/1000 dilution. After 3 washes with TBST, an anti-rabbit IgG antibody was added at a 1/5000 dilution for 1 h at room temperature. Antibody complexes were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL kit) after 6 washes 5 min each with TBST.

CaM-activated kinases were purified through a small scale quick batch binding of a whole cell extract (100 μ g) to a calmodulin affinity resin (Stratagene). Activity was measured by incubating the immobilized kinases for 10 min at 30 °C in 50 μ l of a mixture containing 100 μ M auto Calmidex II, 2 μ M each of PKC and PKA inhibitor peptides, 25 mM MgCl₂, 100 μ M [γ -³²P]ATP (10 μ Ci), 20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β -glycerolphosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM CaCl₂. Incorporated radioactivity was monitored by liquid scintillation after spotting 25 μ l of reaction mixture onto P81 phosphocellulose paper and several washes with 0.75% phosphoric acid, according to the supplier's recommendations.

RESULTS

***c-fos* Induction in Ltk⁻ Cells Requires the Concerted Action of Calcium Ionophore and Phorbol Esters or cAMP**—We initially analyzed the response of mouse Ltk⁻ fibroblasts to agents that elevate intracellular levels of calcium and/or cAMP, since these pathways were shown to synergize in *c-fos* activation (46, 47). In Ltk⁻ cells, PMA, IBMX + 8-Br-cAMP, or calcium ionophore (A23187) generated only a minor induction of *c-fos* mRNA (Fig. 1A). In contrast, co-treatment with A23187 and either PMA or IBMX + 8-Br-cAMP gave rise to a much stronger induction of *c-fos* (Fig. 1A). Notably the signal was still high after 4 h of stimulation by a combination of A23187 + IBMX + 8-Br-cAMP, whereas it was undetectable 90 min after serum refeeding (Fig. 1B). This strong induction was sensitive to actinomycin D (data not shown; Fig. 4), indicating that it resulted from an increase in *de novo* transcription.

This was confirmed by a run-on analysis carried out on nuclei prepared from cells treated for 1 h with A23187, 8-Br-cAMP and IBMX (Fig. 2). The labeled nascent transcripts were hybridized to two DNA fragments spanning the 5'-half of the murine *c-fos* gene. The first one, (A), contains the first exon and the 3'-half of the first intron. The second (B), spans the 3'-half of the first intron, the second exon and the 5'-half of the second intron. Previous work has shown that *c-fos* transcription can be regulated in part at the level of elongation (34, 35, 40, 48, 49), and fragment A contains the premature termination site

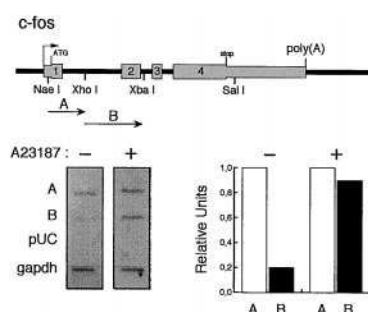


FIG. 2. Ionophore treatment relieves a transcriptional block within *c-fos* intron 1. Nuclei were isolated from exponentially growing Ltk⁻ cells stimulated for 1 h with IBMX + 8-Br-cAMP in the absence of A23187 (–) or presence (+). Nascent transcripts were labeled *in vitro* with [α -³²P]UTP and then hybridized to *c-fos* mouse genomic DNA fragments spanning nucleotides +42 to +580 (fragment A) and +580 to +1473 (fragment B) relative to the transcription start site. *c-fos* signals were normalized to *gapdh* signals after PhosphorImager quantitation and correction for the uridine content of each transcript. The main features of *c-fos* transcription unit are diagrammed: shaded rectangles represent exons, black bars correspond to intron or flanking sequences, the transcription initiation site is represented by a broken arrow, and the horizontal arrows below the gene show the *NaeI*-*XhoI* (fragment A) and *XhoI*-*XbaI* (fragment B) DNA fragments used for the run-on transcript hybridization. Left panels, autoradiograms of membranes hybridized to *in vitro* synthesized nuclear RNA from either untreated cells (–) or cells exposed to A23187 + IBMX + 8-Br-cAMP for 1 h (+). pUC and *gapdh* refer to pUC18 and rat *gapdh* cDNAs. Right panel, the hybridization signals on fragments A and B are represented relative to the signal on A, after normalization for their specific activity and the corresponding *gapdh* signal.

mapped *in vitro* (39). Prior to stimulation, a signal was detected on the promoter proximal fragment, whereas that from fragment B was disproportionately low, especially upon correction for the amount of uridine transcribed into RNA hybridizing to each fragment. Induction gave rise to a small increase in transcription of fragment A, together with a strongly enhanced signal from fragment B. Thus, in Ltk⁻ cells the endogenous *c-fos* gene is regulated at the level of transcriptional elongation.

Interestingly, A23187 also acts to stabilize *c-fos* mRNA. Cells were stimulated for 1 h with A23187 + IBMX + 8-Br-cAMP, and then actinomycin D was added for the indicated times (Fig. 3A). *c-fos* mRNA was still detectable 4 h after actinomycin D addition, whereas the same level was obtained with a 1-h actinomycin D chase after serum induction (Fig. 3B). The synergy between calcium ionophore and the other inducers suggests that both upstream and downstream regulatory elements are required for a full response to calcium in these cells.

A *c-fos* Gene under the Control of an Heterologous Promoter Shows a Full Response to Calcium Ionophore—To address the contribution of regions downstream from the promoter to the calcium effect, we transfected Ltk⁻ cells with a construct expressing the mouse *c-fos* gene under the control of the human metallothionein IIa promoter (MTLIIa) (p19/1; Ref. 41), which has high basal activity. A23187 alone was sufficient to substantially induce (60-fold) the transfected gene (Fig. 4A), unlike the endogenous *c-fos* gene (see above). A slightly reduced induction (30-fold) was observed with a mutant lacking the 3'-untranslated region (p19/ Δ NsiI-MstII) that was previously shown to enhance mRNA stability (49–52). This is consistent with the increase in stability observed above for the endogenous gene. Actinomycin D blocked the induction but had a less striking effect on basal transcription (Fig. 4A). This observation was confirmed by RNase protection using an antisense probe spanning from nucleotides –95 to +251 relative to the transcription start site (Fig. 5A). The *c-fos* mRNA generated by the transfected gene lacks the first 42 nucleotides and can thus easily be distinguished from the endogenous mRNA (see “Experimental

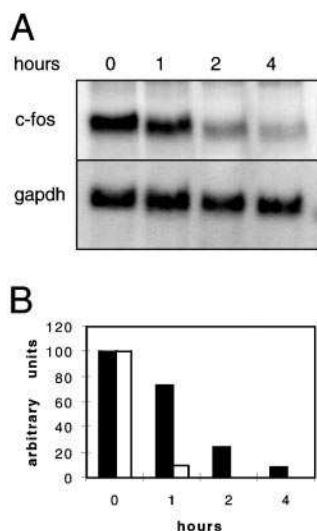


FIG. 3. Calcium ionophore leads to *c-fos* mRNA stabilization. *A*, Northern blot analysis of *c-fos* mRNA decay after treatment with A23187 + IBMX + cAMP for 1 h prior to addition of actinomycin D for the indicated times. RNA was processed as described in the legend of Fig. 1. *B*, quantitation of the data presented in panel *A* after normalization to the *gapdh* signals (closed bars). Also shown is the decay rate of *c-fos* mRNA following a 30-min serum induction (open bars).

Procedures"). As shown in Fig. 5*B*, the transfected gene was induced to the same level by calcium ionophore alone or together with IBMX + 8-Br-cAMP (lanes 6 and 7) or PMA (not shown), whereas the endogenous *c-fos* mRNA was observed only after combined treatment (lanes 4 and 7). The RNA samples used in this experiment are those used for the Northern blot of Fig. 1.

This effect was related to the *fos* gene, since no modulation by calcium was seen when a rabbit β -globin genomic sequence was placed downstream from the MTLIIa promoter (Fig. 4*B*, lanes 1 and 2). Nevertheless the same construct was inducible by Zn^{2+} (data not shown). When the same β -globin genomic sequence was appended 3' to the *c-fos* promoter (−400 to +10), the resulting globin mRNA was only modestly induced by calcium (at most 3-fold, Fig. 4*B*, lanes 3 and 4), in contrast to the strong induction of the complete *c-fos* gene (Fig. 4*A*). The *c-fos* promoter-globin coding construct was still inducible by serum (data not shown; Ref. 53). Since similar results were observed with other promoters linked to the *c-fos* gene (adenovirus MLP, rat β -actin; data not shown), we conclude that sequences located within the *c-fos* gene are required for a full transcriptional response to calcium.

The Intragenic Calcium Response Requires Sequences Located within *c-fos* Exon 1 and Intron 1—We then employed deletion mutagenesis to characterize the portion of the gene responsible for calcium sensitivity. A first series of deletions was generated using several restriction sites scattered along the transcription unit, as diagrammed in Fig. 6*A*. Plasmids corresponding to the various minigenes were transfected into Ltk[−] cells, and pools of neomycin-resistant cells were used for monitoring A23187 inducibility. Deletions spanning sequences downstream of the middle of intron 1 were induced to approximately the same level as the starting p19/1 construct (35–55-fold, Δ XS and Δ XX, Fig. 6). Δ NX, which removes exon 1 and the 5' portion of intron 1, was only poorly induced (2–3-fold) and exhibited a high constitutive level of expression prior to stimulation. The region deleted in Δ NX contains a previously mapped *in vitro* arrest site (39), as well as an *in vivo* pause site (40). This suggests thus that calcium acts at the level of elongation rather than initiation. Consistent with this, *c-fos* mRNA induction by calcium ionophore in p19/1 stably transfected

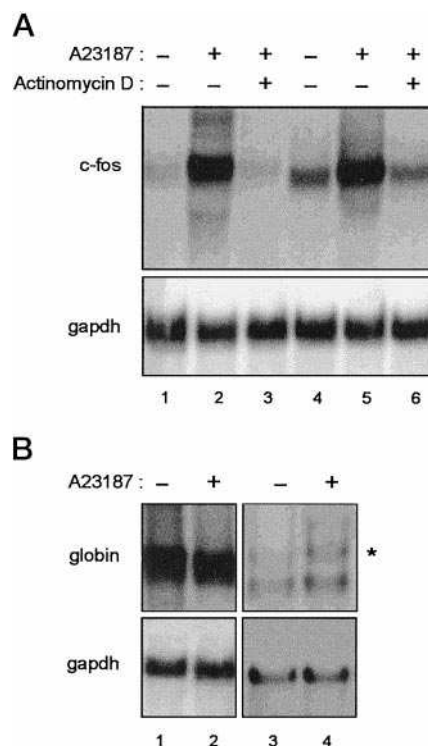


FIG. 4. *c-fos* intragenic sequences confer calcium inducibility to a heterologous promoter. *A*, exponentially growing Ltk[−] cells, stably transfected with p19/1 (lanes 1–3) or p19/1 Δ NsiI-MstII (lanes 4–6), were stimulated for 1 h with A23187, followed by actinomycin D as indicated. *B*, exponentially growing Ltk[−] cells, stably transfected with either pMT-globin (lanes 1 and 2) or pFos-globin (lanes 3 and 4), were induced for 1 h with A23187 as indicated. RNA from cells left untreated (−) or treated as indicated (+) was processed for Northern blot analysis as described in the legend of Fig. 1. A mouse *c-fos* cDNA probe was used in *A* and a rabbit genomic DNA probe was used in *B*. In all cases membranes were rehybridized to a rat *gapdh* probe for normalization. The band marked by an asterisk in the upper panels of panel *B*, lanes 3 and 4, represent a globin splicing intermediate (53).

Ltk[−] cells was completely abolished by preincubation with the elongation inhibitor DRB (data not shown).

In order to confirm the involvement of the transcriptional pause site in this effect, we generated a new series of deletions restricted to intron 1 (Fig. 7*C*). Stably transfected pools of Ltk[−] cells were established as above and used for *in vitro* run-on experiments (Fig. 7*A*). Dot blot hybridizations were performed on DNA from each pool of cells in order to ensure that the copy number of each transfected construct (which ranged from 20 to 30) was high enough to render insignificant the signal arising from the endogenous gene. This was confirmed by run-on analysis (data not shown). Although not as pronounced as for the endogenous gene (Fig. 2), the transgene still harbored a block to transcriptional elongation at the level of basal transcription (Fig. 7). Mutant Δ 1 showed the same biased hybridization signal to fragment A observed with the wild type gene (Fig. 7, *A* and *B*), which is indicative of a transcriptional pause (see above). Notably the signal became less biased upon further deletion (compare white bars (fragment A) and black bars (fragment B) in Fig. 7*B*), suggesting the gradual alleviation of transcriptional pausing. This confirms the key role played by intron 1 sequences in *c-fos* regulation in Ltk[−] cells.

***c-fos* Induction by Calcium in Ltk[−] Cells Does Not Involve Calmodulin-activated Kinases II and IV or Calcineurin**—A major mechanism by which an increase in intracellular calcium concentration regulates cellular events is through its association with calmodulin (CaM). The calcium-CaM complex binds to and modulates the activity of multiple regulatory molecules,

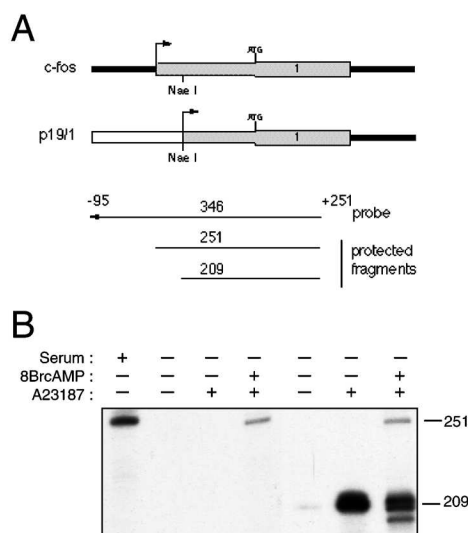


FIG. 5. RNase protection analysis of induction of the endogenous *c-fos* and exogenous MTLIIa-*fos* genes. *A*, schematic representation of the 5' portion of the endogenous *c-fos* gene as well as the chimeric gene encoded by p19/1. Shaded rectangles represent exons and black horizontal bars introns or flanking sequences. The open rectangle indicates the MTLIIa promoter in the chimeric construct. The horizontal arrow and the lines below positions the antisense RNA probe and indicates the expected protection products. These are bands of 251 and 209 nucleotides that correspond to transcripts generated from the endogenous gene and the transgenic construct, respectively. *B*, exponentially growing Ltk⁻ cells (lanes 1–4), or Ltk⁻ cells stably transfected with p19/1 (lanes 5–7), were stimulated for 1 h with A23187 alone (lane 3 and 6) or together with 8-Br-cAMP (lanes 4 and 7) as indicated. 20 μ g of RNA from uninduced (–) or induced (+) cells was hybridized and processed for RNase protection. Lane 1 shows the result using RNA from serum restimulated cells. The results shown are representative of three independent experiments. The faster migrating band of lane 7 is an artifact not observed in other analyses.

including the CaM-activated kinase family (CaM-K) (54). CaM-Ks appear to play a role in transcriptional activation because the calcium-dependent induction of several immediate early genes, such as *c-fos*, is blocked by the CaM-K inhibitors KN62 and KN93 (26, 55). This has been proposed to occur through CREB phosphorylation (44, 56, 57), SRF phosphorylation (28), and via an interaction between the CaM-K cascade and mitogen-activated protein kinase signaling pathways (58). We therefore investigated these possibilities in our experimental system.

Consistent with previous studies (59), treatment of p19/1 cells with calcium ionophore led to increased CREB phosphorylation, as measured by Western blotting and immunodetection with anti-phospho-CREB antibodies (data not shown). In contrast, A23187 did not affect the level of activated ERK1 and ERK2, as monitored on the same blot with antiphospho-ERK antibodies (not shown). Thus ionophore does not induce the ERK cascade in Ltk⁻ cells. Ionophore addition did stimulate CaM-K activity, as demonstrated with a pull-down kinase assay using calmodulin-affinity resin (Fig. 8A). A 1-h treatment of cells with KN93 not only abolished ionophore-mediated increase in CaM-K activity, but led also to a 70% decrease in basal activity (Fig. 8A). However, this did not inhibit *c-fos* mRNA induction in p19/1 cells (Fig. 8B).

This was somewhat surprising in light of previously published reports. To confirm the lack of CaM-K effect on *c-fos*, we transfected p19/1 cells with pHook-based vectors expressing constitutively active CaM-KII and CaM-KIV kinases. Transfected cells were enriched by immunoselection, and RNA and proteins processed for Northern and Western blot analysis. Consistent with the results above, neither CaM-KII nor CaM-KIV were able to recapitulate *c-fos* induction by calcium ionophore (Fig. 9A). In contrast, they were both able to increase phosphorylation of endogenous CREB (Fig. 9B). Furthermore, overexpression of inactive CaM-KII, which should compromise activation driven by CaM-KII, did not block *c-fos* induction by calcium ionophore (Fig. 9A) but did prevent A23187-induced CREB phosphorylation (Fig. 9B).

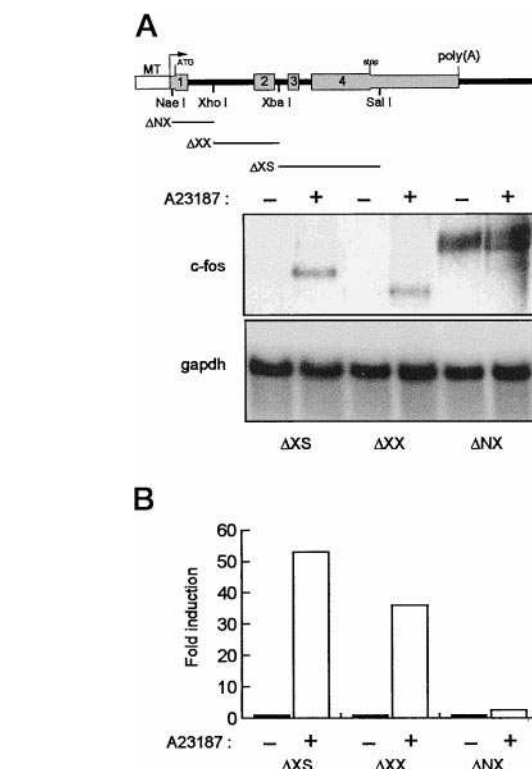


FIG. 6. Sequences contained within exon 1 and/or intron 1 of *c-fos* are required for a robust response to calcium. *A*, the upper panel diagrams the deletions introduced into the chimeric *c-fos* gene encoded by p19/1. The symbols are described in the legend to Fig. 5, and the bars under the gene represent the various deletions. Exponentially growing Ltk⁻ cells stably transfected with the three deletion mutants were left uninduced (–) or induced for 1 h with A23187 (+). Induction was analyzed by Northern blotting as described in the legend to Fig. 1. *B*, quantitative representation of induction. The hybridization signals in Panel A were analyzed densitometrically and normalized to the *gapdh* signal.

phore (Fig. 9A). In contrast, they were both able to increase phosphorylation of endogenous CREB (Fig. 9B). Furthermore, overexpression of inactive CaM-KII, which should compromise activation driven by CaM-KII, did not block *c-fos* induction by calcium ionophore (Fig. 9A) but did prevent A23187-induced CREB phosphorylation (Fig. 9B).

The calcium-CaM complex binds also to calcineurin, a calcium-dependent protein phosphatase implicated in gene regulation (38, 60). The immunosuppressant cyclosporin A is a potent calcineurin antagonist, whereas rapamycin, another immunosuppressant, acts independently of the phosphatase (60). We therefore checked whether cyclosporin A might influence A23187-mediated *c-fos* induction. Neither immunosuppressant had a notable effect on a wide range of concentrations (Fig. 10), therefore ruling out calcineurin in the effects we observe.

Calcium-mediated *c-fos* Induction Can be Mimicked by the Functional Inactivation of CaM—These data eliminated ERKs, CaM-Ks, and calcineurin as effectors of ionophore induction of *c-fos*. In order to evaluate the possible involvement of CaM in another pathway, we treated the cells with the anti-CaM drug W7 that has been extensively used to inhibit CaM in culture cell systems. As a control, we used W5, a drug chemically very similar to W7 but with a much lower affinity for CaM. To our surprise, exposure of cells to W7 prior to A23187 strongly induced *c-fos* either with or without A23187, while the control compound W5 was inactive (Fig. 11). This suggests that a novel calcium dependent pathway, antagonized by CaM, is involved in controlling transcriptional pausing in the murine *c-fos* locus.

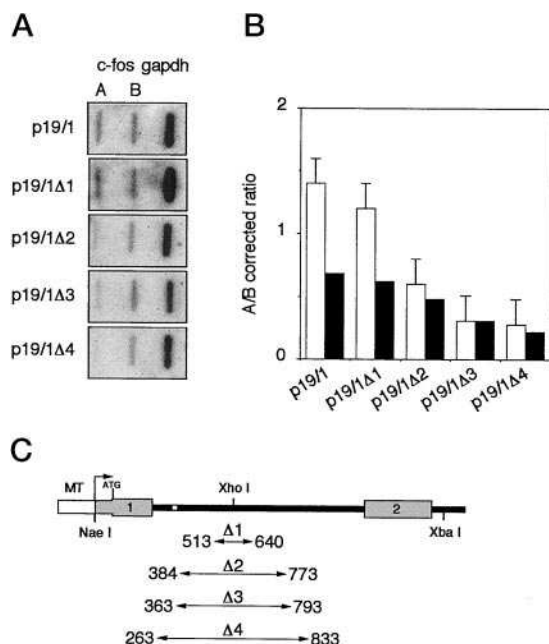


FIG. 7. The transcriptional pause site targeted by calcium ionophore maps in the 5' part of *c-fos* intron 1. A, nuclei were prepared from exponentially growing Ltk⁻ cells stably transfected with the various deletion mutants of p19/1. Run-ons were performed as indicated in Fig. 2 and nascent transcripts were hybridized to the *c-fos* NaeI-XhoI (fragment A) and XhoI-XbaI (fragment B) probes as well as to *gapdh* as described in the legend to Fig. 2. Experiments have been carried out three times and only a representative example is shown here. B, ratios of the signals detected on fragments A and B. The hybridization signals in panel A were quantitated and normalized to *gapdh* (open bars). The theoretical ratio, based on uridine content of transcripts arising from each deletion mutant, is presented as the solid bars. C, schematic representation of the deletions introduced into intron 1 of p19/1. The symbols are described in the legend to Fig. 6. The horizontal lines below portray the overlapping deletions centered on the XhoI site. Numbers refer to positions relative to the transcription initiation site. The white box present in intron 1 between positions +363 and +387 shows the previously mapped *in vitro* transcriptional pause site (39).

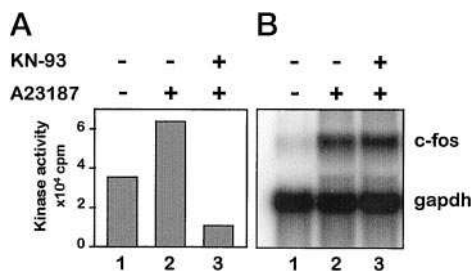


FIG. 8. CaM Kinase inhibitors do not affect *c-fos* mRNA induction by calcium ionophore. A, cells were pretreated with the CaM-K inhibitor KN93 (10 μ M, 10 min) and then stimulated with A23187 as indicated. Whole cell lysates were prepared and passed over a calmodulin affinity resin. The immobilized proteins were tested for kinase activity toward CaMtide, a CaM-K substrate peptide. Reactions were spotted on phosphocellulose paper, washed exhaustively, and the radioactivity measured by scintillation counting. B, cells were preincubated for 1 h with 10 μ M KN93, then induced as indicated above the lanes. Total RNA extraction, Northern blotting, and hybridization were performed as described in the legend to Fig. 1.

DISCUSSION

In this work, based on integrated *c-fos* reporter genes and not on transient transfection experiments, we show that calcium acts synergistically with other stimuli to activate *c-fos* transcription through both upstream and downstream regulatory elements. Whereas PMA, IBMX + cAMP, and A23187 alone were not sufficient to give rise to a significant activation of

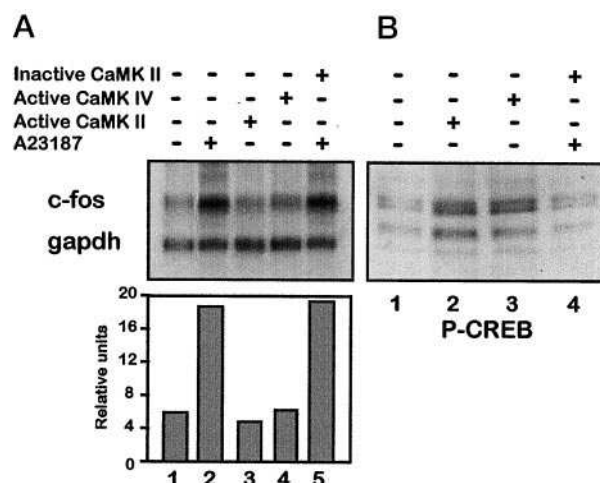


FIG. 9. Constitutively active CaM-Ks lead to CREB phosphorylation but fail to induce *c-fos* expression. Exponentially growing Ltk⁻ cells were transfected with either the parental vector (pHOOK-2-LacZ; lanes A1, A2, and B1) or expression vectors encoding constitutively active CaM-KII (CaM-KIIa-HOOK; lanes A3 and B2), constitutively active CaM-KIV (CaM-KIVa-HOOK; lanes A4 and B3), or inactive, dominant negative CaM-KII (CaM-KIIi-HOOK; lanes A5 and B4). Transfected cells were selected on magnetic beads and lysed either with TRIZOL for Northern blot analysis (panel A) or with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer for anti-phosphoCREB Western blotting (panel B, the membrane was stained with Ponceau Red to ensure identical loading). The lower panel presents the quantitation of the *c-fos* hybridization signals normalized to *gapdh*.

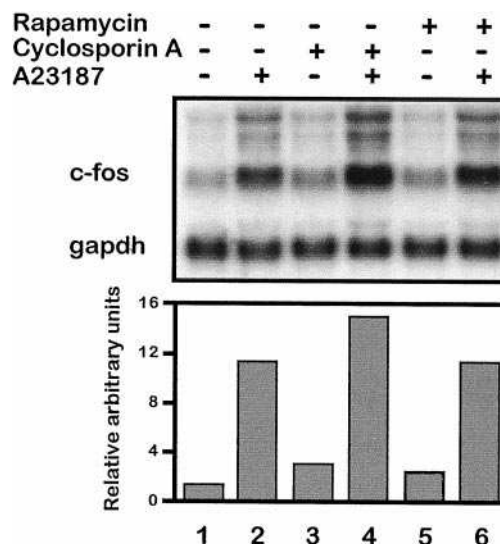


FIG. 10. Calcineurin does not contribute to calcium regulation of the *c-fos* intragenic pausing site. Exponentially growing Ltk⁻ p19/1 cells were pretreated with various concentrations of either cyclosporin A or rapamycin for 1 h (+) and then induced where indicated (+) with A23187. Only results obtained with 1 μ M of either drug are shown here. RNA isolation, Northern blotting, and hybridization were performed as described in the legend to Fig. 1. The lower panel shows the ratio of the *c-fos* signal to *gapdh* after PhosphorImager quantitation of the Northern blot.

c-fos, any combination of A23187 with the different inducers led to a strong induction of transcription. Notably upstream *c-fos* promoter sequences were not sufficient to confer a high level of inducibility by calcium to a reporter β -globin gene. Conversely, replacing the *c-fos* upstream promoter with that from the human metallothionein IIa promoter generated a chimeric gene highly inducible by calcium ionophore alone. Nuclear run-on analysis showed that mRNA accumulation was mainly due to a dramatic increase in polymerase processivity.

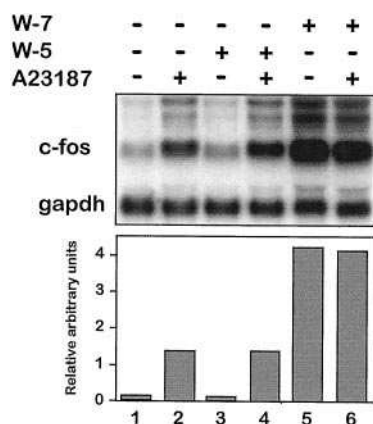


FIG. 11. **A calmodulin antagonist disrupts regulation of the *c-fos* intragenic pausing site.** Exponentially growing Ltk⁻ p19/1 cells were preincubated for 1 h with various concentrations of W5 or W7, followed by induction with A23187. Only results obtained with 25 μ M of either drug are shown here. RNA isolation, Northern blotting, and hybridization were performed as described in the legend to Fig. 1. The lower panel presents the quantitation of the *c-fos* hybridization signals normalized to *gapdh*.

These data suggest that intragenic regulatory elements mediate calcium effects provided that transcription initiation has taken place.

The pathway leading from calcium entry to transcription resumption was then evaluated: whereas CaM-Ks activate *c-fos* gene transcription through promoter proximal elements, astonishingly, their participation, as well as that of the calcium-dependent phosphatase calcineurin, was ruled out in the relief of the block to elongation. However, calmodulin is actually implicated in this phenomenon through a mechanism that remains to be characterized. Taken together, these arguments form a compelling body of data pointing to a new calcium/calmodulin-dependent pathway that targets intragenic sequences to allow transcription to proceed through the pause site.

We show here that the metallothionein promoter drives barely detectable transcription through *c-fos* downstream sequences. The striking induction of transcription upon A23187 treatment therefore reflects a tremendous increase in transcription elongation efficiency. Importantly the same result was obtained with other constitutively active promoters, such as the adenovirus major late or rat β -actin promoters (data not shown). This is consistent with run-on experiments carried out on cells stably transfected with mutants deleting intron sequences of *c-fos*, which further stressed the important role played by the intragenic transcriptional pause site previously identified *in vivo* (40, 48, 61) and mapped *in vitro* (39). Thus, in living cells, the first exon plus the 5' part of the first intron were shown to be crucial for the elongation block, whose release is responsible for calcium induction of the p19/1 construct.

These results confirm and extend the previous observation by Collart *et al.* (34) in macrophages and by Lee and Gilman (35) in murine T cells. In particular, we show that this calcium-sensitive block to elongation in the 5' part of the *c-fos* locus can act independently of the promoter but requires the whole coding unit structure to be fully active. Moreover, this phenomenon is no longer restricted to macrophages and T-cells but also applies in fibroblasts, suggesting that it reflects a mechanism with wider relevance than previously appreciated.

Interestingly, transcriptional induction was amplified by stabilization of *c-fos* mRNA when the endogenous gene was activated by a combination of A23187 and PMA or cAMP. *c-fos* transcripts generated by the various p19/1-derived constructs after stimulation by A23187 alone were stabilized to the same extent (data not shown), suggesting that calcium also modu-

lates *c-fos* mRNA decay directed by sequences in the 3'-untranslated region. This region cannot function alone, as shown by the inactive deletion mutants where it was still present. Furthermore, the fact that no deletion mutant retained full calcium-induced activity is consistent with data from transgenic mice showing that full *c-fos* inducibility *in vivo* requires the entire locus (62).

We then questioned which pathway led to elongation block release in response to calcium ionophore. Increased intracellular calcium can lead to activation of PKA and PKC, two important effectors of *c-fos* activation in culture cells and *in vivo*. The fact that ionophore could synergize with forskolin and PMA, strong activators of PKA and PKC, makes it unlikely that these two kinases mediate the effects we observe. Thus CaM-dependent kinases seemed the most likely candidates, since they have been implicated in mediating *c-fos* induction by several different signals and mechanisms (25, 26, 55, 63, 64). Surprisingly, the CaM-K inhibitor KN93 (nor KN-62: data not shown) did not affect *fos* induction although it inhibited both basal and calcium-induced CaM-K activity. Similarly overexpression of dominant-negative CaM-K did not block ionophore-driven p19/1 expression, which was also not reproduced by transfection of constitutively active CaM-Ks II or IV. In contrast, the latter did lead to CREB phosphorylation. This renders any role for CaM-Ks in this process very unlikely and suggests that their previously described activation of *c-fos* transcription takes place at the level of initiation rather than elongation.

The calcium-activated phosphatase calcineurin regulates gene expression by activating the nuclear localization of the cytoplasmic transcription factor NF-ATc (38, 60). This may account for certain signaling events attributed to cytoplasmic but not nuclear calcium fluxes (30). Nevertheless calcineurin does not mediate increased elongation driven by A23187, since the latter was insensitive to the calcineurin inhibitor cyclosporin A (65).

Recently, DREAM, a new repressor acting through a location-dependent silencer (DRE) has been shown to lead to a calcium-dependent repression of a human *c-fos* reporter in transient transfection experiments (32). The same sequence is present in the mouse locus but is not present in our reporter constructs that show calcium-dependent regulation. Therefore, the phenomenon we describe here is distinct from DREAM-dependent repression.

These experiments ruled out a number of well documented pathways activated by calcium. We thus tested whether the ionophore signal involved calmodulin itself, using the calmodulin antagonist W7. This compound led to a dramatic induction of the *c-fos* p19/1 transgene both with and without A23187. Thus this calmodulin antagonist acts in the same direction as calcium entry, which seems paradoxical at first sight. One possible explanation is that this reflects a calcium- and antagonist-sensitive interaction between calcium-free calmodulin and a factor responsible for the block to elongation. This mechanism might resemble that described previously for neuro-modulin (66, 67), a neurospecific protein whose function is believed to be to bind calcium-free calmodulin and concentrate it within specific regions of the neuron.

The nature of this downstream element and its regulation by calcium remain to be characterized. It might represent a downstream component of the promoter, inactive on its own, that interacts with a *bona fide* transcription factor. For example, some bHLH proteins have been shown to interact directly with and be regulated by calcium/calmodulin in their ability to bind DNA. Accordingly, calcium ionophore was shown to selectively inhibit transcriptional activation by these CaM-sensitive bHLH protein *in vivo* (68). Alternatively this phenomenon

might reflect a constrained chromatin structure responsive to calcium. This would explain why this effect has proven refractory to analysis by transient transfection. Given the quick response to calcium, one can imagine a direct interaction between calmodulin and an elongation factor, such as TFIIS, P-TEFb (cycT/cdk9), or elongin A, a chromatin remodeling system, *e.g.* Swi/Snf complex, or a histone acetyltransferase. Although the exact molecular mechanisms remain unclear, our data add a new, calcium-dependent pathway and promoter region to the complex signaling network that ensures the tight regulation of *c-fos* transcription.

Acknowledgments—We thank A. Means and S. Soderling for CaMKII and -IV expression plasmids.

REFERENCES

- Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., and Bravo, R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2140–2148
- Bravo, R. (1990) *Semin. Cancer Biol.* **1**, 37–46
- Lau, L. F., and Nathans, D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1182–1186
- Cahill, M. A., Janknecht, R., and Nordheim, A. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 16–19
- Janknecht, R. (1995) *Immunobiology* **193**, 137–142
- Piechaczyk, M., and Blanchard, J. M. (1994) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **17**, 93–131
- Treisman, R. (1995) *EMBO J.* **14**, 4905–4913
- Fisch, T. M., Prywes, R., and Roeder, R. G. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3490–3502
- Gilman, M. Z., Wilson, R. N., and Weinberg, R. A. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4305–4316
- Lucibello, F. C., Ehrlert, F., and Muller, R. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 3583–3591
- Visvader, J., Sassone-Corsi, P., and Verma, I. M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9474–9478
- Hayes, T. E., Kitchen, A. M., and Cochran, B. H. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1272–1276
- Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., and Cochran, B. H. (1990) *EMBO J.* **9**, 4477–4484
- Ginty, D. D., Bonni, A., and Greenberg, M. E. (1994) *Cell* **77**, 713–725
- Greenberg, M. E., Siegfried, Z., and Ziff, E. B. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1217–1225
- Velich, A., and Ziff, E. B. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6273–6282
- Berkowitz, L. A., Riabowol, K. T., and Gilman, M. Z. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4272–4281
- Fisch, T. M., Prywes, R., and Roeder, R. G. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1327–1331
- Fisch, T. M., Prywes, R., Simon, M. C., and Roeder, R. G. (1989) *Genes Dev.* **3**, 198–211
- Sassone-Corsi, P., Visvader, J., Ferland, L., Mellon, P. L., and Verma, I. M. (1988) *Genes Dev.* **2**, 1529–1538
- Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G., and Greenberg, M. E. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2787–2796
- Sheng, M., and Greenberg, M. E. (1990) *Neuron* **4**, 477–485
- Bading, H., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1993) *Science* **260**, 181–186
- Hipskind, R. A., Rao, V. N., Mueller, C. G., Reddy, E. S., and Nordheim, A. (1991) *Nature* **354**, 531–534
- Miranti, C. K., Ginty, D. D., Huang, G., Chatila, T., and Greenberg, M. E. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3672–3684
- Wang, Y., and Simonson, M. S. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5915–5923
- Greenberg, M. E., Thompson, M. A., and Sheng, M. (1992) *J. Physiol. (Paris)* **86**, 99–108
- Ginty, D. D. (1997) *Neuron* **18**, 183–186
- Xing, J., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1996) *Science* **273**, 959–963
- Hardingham, G. E., Chawla, S., Johnson, C. M., and Bading, H. (1997) *Nature* **385**, 260–265
- Sheng, M., McFadden, G., and Greenberg, M. E. (1990) *Neuron* **4**, 571–582
- Carrión, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B., and Naranjo, J. R. (1999) *Nature* **398**, 80–84
- Thompson, M. A., Ginty, D. D., Bonni, A., and Greenberg, M. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4224–4235
- Collart, M. A., Tourkine, N., Belin, D., Vassalli, P., Jeanteur, P., and Blanchard, J. M. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2826–2831
- Lee, G., and Gilman, M. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4579–4587
- Werlen, G., Belin, D., Conne, B., Roche, E., Lew, D. P., and Prentki, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16596–16601
- Collart, M. A., Belin, D., Briottet, C., Thorens, B., Vassalli, J. D., and Vassalli, P. (1989) *Oncogene* **4**, 237–241
- Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 1045–1083
- Mechti, N., Piechaczyk, M., Blanchard, J. M., Jeanteur, P., and Lebleu, B. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2832–2841
- Plet, A., Eick, D., and Blanchard, J. M. (1995) *Oncogene* **10**, 319–328
- Ruther, U., Wagner, E. F., and Muller, R. (1985) *EMBO J.* **4**, 1775–1781
- Rech, J., and Fort, P. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 2874
- Cruzalegui, F. H., Kapiloff, M. S., Morfin, J. P., Kemp, B. E., Rosenfeld, M. G., and Means, A. R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 12127–12131
- Sun, P., Enslen, H., Myung, P. S., and Maurer, R. A. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2527–2539
- Hipskind, R. A., Baccarini, M., and Nordheim, A. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6219–6231
- Li, S. L., Godson, C., Roche, E., Zhao, S. J., Prentki, M., and Schlegel, W. (1994) *J. Mol. Endocrinol.* **13**, 303–312
- Ran, W., Dean, M., Levine, R. A., Henkle, C., and Campisi, J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8216–8220
- Sobczak, J., Mechti, N., Tournier, M. F., Blanchard, J. M., and Duguet, M. (1989) *Oncogene* **4**, 1503–1508
- Fort, P., Rech, J., Vie, A., Piechaczyk, M., Bonni, A., Jeanteur, P., and Blanchard, J. M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 5657–5667
- Rahmsdorf, H. J., Schonthal, A., Angel, P., Litfin, M., Ruther, U., and Herrlich, P. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 1643–1659
- Shyu, A. B., Greenberg, M. E., and Belasco, J. G. (1989) *Genes Dev.* **3**, 60–72
- Chen, C. Y., Chen, T. M., and Shyu, A. B. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 416–426
- Bonnieu, A., Rech, J., Jeanteur, P., and Fort, P. (1989) *Oncogene* **4**, 881–888
- Braun, A. P., and Schulman, H. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 417–445
- Enslen, H., and Soderling, T. R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20872–20877
- Enslen, H., Sun, P., Brickey, D., Soderling, S. H., Klamo, E., and Soderling, T. R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15520–15507
- Matthews, R. P., Guthrie, C. R., Wailes, L. M., Zhao, X., Means, A. R., and McKnight, G. S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6107–6116
- Enslen, H., Tokumitsu, H., Stork, P. J., Davis, R. J., and Soderling, T. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10803–10808
- Sheng, M., Thompson, M. A., and Greenberg, M. E. (1991) *Science* **252**, 1427–1430
- Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1993) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **696**, 20–30
- Lamb, N. J., Fernandez, A., Tourkine, N., Jeanteur, P., and Blanchard, J. M. (1990) *Cell* **61**, 485–496
- Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995) *Neuron* **14**, 241–252
- Krebs, J., and Honegger, P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1313**, 217–222
- Antoine, M., Gaidon, C., and Loeffler, J. P. (1996) *Mol. Cell. Endocrinol.* **120**, 1–8
- Beals, C. R., Clipstone, N. A., Ho, S. N., and Crabtree, G. R. (1997) *Genes Dev.* **11**, 824–834
- Gamby, C., Waage, M. C., Allen, R. G., and Baizer, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26698–26705
- Liu, Y. C., and Storm, D. R. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 107–111
- Corneliusson, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A., and Grundstrom, T. (1994) *Nature* **368**, 760–764

3. Discussion de la publication n°2

3.1. Mécanisme du blocage de transcription.

Nos expériences ne permettent pas de déterminer si ce blocage de transcription est seulement une pause, ce qui implique que ce sont les mêmes polymérases qui sont bloquées puis qui repartent, ou s'il s'agit d'une terminaison prématurée. Dans ce dernier cas, des polymérases démarreraient constamment et se détacheraient de la matrice d'ADN dans le premier intron ; le signal calcique aurait pour effet d'améliorer la processivité de ces polymérases, et un plus grand nombre d'entre elles passerait le site de blocage sans encombre.

Pinaud et coll. ont fourni des arguments en faveur de ce dernier modèle, en montrant que des polymérases démarrent au niveau du promoteur de *c-fos* en l'absence de stimulation (Pinaud and Mirkovitch, 1998). Cependant, leurs données ont été obtenues en utilisant un système épisomal basé sur le virus d'Epstein-Barr (EBV) dont on ne peut dire s'il reproduit fidèlement le comportement du gène endogène. De façon plus préoccupante, ils se sont concentrés sur un blocage de transcription qu'ils disent détecter 40 pb en aval du site de transcription, ce qui est bien en amont du phénomène étudié au laboratoire et situé à +385 (Mechti et al., 1991)!

3.2. Signalisation calcique.

Paradoxalement, l'effet de W-7 va dans le même sens qu'une augmentation de calcium, alors que c'est un inhibiteur de CaM. Une façon d'expliquer ce résultat est d'imaginer une interaction entre la CaM libre et un facteur d'élongation, qui aurait pour effet de bloquer la progression des pol II. Le calcium et W-7 détruiraient tous deux cette interaction, permettant la reprise de la transcription. Il existe d'autres cas où la CaM libre (et pas $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) interagit avec un effecteur, comme par exemple la neuromoduline (Liu and Storm, 1990). Il est vraisemblable que la CaM libre ne soit pas inerte, et porte elle aussi une information.

Le nouveau répresseur sensible au calcium identifié par le groupe de José Naranjo, DREAM (Carrion et al., 1999), pourrait intervenir dans le mécanisme de blocage lié au calcium. Cependant, le site proposé par ces auteurs dans *c-fos* n'existe pas dans nos constructions, où les séquences de *c-fos* commencent à +40. Cela n'exclut pas que DREAM puisse intervenir dans la régulation de *c-fos*, mais dans ce cas cela repose sur d'autres sites.

3.3. Rôle de ce niveau de régulation.

Dans un article très récent, Lange et coll. (Lange and Bading, 2001) prétendent éliminer tout rôle pour des séquences intragéniques dans la régulation de *c-fos* par le calcium et les facteurs de croissance. Toute leur étude étant réalisée en transfection transitoire, elle démontre seulement, à mon avis, que le rôle bien établi des séquences introniques dans la régulation de l'élongation de *c-fos* dépend de conditions non remplies lors de l'utilisation de rapporteurs épisomaux. Plus précisément, l'importance d'une architecture chromatinienne dans cette régulation s'impose comme l'explication la plus plausible de l'absence d'effet observée par ces auteurs. L'utilisation de constructions intégrées dans notre étude permet de reproduire cette architecture, et donc de se rapprocher de la régulation de *c-fos* endogène. De plus, les taux d'induction de *c-fos* en transfection transitoire n'atteignent jamais ceux que l'on mesure sur l'endogène. Si l'on admet que le défaut de contexte chromatinien en est la cause, les expériences de Lange et coll. signifient que le rôle régulateur des séquences intragéniques nécessite une structure chromatinienne correcte, et non que ces régions sont inutiles.

Le rôle de ce niveau supplémentaire de régulation pourrait être d'apporter un verrou de sécurité postérieur au recrutement et à l'activation de la machinerie basale de transcription. L'importance du contrôle strict de l'expression d'un proto-oncogène justifie ce luxe de précautions.

De plus, ce système permet l'intégration de signaux de nature différente pour élaborer une réponse adaptée : ainsi l'AMPc stimule le démarrage et le calcium (principalement) l'élongation de la transcription. Chacun de ces signaux est peu efficace seul mais leur synergie est spectaculaire (Coulon et al., 1999). Toutefois, cette synergie n'a vraisemblablement pas lieu de cette façon dans les macrophages, où beaucoup d'autres stimulus permettent la levée du blocage (Collart et al., 1991).

Enfin, s'il s'agit d'une pause, ce phénomène permet un redémarrage très rapide de la transcription, puisque tous les événements de recrutement et d'activation de la machinerie ont déjà eu lieu. En effet, qu'il s'agisse d'une pause ou d'une terminaison prématurée, la vitesse de réponse de ce système est frappante (Plet et al., 1995) et participe sans doute à l'aspect "*immediate early*" de l'expression de *c-fos*. Il a été montré très récemment que le gène *mkp-1* (un autre gène de réponse précoce, codant une phosphatase de MAP-Kinase) subit le même type de régulation dépendant du calcium (Ryser et al., 2001), ce qui suggère que la régulation de l'élongation est un système général chez les IEG.

Dans ce dernier cas également, les facteurs d'élongation impliqués dans le blocage et dans sa levée par le calcium demeurent inconnus. Toutefois, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire indiquent une interaction entre la calmoduline et TFIIS recombinants, *in vitro*. Si cette interaction existe *in vivo*, cela suggère que TFIIS pourrait être la cible de cette régulation de l'élongation des ARN par une voie calcique.

Lors de cette étude de séquences intragéniques de *c-fos*, nous avons décelé dans le premier intron une région susceptible d'avoir une activité de promoteur. C'est l'objet du §II de cette section "résultats".

II. Un nouveau promoteur dans le premier intron de *c-fos*?

Nous avons au laboratoire des résultats qui suggèrent l'existence d'un promoteur dans le premier intron de *c-fos*.

1. Premiers arguments et données *in silico*

La partie 3' du premier intron de *c-fos* est extrêmement conservée du Xénope à l'homme (fig. 12, voir aussi Duret and Bucher, 1997 et http://pbil.univ-lyon1.fr/acuts/ACUTS_home.html). Même chez *fugu rubripes*, pourtant connu pour la compacité de son génome, le premier intron de *c-fos* est long de près de 400 paires de bases!

Un tel degré de conservation, très rare pour une séquence dite "non codante", suggère qu'une pression de sélection l'a maintenu. Ces séquences portent donc sans doute une fonction conférant un avantage sélectif à l'organisme.

La figure 12 montre que cette conservation culmine au niveau de sites proches des consensus pour les facteurs de transcription des familles AP-1 (TRE) et CREB (CRE). En aval de ces sites présomptifs, on trouve aussi une séquence apparentée à une boîte TATA. Le programme de prédiction de sites pour facteurs de transcription *AliBaba 2.1* (<http://wwwiti.cs.uni-magdeburg.de/~grabe/alibaba2/>) confirme ces présomptions.

Ceci suggère la présence d'un promoteur, et un programme de prédiction informatique par réseaux de neurones calcule une forte probabilité pour que ce soit un promoteur (proche de celle calculée pour le promoteur canonique : <http://promoter.informatik.uni-erlangen.de/>).

Lorsque l'on compare la partie 3' du premier intron à une banque d'EST par le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) on trouve deux EST murines correspondant à des ARN qui démarreraient au même site dans la région d'intérêt, en aval de la boîte TATA présomptive. Bien que ces ADNc puissent être incomplets, ils pourraient aussi correspondre à un messenger issu du promoteur intronique présomptif. Ces deux EST provenant d'une banque de cerveau murin adulte, nous avons cherché en priorité dans ce tissu dans nos tentatives de détection du messenger intronique (voir §3).

Enfin, un des sites hypersensibles à la Dnase I recensés par Renz et coll. (Renz et al., 1985, voir fig. 5) coïncide avec cette région, ce qui renforce l'idée qu'elle puisse avoir un rôle régulateur.

Tous ces arguments nous ont encouragés à formuler l'**hypothèse d'une activité promotrice de la transcription dans le premier intron de *c-fos***.

```

pig_   AAAAGCGGCGATCCTCCCTCCCCTCGCAGCCTGGAGCAGGGAGGAGGG-TGAGAGGAGGA
hum_   GAAAGCGGCAATCCCCCTCCCCCGGCAGCCTGGAGCACGGAGGAGGGATGAG-GGAGGA
mou_   AACC GCGGCAATCCCCCTCCCGGGGCAGCCTGGAGCAGGGAGGAGGGAGGAG-GGAGGA
chi_   ---CGCGGCG-----CCGCCGCGGGGCGGGCGGG-----GGGAGCCGGGGTCCG---GGCT
xen_   AATCGTGGC-----TCGCCTTGTAGCCCTAACT--GCAACAGGG-TCTGTGCACCC
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....

pig_   GGGTGAAGCC-----GGCG-GGTGTGTAAGGCAGTTTCATTGATAAAAAGC--GAGTTCA
hum_   GGGTGCAGCG-----GGCG-GGTGTGTAAGGCAGTTTCATTGATAAAAAGC--GAGTTCA
mou_   GGGTGCTGCG-----GGCG-GGTGTGTAAGGCAGTTTCATTGATAAAAAGC--GAGTTCA
chi_   GCGCGTTGC-----GGCG-CGTGTGTAAGCGGCTTCATTGATAAAACGC--GAGTTCA
xen_   TCGTGCCCTCCTCCCCCATAATGTGTAAAGCTGTTCCATTGATAAAAATCCAGAGTTCA
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....

                                TRE      CRE      TATA
pig_   TTCAGGAGACTCCGGAGCGGCGTCTGCGTCAGCGCAGACGTCAGGGATTATTTATAACAAC
hum_   TTCTGGAGACTCCGGAGCGGCGCCTGCGTCAGCGCAGACGTCAGGGATTATTTATAACAAA
mou_   TTCTGGAGACTCCGGAGCAGCGCCTGCGTCAGCGCAGACGTCAGGGATTATTTATAACAAA
chi_   TTGAGGAGACTCCGGAGCGGCGCCTGCGTCAGCGCGGACGTCAGAGATTATTTATATCGGG
xen_   TTCAGGAGACTCCAGAGCGGTTCCTGCGTCACTAGTGACGTCGGAGCTTATTTCTGTCTATA
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....

pig_   CCCCTTTTCAAGCG-AGTGATGCTGAAGGGATAACGGGAACGCAGCAGCAGGATGGAGGA
hum_   CCCCTTTTCAAGCA-AGTGATGCTGAAGGGATAACGGGAACGCAGCGGCAGGATGGAAGA
mou_   CCCCTTTTCGAGCG-AGTGATGCCGAAGGGATAACGGGAACGCAGCAGTAGGATGGAGGA
chi_   CCGC-TCTCGTGCGGAGCGGCGCTGGCGG-----CGCGGCCCGG-----GGCGGCGGG
xen_   C-----TCAGGCT-CGTG-TGCTGG---GAT--TGGAATGCGGAACCCGGGTGGGATT
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
.....

```

Figure 12 : Alignement des séquences de la partie 3' du premier intron de *c-fos* issues des vertébrés : *sus scrofa*, *homo sapiens*, *mus musculus*, *gallus gallus* et *xenopus laevis*. L'alignement a été réalisé avec le programme Clustal (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Les séquences correspondant aux consensus TRE, CRE et TATA sont indiquées en bleu.* désigne les résidus strictement conservés dans les cinq espèces.

2. Données *in vitro* et *ex vivo*

2.1. La région d'intérêt se lie à des protéines in vitro

En retard sur gel, des protéines présentes dans un extrait nucléaire de cellules Hela se fixent sur un fragment d'ADN contenant les sites TRE et CRE décrits ci-dessus (fig. 13A, piste 2). Par des expériences de compétition avec un excès d'oligonucléotides non radioactifs mutés sur les sites TRE et/ou CRE, nous avons établi une correspondance entre les complexes observés sur gel (bandes a à c) et chaque site. Le mutant TRE atténue sélectivement les complexes fixés sur le CRE (bande a et surtout c, pistes 5 et 6), et inversement le mutant CRE fait disparaître les bandes b et c (pistes 7 et 8) correspondant donc aux complexes sur le TRE. On le voit, la spécificité de ces effets n'est pas totale : la parenté et la proximité des sites TRE et CRE introduisent, aux excès d'oligonucléotide les plus importants, une spécificité plus lâche (fig. 13A).

Afin de vérifier que ces complexes contiennent, comme prévu, des membres des familles CREB et AP-1, les réactions de liaison ont été incubées (fig. 13B) avec des anticorps dirigés contre la famille Fos (piste 3), la famille Jun (piste 4), et les facteurs ATFα (piste 5), ATF-1 (piste 6), JunB (piste 7), CREB-1 (piste 8) et CREM (piste 9). En résumé, la bande b correspond à un complexe contenant des membres des familles Fos (piste 3) et Jun (piste 4), mais pas JunB (piste 7). Les anticorps anti- ATF-1 (piste 6) et CREB-1 (piste 8) produisent un retard supplémentaire de migration des bandes c et b, respectivement.

Nous avons donc établi que la région intronique conservée peut complexer des protéines des familles AP-1 et CREB/ATF *in vitro*.

Il est étonnant que des sites aussi proches soient aussi indépendants du point de vue de la fixation de facteurs, mais la situation est peut-être différente *in vivo*.

2.2. Le site TRE est occupé dans des fibroblastes en culture

Des expériences d'empreinte génomique *in vivo* par protection au DMS, réalisées au laboratoire par Ariane Plet, montrent que des protéines protègent la région du TRE dans des fibroblastes Ltk-. Cette protection est observée dans des conditions de carence en sérum pendant 24h, et disparaît lorsque les cellules sont réapprovisionnées en sérum pendant 15 minutes. Ces protections sont moins claires et moins reproductibles dans des NIH3T3 (fig. 14).

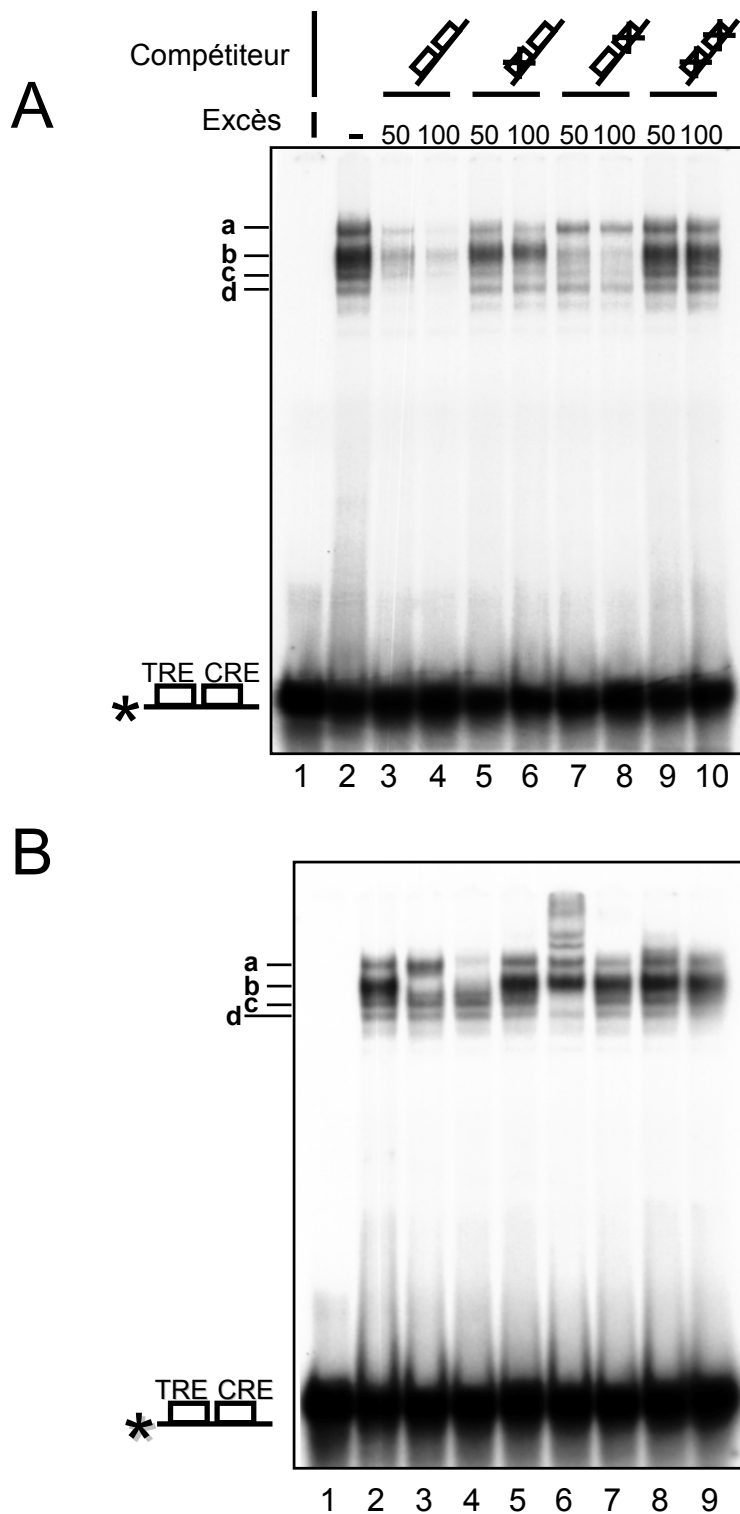


Figure 13 : Retard sur gel en utilisant comme sonde une cassette d'oligonucléotides correspondant à la région contenant les sites TRE et CRE présomptifs, et un extrait nucléaire de cellules Hela. La réaction a été conduite avec le même protocole que dans Philips et al., 1999. **A.** Compétitions avec des sondes froides mutées en excès de 50 ou 100 fois. **B.** Utilisation d'anticorps anti- famille Fos (3), famille Jun (4), ATFa (5), ATF-1 (6), JunB (7), CREB-1 (8), CREM (9).

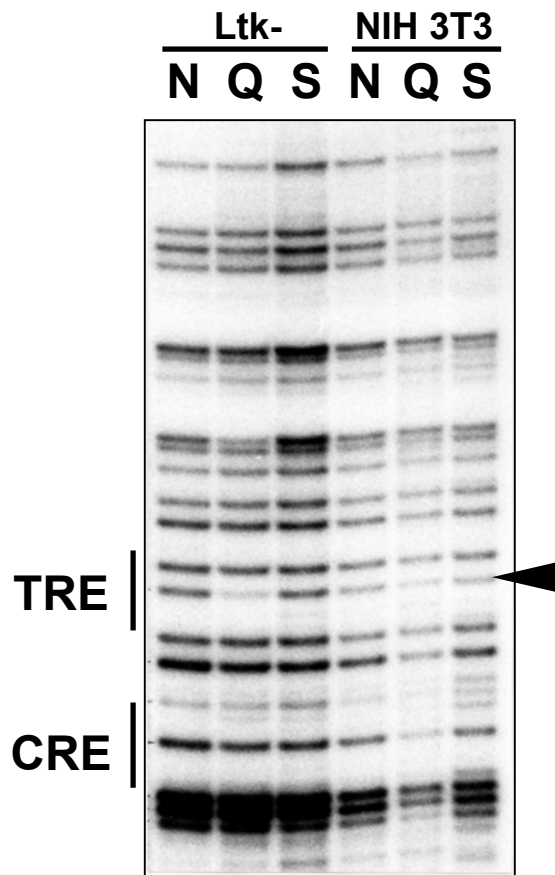


Figure 14 : Empreinte génomique in vivo par protection au DMS, réalisée conformément au protocole de Plet et al., 1997. Des fibroblastes Ltk- ou NIH 3T3 quiescents (**Q**) ou stimulés (**S**) par addition de sérum 15 ' ont été traités par le DMS, puis l 'ADN génomique a été préparé, traité à la pipéridine, et amplifié par LM-PCR. Les mêmes traitements ont été appliqués à de l 'ADN « nu » (**N**), méthylé in vitro. La flèche noire indique la position de la bande protégée.

2.3. En transfection transitoire le fragment d'intérêt a une activité promotrice

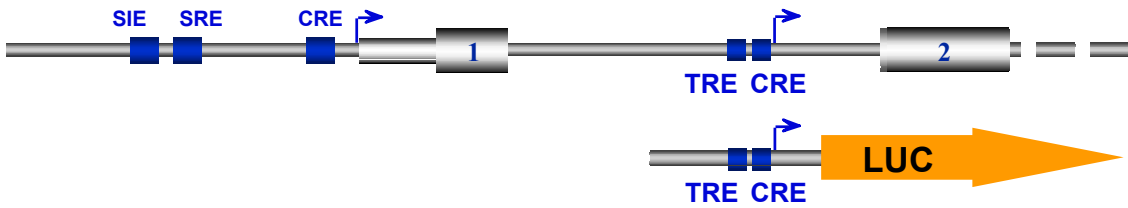
Nous avons construit le plasmide *fos intron-LUC* (fig. 15A), contenant un rapporteur luciférase sous contrôle de la partie 3' de l'intron (fragment +579 à +980 de *c-fos*). Le vecteur utilisé (pGL2-basic, PROMEGA) étant dépourvu de séquences promotrices, il a une activité de fuite très faible. Par contre, *fos intron-LUC* montre une activité de base en transfection transitoire dans les fibroblastes CCL39, NIH3T3 et MEF en croissance exponentielle. Les séquences contenues dans ce fragment d'intron semblent donc avoir une activité promotrice dans ces cellules.

De plus, cette activité est stimulable par les agonistes de la voie de l'AMPC (forskoline) et du calcium (ionophore A23187), mais pas par la voie PKC (PMA). De façon étonnante, les traitements par la forskoline et A23187 n'entrent pas en synergie pour activer ce promoteur (fig 15B).

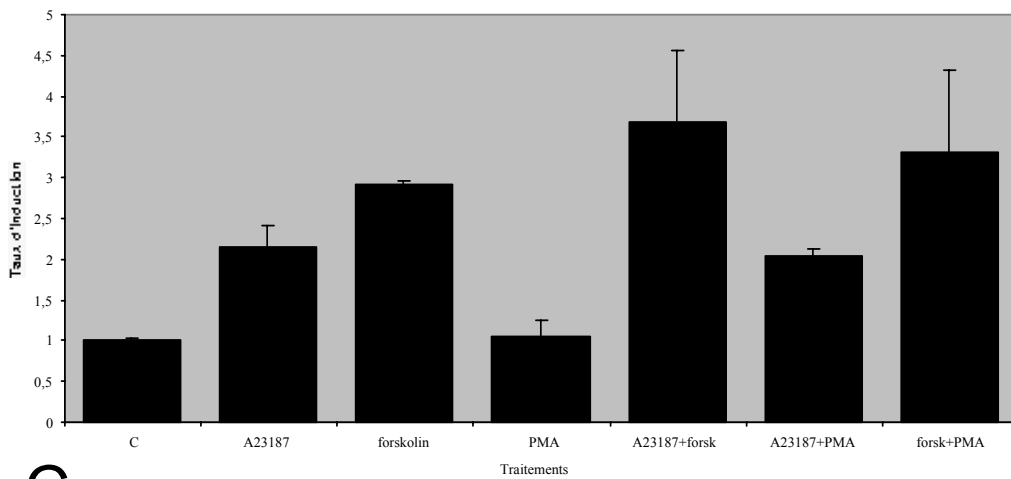
En cotransfection avec des vecteurs d'expression pour différents membres d'AP-1 et CREB, on observe une stimulation de 6 fois par CREB. c-Fos et c-Jun ont peu d'effet seuls, mais activent 4 fois ensemble (Fig 15C). Les autres facteurs AP-1 testés (FosB, Fra-1, Fra-2, JunB, JunD) n'activent pas ou peu la construction *fos intron-LUC* (résultats non montrés).

Comme la séquence de cette région le laissait prédire, elle répond aux voies du calcium et de l'AMPC, et les facteurs c-Fos, c-Jun et CREB stimulent son activité. Cependant, les taux d'activation sont très modestes. Peut-être manque-t-il, dans les fibroblastes, des cofacteurs spécifiques d'un tissu donné, qui seraient requis pour une induction maximale.

A



B



C

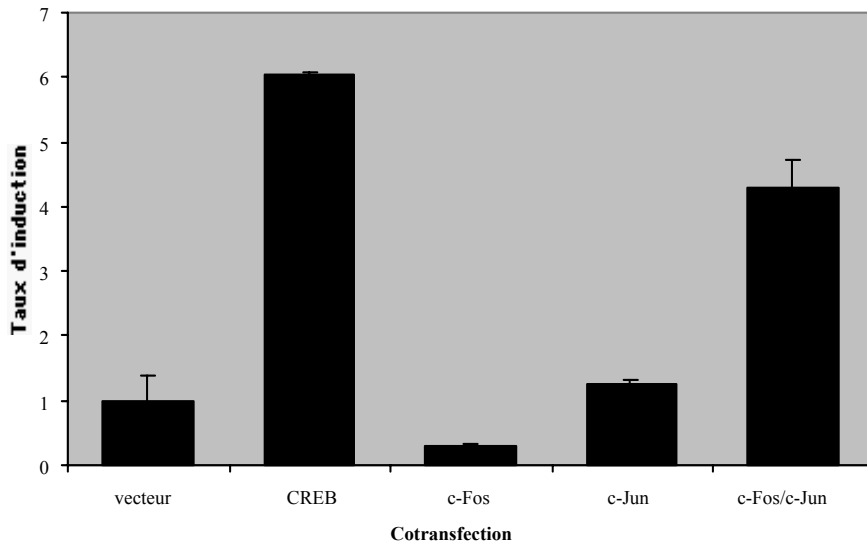


Figure 15 : Transfection transitoire de la construction *fos intron-LUC* (A) dans les fibroblastes NIH3T3 en croissance exponentielle. Un plasmide de normalisation (tk-RL) est co-transfecté afin de corriger le signal en fonction de l'efficacité de transfection. B. Les cellules sont traitées 1h par les drogues indiquées ou par leur solvant, le DMSO (C), et récoltées 5h plus tard. C. Les cellules sont co-transfectées avec pcDNA3 vide (vecteur) ou pcDNA3 contenant les cDNA codant CREB, c-Fos et/ou c-Jun.

3. Données *in vivo*

3.1. Détection du messenger intronique

A partir d'extraits d'ARN (totaux ou polyA+) de différents tissus de souris adultes, nous avons cherché à détecter des transcrits issus du promoteur intronique par plusieurs méthodes. En *northern blot* une sonde dirigée contre la partie 3' de l'intron ne permet pas de détecter ces ARN. Nous avons donc utilisé la technique de protection vis-à-vis de la RNase, plus sensible et apportant une information supplémentaire : le site de démarrage de transcription, sans plus de succès. La RT-PCR est encore plus sensible, et nous avons réussi à amplifier une partie de l'intron par cette méthode, mais nous n'avons pas la preuve formelle qu'il ne s'agit pas du pré-messager, qui contient aussi l'intron. En effet, le signal obtenu est toujours très faible, ce qui nous a obligé à utiliser un grand nombre de cycles de PCR, conditions où les contaminations deviennent problématiques. Les expériences de RACE-PCR, destinées à repérer et amplifier l'extrémité 5', ont échoué avec les tissus utilisés.

Nous n'avons donc pas la preuve formelle de l'existence d'un transcrit endogène issu de l'activité du promoteur intronique.

Les types cellulaires exprimant cet ARN pouvant être peu représentés dans des extraits réalisés à partir de tissus grossièrement disséqués, nous avons eu recours à l'hybridation *in situ*, en utilisant un protocole basé sur des sondes non radioactives (marquées à la digoxygénine) et mis au point par Basyuk et coll. (Basyuk et al., 2000). Dans cette méthode, la fixation des tissus se fait à pH alcalin, ce qui augmente considérablement la sensibilité. En effet, cette technique nous a permis de détecter des signaux qui nous avaient échappé par la méthode traditionnelle, radioactive.

Grâce à cette technique, nous avons obtenu un signal correspondant à la partie 3' du premier intron, dans des coupes sagittales congelées de cerveau de souris adulte (fig. 16A et B, sondes 5 et 8). Le marquage concerne toutes les structures cérébrales qui contiennent de nombreux corps cellulaires : hippocampe, cervelet, bulbes olfactifs. Il ne s'agit donc pas vraiment d'une spécificité tissulaire. En effet, la répartition est la même lorsque l'on utilise une sonde β -actine (fig. 16B, sonde A) ou le cDNA entier de *c-fos* (fig. 16, sonde 3).

Deux contrôles négatifs ont été utilisés : une sonde LacZ bactérienne (fig. 16B, sonde Z) et un snoRNA (*small nucleolar RNA*) spécifique du cerveau de rat, absent chez la souris, appelé RBII-36 (fig. 16B, sonde S, Cavaille et al., 2001).

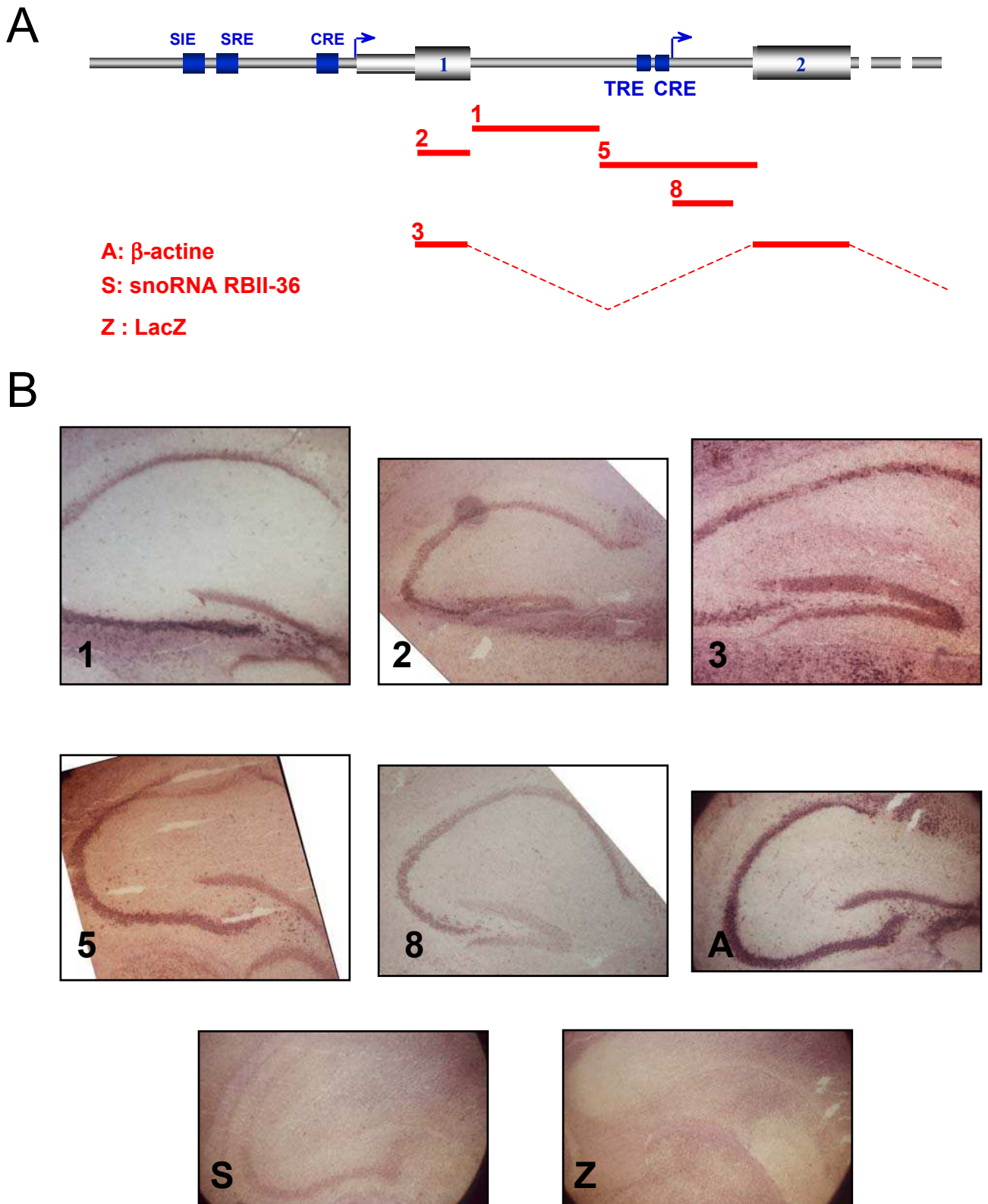


Figure 16 : Hybridation *in situ* sur des coupes sagittales congelées de cerveau murin adulte. A. Description des ribosondes utilisées en B. B. Après révélation les coupes sont observées au microscope, ici un champ centré sur l'hippocampe.

Le signal correspondant à la partie 3' de l'intron est cytoplasmique (fig.16C, sonde 5), ce qui est compatible avec la localisation d'un ARN messenger (comparer avec l'actine, sonde A), mais pas avec celle d'un pré-messenger. Par contre, lorsque l'on utilise une sonde dirigée contre la partie 5' de l'intron (en amont du site présumé de démarrage), on obtient un signal nucléaire, sous forme d'un point unique (fig.16C, sonde 1). Ces données suggèrent indirectement que nous avons détecté un ARN messenger mature qui démarre dans le premier intron. Malheureusement, nous n'avons pas de preuve plus définitive de son existence à ce jour.

C

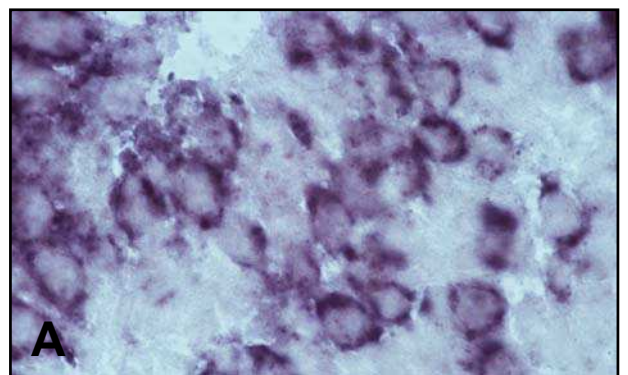
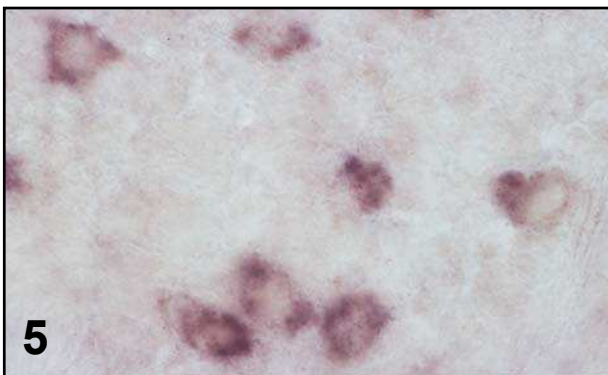
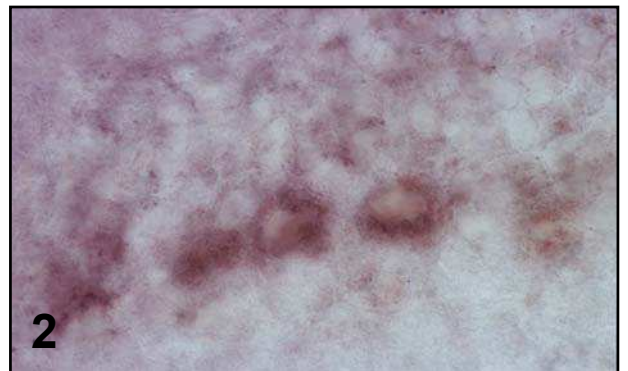
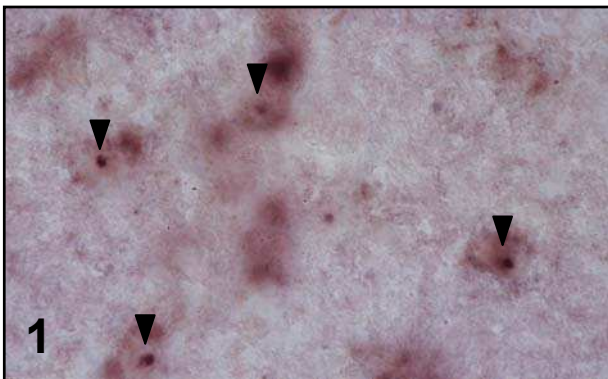


Figure 16 C : Les mêmes coupes qu 'en B, à un plus fort grossissement. La sonde 1 (partie 5 ' de l 'intron 1) donne un signal sous forme d 'un point nucléaire (flèches). Les autres sondes présentent un marquage cytoplasmique, comme l 'actine (A). Ce dernier signal est compatible avec la localisation d 'un ARN messenger mature.

3.2. Expression au cours du développement : souris transgéniques

Afin d'étudier le patron d'expression de ce promoteur au cours du développement, nous l'avons cloné en amont de la β -galactosidase, en l'absence de tout autre promoteur ; cette construction est appelée FIZ (Fos Intron lacZ, fig. 17). La présence d'un signal de localisation nucléaire permet de distinguer l'activité du transgène de celle de la β -galactosidase endogène, qui est cytoplasmique.

Karim Chebli, au laboratoire, a micro-injecté FIZ (2ng/ml) dans des ovocytes de souris fécondés. Après une nuit à l'étuve, ceux qui avaient commencé à se diviser malgré le traumatisme de l'injection ont été retransplantés dans des souris pseudogestantes. Les souriceaux ont été génotypés par PCR, avec confirmation par *southern blot*, en utilisant des amorces et une sonde spécifiques du cDNA bactérien LacZ.

En deux campagnes de transgénèse, nous avons obtenu 6 fondateurs transgéniques sur 65 naissances. Un de ces fondateurs, chimérique, ne transmettait pas le transgène à sa descendance. Les 5 autres transmettent à la fréquence attendue de 50% environ, et dans 4 de ces lignées on observe une expression pendant l'embryogenèse par coloration en présence de X-Gal à 30°C pendant 36h. L'incubation à 30°C au lieu de 37°C favorise l'activité de la β -galactosidase bactérienne vis-à-vis de l'enzyme endogène.

Dans les 4 lignées citées, les patrons d'expression peuvent différer, mais ils ont en commun un signal dans le tube neural dès le stade E11,5 (fig.18) et dans les glandes mammaires en développement à partir du stade E12,5 (fig.18 B, C, D). Au-delà, il est difficile de déterminer si l'expression s'éteint ou si les embryons sont trop épais et opaques pour que les réactifs pénètrent.

Des coupes transversales nous permettront de déterminer quels types cellulaires du tube neural expriment le transgène. Dans les glandes mammaires, les cellules marquées semblent appartenir au cercle de mésenchyme qui entoure les cellules épithéliales (non marquées) de la glande naissante (fig.18D), bien que ceci demande à être confirmé par des coupes.

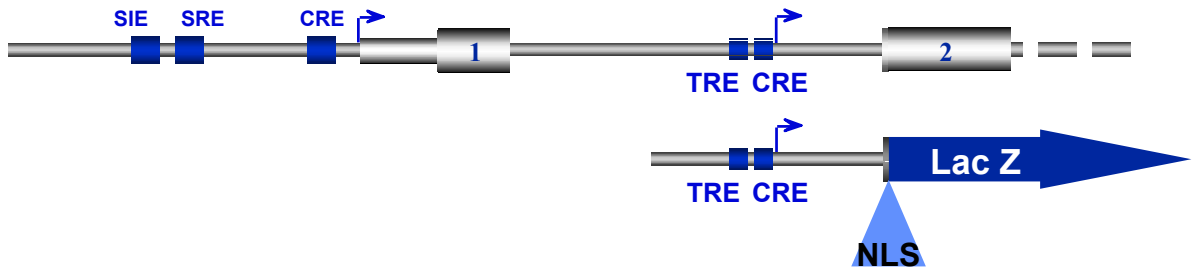


Figure 17 : Partie 5 ' du gène *c-fos* (haut) et construction FIZ utilisée en transgénèse (bas). Un signal de localisation nucléaire permet de distinguer l 'activité β -galactosidase bactérienne de l 'endogène, cytoplasmique (Bonnerot et al., 1987).

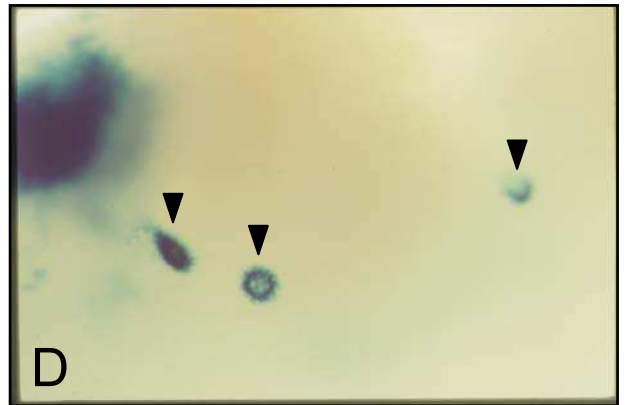
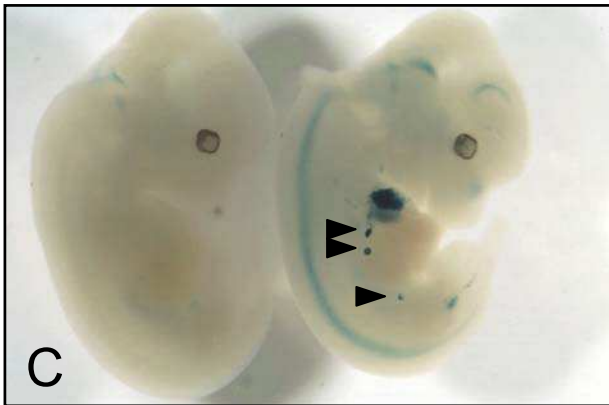
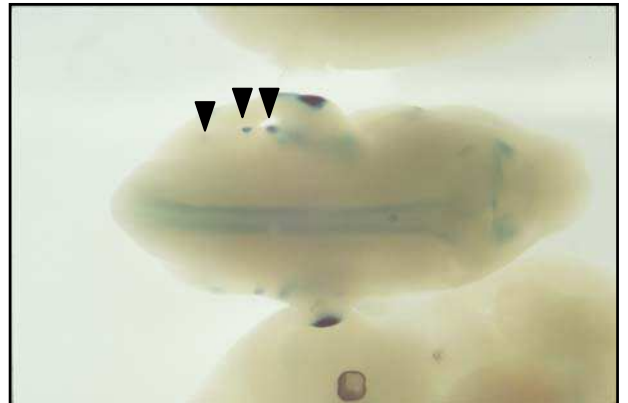


Figure 18 : Marquage de l'activité β -galactosidase dans les lignées transgéniques FIZ n°14 (A, B, C, D) et 60 (E). A. embryon E11,5 montrant une activité dans le tube neural et d'autres structures non marquées dans les autres lignées. B. Au stade E12,5, en plus du tube neural apparaissent les glandes mammaires (flèches). Vue dorsale. C. Le même embryon en vue latérale (à droite) et un embryon sauvage de la même portée (à gauche) montrant une faible activité endogène dans le cerveau postérieur. D. Glandes mammaires en développement (triangles). E. Embryon E11,5 d'une autre lignée (n°60) montrant seulement le marquage du tube neural. Les glandes mammaires apparaissent à E12,5.

4. Conclusion

Nous avons maintenant un faisceau d'arguments qui confirment qu'une activité promotrice existe dans le premier intron de *c-fos*. En effet, la région d'intérêt fixe des facteurs de transcription et dirige l'expression d'un rapporteur *ex vivo* et *in vivo*. Cependant, nous n'avons pas pu détecter un ARN issu de cette activité, et donc cartographier son extrémité 5', ce qui serait la démonstration formelle de l'existence de ce nouveau promoteur *in vivo*. L'utilisation des souris transgéniques devrait nous guider dans la recherche du territoire qui exprime une quantité de messager suffisante pour le détecter et le caractériser.

5. Discussion

5.1. Difficultés rencontrées et restrictions

La démonstration formelle de l'activité de ce nouveau promoteur reste donc à établir. Pour l'instant la confidentialité de son expression n'a pas permis la détection du messager ou de la protéine résultante sans ambiguïté. Ces difficultés de détection peuvent être dues à une expression:

- i) à un faible niveau,
- ii) dans un type cellulaire particulier, peu représenté dans un extrait brut,
- iii) à un moment donné du développement ou en fonction d'un signal.

Bien sûr ces conditions peuvent être combinées.

Comment expliquer que personne n'ait découvert cette activité auparavant? A l'époque ou de nombreux groupes travaillaient sur l'expression de *c-fos*, certains ont forcément remarqué les sites conservés décrits plus haut. Sans doute ont-ils fait une hybridation *in situ* ou un northern blot sur des extraits de différents tissus, puis ont renoncé en l'absence de signal, pour les raisons décrites ci-dessus.

Comme tous les vecteurs dépourvus de promoteur, celui que nous avons utilisé en transfection transitoire, pGL2-basic, possède une activité de fuite faible mais non nulle. Il est donc possible que l'activité mesurée avec le fragment intronique corresponde à une

augmentation de cette fuite et non à un démarrage en aval de la boîte TATA intronique repérée. Ceci peut être vérifié en recherchant l'extrémité 5' de l'ARN de fusion intron-luc résultant par protection à la RNase, afin de vérifier que le site de démarrage de la transcription se trouve bien dans l'intron.

Les nombreux travaux cherchant à caractériser l'expression de *c-fos* ont souvent utilisé des sondes qui ne permettent pas de discriminer entre les deux formes de messager (ADNc entier ou exons 3 et 4). Certains résultats devront être réexaminés en tenant compte d'une activité promotrice intronique, afin d'établir quel promoteur était responsable de l'activité observée.

Ainsi, Caubet (Caubet, 1989) a détecté une expression de *c-fos* dans la moëlle épinière, par hybridation *in situ* sur des coupes congelées. Ce signal, obtenu avec une sonde contre l'exon 4, affecte aussi les ganglions de la racine dorsale (DRG), à vocation sensitive. Les pointillés bleus que l'on devine le long du tube neural des embryons FIZ (fig. 18A) pourraient correspondre à ces DRG : ceci sera vérifié par des coupes transversales pratiquées sur les embryons colorés. Le signal obtenu avec une sonde "exon 4" pourrait correspondre au messager canonique, au messager intronique, ou encore à la somme de ces signaux. Ce point pourrait être éclairci par protection à la RNase, mais aussi en comparant le patron d'expression des souris FIZ avec celui des souris Fos-LacZ du groupe de Tom Curran (Robertson et al., 1995), où le gène *c-fos* entier est fusionné à la β -galactosidase. En effet, ces auteurs ont toujours cherché les sites d'expression de ce transgène chez l'adulte en réponse à des stimulations, et jamais dans l'embryogenèse (T. Curran, communication personnelle). Ces souris sont actuellement disponibles au laboratoire.

Dans les glandes mammaires, un patron d'expression très proche de celui des embryons FIZ a été observé par hybridation *in situ* pour certains gènes Hox : *Hoxa9*, *Hoxb9*, et *Hoxd9* (Chen and Capecchi, 1999). Les souris KO pour ces trois gènes paralogues ont un développement mammaire post-grossesse déficient. Il est intéressant de rapprocher ce chevauchement de patrons d'une étude récente qui montre que des facteurs AP-1 sont impliqués dans la prolifération induite par *Hoxb4* (Krosl and Sauvageau, 2000). Il se pourrait donc que les événements locaux de prolifération déclenchés par les gènes Hox dépendent de l'activité AP-1, peut-être à cause de sa capacité à activer la cycline D.

Une inconnue essentielle demeure : le comportement de ce nouveau promoteur est-il le même dans le contexte du gène entier qu'isolé, dans nos constructions? Sans doute les deux promoteurs ont-ils une influence l'un sur l'autre, et il faudra réaliser des souris transgéniques

où LacZ est sous contrôle exclusif du promoteur intronique, mais dans le contexte du gène entier.

5.2. Rôle de ce promoteur alterne?

Une étude récente, menée en transfection transitoire dans des cellules β pancréatiques, montre que le premier intron de *c-fos* contient un élément régulateur requis pour une réponse totale au glucose (Susini et al., 2000). Cette régulation est indépendante des séquences requises pour le blocage de l'élongation (Mechti et al., 1991) mais nécessite le fragment allant de +337 à +870 (Susini et al., 2000). Or ce fragment contient le promoteur intronique présumé décrit ci-dessus! Deux scénarios sont possibles : soit cette région coopère avec les séquences en amont pour régler le démarrage au site canonique, soit il s'agit réellement d'un second promoteur et Susini et coll. ont mesuré la somme des activités des deux promoteurs.

Il existe aussi un promoteur alterne dans le premier intron du gène codant CREM (Molina et al., 1993), un autre IEG. Les protéines qui résultent de cette activité sont appelées ICER (*Inducible cAMP Early Repressor*, isoformes I, I γ , II, II γ), et constituent un dominant négatif pour les facteurs CREM et CREB. En effet, ICER semble ne contenir que les domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation (Stehle et al., 1993).

Dans notre cas, le premier ATG en phase avec c-Fos en aval du promoteur intronique produirait une protéine amputée des 110 premiers aa de c-Fos. Le rôle de ce nouveau promoteur pourrait être de générer une protéine Fos Δ N₁₋₁₁₀, capable de dimériser et de se lier à l'ADN, mais dépourvue de propriétés transformantes et de la fonction de transrépression des GR, contenues dans la partie N-terminale manquante. Dans un test de transactivation sur un rapporteur luciférase contrôlé par un site TRE multimérisé (résultats non montrés), les vecteurs d'expression pour c-Fos et Fos Δ N₁₋₁₁₀ ont des activités très similaires. *In vivo*, dans un contexte tissulaire particulier ou sur un promoteur particulier, il manque peut-être à Fos Δ N₁₋₁₁₀ un domaine requis pour une interaction avec un facteur de transcription voisin ou un coactivateur, ce qui pourrait contribuer à la régulation de la fonction de c-Fos. A l'aide d'anticorps dirigés contre les parties N- et C-terminales de c-Fos, nous avons tenté de détecter cette protéine Fos Δ N₁₋₁₁₀ dans des extraits totaux de différents tissus de souris adultes (cerveau, poumon, cœur, foie, estomac, rate, rein,...), sans succès.

Les souris Fos^{Fosl1/Fosl1}, issues du remplacement par fra-1 des séquences transcrites de *c-fos*, seraient utiles pour chercher la fonction du promoteur intronique, car elles corrigent les défauts dus à la perte de c-Fos, mais pas ceux éventuellement consécutifs à l'absence de FosΔN, car le premier intron de *c-fos* est absent. Si les souris *c-fos* ^{-/-} ont un phénotype ayant échappé aux groupes de Wagner (Wang et al., 1992) et de Papaioannou (Johnson et al., 1992), et que ce phénotype n'est pas corrigé par le *knock-in* de fra-1, il renseignera sur le rôle de ces séquences introniques. Une approche plus directe consiste à éliminer par recombinaison homologue la région intronique d'intérêt sans modifier le reste du gène *c-fos*, en tirant parti du système CRE-Lox, afin d'approcher la fonction du promoteur intronique *in vivo*. La comparaison des phénotypes de ces souris avec ceux des souris *c-fos* ^{-/-} permettra de préciser la fonction physiologique du promoteur intronique et de FosΔN.

Discussion Générale

La complexité du contrôle de la transcription est bien illustrée par l'exemple de *c-fos*. Après avoir disséqué le promoteur pour en extraire de nombreuses séquences régulatrices, on découvre à présent que les séquences intragéniques sont, elles aussi, importantes pour l'expression génique. Au cours de ma thèse, nous avons étudié deux niveaux de régulation de la transcription de *c-fos*. Le premier contrôle l'efficacité de progression des RNA polymérases au-delà d'une pause dans le premier intron, d'une façon sensible aux signaux cellulaires comme le calcium. Le second consiste en un démarrage de la transcription en aval du site canonique, dans la partie 3' du premier intron ; le messenger résultant de cette activité coderait une protéine tronquée dont la fonction est inconnue.

Etant donnée la proximité de ces deux phénomènes et le fait que tous les événements semblent liés dans la régulation de ce gène, il est tentant de postuler qu'il existe un dialogue entre les deux promoteurs de *c-fos*, par exemple sous forme d'activités mutuellement exclusives. Ainsi, le blocage de la transcription issue du promoteur canonique pourrait participer à son extinction afin de permettre au promoteur intronique de s'exprimer seul, dans des conditions que nous n'avons malheureusement pas pu établir pour l'instant (fig. 19).

L'ultrastructure de la chromatine est constituée de l'ensemble des protéines structurales et activatrices en interaction fonctionnelle entre elles et avec l'ADN. Il est probable que cette organisation permette des interactions à distance : par exemple, les nucléosomes "fixes" dans la partie 5' de *c-fos* pourraient rassembler dans l'espace les deux promoteurs et la région du blocage. Cette concentration de protagonistes pourrait favoriser des dialogues tels que celui schématisé fig. 19.

Le rôle des séquences introniques dans la régulation de *c-fos* n'a pas pu être révélé par des techniques de transfection transitoire (Lange and Bading, 2001). Il semble donc que les phénomènes que nous décrivons nécessitent un environnement chromatinien, et que si l'on doit les aborder en transfection il faut faire des transfusions stables. En parallèle, une exploration cinétique de l'état de la chromatine intragénique au cours de l'activation de *c-fos* endogène pourrait nous renseigner sur les modalités de la coopération entre les deux promoteurs et le blocage de l'élongation. En effet, la plupart des études concernant la chromatine et *c-fos* se sont concentrées sur le promoteur.

Une approche *in vivo* serait cependant plus élégante, et permettrait d'attribuer un rôle à ces événements dans le développement de la souris. Ainsi, des souris transgéniques pourraient être construites avec le transgène suivant : dans le contexte du gène entier (sa taille le permet),

deux rapporteurs différents pourraient être utilisés pour les deux promoteurs de *c-fos*. Les mutants de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) de diverses couleurs sont particulièrement indiqués pour cette application. Les activités des promoteurs pourraient être visualisées dans l'embryon précoce entier et dans des coupes de tissus adultes par fluorescence. De plus, cette construction permettrait de vérifier si le promoteur intronique est influencé par le promoteur canonique ou s'il est indépendant, en comparant ces embryons avec nos embryons FIZ.

A terme, la fonction des séquences régulatrices introniques *in vivo* ne pourra être testée que par leur destruction ciblée dans le contexte du gène endogène. L'insertion (par recombinaison homologue) de séquences loxP dans le premier intron permettrait d'exciser la région d'intérêt en présence de la recombinaise Cre, et ce sans affecter le reste du gène. L'expression conditionnelle de Cre peut se faire à un stade ou dans un tissu particulier, ce qui rend possible la destruction des séquences introniques à partir d'un certain stade uniquement.

Les deux groupes qui ont généré les souris *c-fos*^{-/-} ont utilisé des stratégies différentes. Dans un cas la recombinaison se fait en aval du premier intron, introduisant un décalage de phase qui affecte les messagers issus des deux promoteurs (Wang et al., 1992). Dans l'autre cas, c'est le premier exon qui est ciblé (Johnson et al., 1992) : la transcription à partir du promoteur intronique ne devrait donc pas être touchée. Néanmoins, les défauts majeurs identifiés chez ces deux lignées de souris sont identiques, en particulier en ce qui concerne l'ostéopétrose. Le rôle des séquences introniques doit donc être relativement subtil ou affecter des phénomènes peu spectaculaires. Quant aux autres défauts avérés des souris KO pour *c-fos* (Paylor et al., 1994; Watanabe et al., 1996), ils ont été identifiés chez les souris du groupe de Spiegelman (Johnson et al., 1992), sauf en ce qui concerne l'apoptose rétinienne (Hafezi et al., 1997) où les souris de Wagner (Wang et al., 1992) ont été utilisées. Il serait utile de s'assurer que les deux lignées différentes ont des phénotypes identiques pour les comparer avec les souris où seul l'intron est détruit.

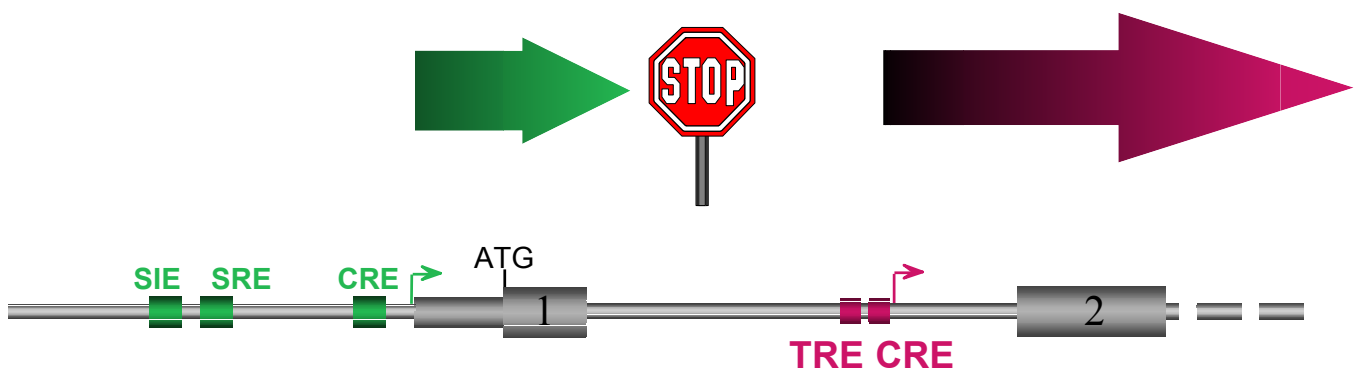


Figure 19 : Modèle de régulation de l'expression de *c-fos*.
 Le blocage de transcription affectant les polymérase qui ont démarré sur le promoteur canonique permet-il l'expression du promoteur intronique?

BIBLIOGRAPHIE

- Abate, C., Baker, S. J., Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W., Marshak, D. R., and Curran, T. (1993). Dimerization and DNA binding alter phosphorylation of Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6766-70.
- Abate, C., Marshak, D. R., and Curran, T. (1991). Fos is phosphorylated by p34cdc2, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene*, **6**, 2179-85.
- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., 3rd, and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*, **249**, 1157-61.
- Ahn, S., Olive, M., Aggarwal, S., Krylov, D., Ginty, D. D., and Vinson, C. (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol*, **18**, 967-77.
- Akoulitchiev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*, **407**, 102-6.
- Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., and Bravo, R. (1988). Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **8**, 2140-8.
- Antoine, M., Gaiddon, C., and Loeffler, J. P. (1996). Ca²⁺/calmodulin kinase types II and IV regulate c-fos transcription in the AtT20 corticotroph cell line. *Mol Cell Endocrinol*, **120**, 1-8.
- Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature*, **370**, 226-9.
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J*, **17**, 6289-99.
- Aso, T., Lane, W. S., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1995). Elongin (SIH): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science*, **269**, 1439-43.
- Bading, H., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*, **260**, 181-6.
- Bakin, A. V., and Curran, T. (1999). Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*, **283**, 387-90.
- Balsalobre, A., and Jolicoeur, P. (1995). Fos proteins can act as negative regulators of cell growth independently of the fos transforming pathway. *Oncogene*, **11**, 455-65.
- Bannister, A. J., Brown, H. J., Sutherland, J. A., and Kouzarides, T. (1994). Phosphorylation of the c-Fos and c-Jun HOB1 motif stimulates its activation capacity. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5173-6.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *Embo J*, **14**, 4758-62.
- Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B. M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular Cell*, **8**, 327-337.

- Basset-Seguin, N., Escot, C., Moles, J. P., Blanchard, J. M., Kerai, C., and Guilhou, J. J. (1991). C-fos and c-jun proto-oncogene expression is decreased in psoriasis: an in situ quantitative analysis. *J Invest Dermatol*, **97**, 672-8.
- Basyuk, E., Bertrand, E., and Journot, L. (2000). Alkaline fixation drastically improves the signal of in situ hybridization. *Nucleic Acids Res*, **28**, E46.
- Beals, C. R., Clipstone, N. A., Ho, S. N., and Crabtree, G. R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin- sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev*, **11**, 824-34.
- Behrens, A., Jochum, W., Sibilias, M., and Wagner, E. F. (2000). Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene*, **19**, 2657-63.
- Behrens, A., Sibilias, M., and Wagner, E. F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet*, **21**, 326-9.
- Bensaude, O., Bonnet, F., Casse, C., Dubois, M. F., Nguyen, V. T., and Palancade, B. (1999). Regulated phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD). *Biochem Cell Biol*, **77**, 249-55.
- Berger, S. L. (2001). An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. *Oncogene*, **20**, 3007-13.
- Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., Wrighton, C., and Busslinger, M. (1995). Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol Cell Biol*, **15**, 3748-58.
- Berkowitz, L. A., Riabowol, K. T., and Gilman, M. Z. (1989). Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse c-fos promoter. *Mol Cell Biol*, **9**, 4272-81.
- Bischof, P., and Campana, A. (2000). A putative role for oncogenes in trophoblast invasion? *Hum Reprod*, **15 Suppl 6**, 51-8.
- Blanchard, J.-M. (1992). Le proto-oncogène c-fos : un "entremetteur" moléculaire. *médecine/sciences*, **8**, 455-470.
- Blanchard, J. M., Piechaczyk, M., Fort, P., Mechti, N., Suarez, H. G., Lebleu, B., and Jeanteur, P. (1988). Complex transcriptional regulation of nuclear proto-oncogenes : existence of a block to elongation in c-myc and c-fos genes. In *Lymphocyte Activation and Differentiation* (Berlin/New York).
- Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H. J., Angulo, J. F., and Herrlich, P. (2000). UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol*, **20**, 3616-25.
- Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G., and Nicolas, J. F. (1987). A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6795-9.
- Bonnieu, A., Rech, J., Jeanteur, P., and Fort, P. (1989). Requirements for c-fos mRNA down regulation in growth stimulated murine cells. *Oncogene*, **4**, 881-8.
- Braun, A. P., and Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*, **57**, 417-45.

- Bravo, R. (1990). Genes induced during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Semin Cancer Biol*, **1**, 37-46.
- Brown, H. J., Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1995). An inhibitor domain in c-Fos regulates activation domains containing the HOB1 motif. *Embo J*, **14**, 124-31.
- Brown, J. R., Nigh, E., Lee, R. J., Ye, H., Thompson, M. A., Saudou, F., Pestell, R. G., and Greenberg, M. E. (1998). Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol*, **18**, 5609-19.
- Brown, J. R., Ye, H., Bronson, R. T., Dikkes, P., and Greenberg, M. E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell*, **86**, 297-309.
- Brown, S. A., Imbalzano, A. N., and Kingston, R. E. (1996). Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev*, **10**, 1479-90.
- Brusselbach, S., Mohle-Steinlein, U., Wang, Z. Q., Schreiber, M., Lucibello, F. C., Muller, R., and Wagner, E. F. (1995). Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene*, **10**, 79-86.
- Cahill, M. A. (1997). c-Fos transrepression revisited. *FEBS Lett*, **400**, 9-10.
- Cahill, M. A., Janknecht, R., and Nordheim, A. (1996). Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol*, **6**, 16-9.
- Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B., and Naranjo, J. R. (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor [see comments]. *Nature*, **398**, 80-4.
- Carrozza, M. L., Jacobs, H., Acton, D., Verma, I., and Berns, A. (1997). Overexpression of the FosB2 gene in thymocytes causes aberrant development of T cells and thymic epithelial cells. *Oncogene*, **14**, 1083-91.
- Caubet, J. F. (1989). c-fos proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development. *Mol Cell Biol*, **9**, 2269-72.
- Cavaille, J., Vitali, P., Basyuk, E., Huttenhofer, A., and Bachellerie, J. P. (2001). A novel brain-specific box C/D small nucleolar RNA processed from tandemly repeated introns of a noncoding RNA gene in rats. *J Biol Chem*, **276**, 26374-83.
- Chen, C. Y., Chen, T. M., and Shyu, A. B. (1994). Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol Cell Biol*, **14**, 416-26.
- Chen, C. Y., Forman, L. W., and Faller, D. V. (1996). Calcium-dependent immediate-early gene induction in lymphocytes is negatively regulated by p21Ha-ras. *Mol Cell Biol*, **16**, 6582-92.
- Chen, F., and Capecchi, M. R. (1999). Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 541-6.
- Chen, R. H., Abate, C., and Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10952-6.

- Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1993). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity [see comments]. *Cell*, **75**, 13-23.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., and Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 855-9.
- Ciapponi, L., Jackson, D. B., Mlodzik, M., and Bohmann, D. (2001). Drosophila Fos mediates ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites. *Genes Dev*, **15**, 1540-53.
- Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J., and Mahadevan, L. C. (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *Embo J*, **19**, 3714-26.
- Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1993). Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Ann N Y Acad Sci*, **696**, 20-30.
- Collart, M. A., Belin, D., Briottet, C., Thorens, B., Vassalli, J. D., and Vassalli, P. (1989). Receptor-mediated phagocytosis by macrophages induces a calcium- dependent transient increase in c-fos transcription. *Oncogene*, **4**, 237-41.
- Collart, M. A., Tourkine, N., Belin, D., Vassalli, P., Jeanteur, P., and Blanchard, J. M. (1991). c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent block to elongation in intron 1. *Mol Cell Biol*, **11**, 2826-31.
- Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1999). Transcription elongation and human disease. *Annu Rev Biochem*, **68**, 301-19.
- Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R. C. (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **25**, 375-80.
- Corneliussen, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A., and Grundstrom, T. (1994). Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*, **368**, 760-4.
- Coulon, V., Veyrune, J. L., Tourkine, N., Vie, A., Hipkind, R. A., and Blanchard, J. M. (1999). A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. *J Biol Chem*, **274**, 30439-46.
- Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem*, **63**, 1045-83.
- Cruzalegui, F. H., Kapiloff, M. S., Morfin, J. P., Kemp, B. E., Rosenfeld, M. G., and Means, A. R. (1992). Regulation of intrasteric inhibition of the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 12127-31.
- Dalgleish, G., Veyrune, J. L., Blanchard, J. M., and Hesketh, J. (2001). mRNA localization by a 145-nucleotide region of the c-fos 3'-untranslated region. Links to translation but not stability. *J Biol Chem*, **276**, 13593-9.
- Dalton, S., and Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*, **68**, 597-612.

Deb, A., Zamanian-Daryoush, M., Xu, Z., Kadereit, S., and Williams, B. R. (2001). Protein kinase PKR is required for platelet-derived growth factor signaling of c-fos gene expression via Erks and Stat3. *Embo J*, **20**, 2487-96.

Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-37.

Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F., and Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol*, **11**, 2804-11.

Dony, C., and Gruss, P. (1987). Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature*, **328**, 711-4.

Dotto, G. P., Gilman, M. Z., Maruyama, M., and Weinberg, R. A. (1986). c-myc and c-fos expression in differentiating mouse primary keratinocytes. *Embo J*, **5**, 2853-7.

Duan, D. R., Pause, A., Burgess, W. H., Aso, T., Chen, D. Y., Garrett, K. P., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Linehan, W. M., and Klausner, R. D. (1995). Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*, **269**, 1402-6.

Dubois, M. F., Bellier, S., Seo, S. J., and Bensaude, O. (1994). Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during heat shock and inhibition of transcription in HeLa cells. *J Cell Physiol*, **158**, 417-26.

Dubois, M. F., Nguyen, V. T., Bellier, S., and Bensaude, O. (1994). Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem*, **269**, 13331-6.

Ducret, C., Maira, S. M., Dierich, A., and Wasylyk, B. (1999). The net repressor is regulated by nuclear export in response to anisomycin, UV, and heat shock. *Mol Cell Biol*, **19**, 7076-87.

Duret, L., and Bucher, P. (1997). Searching for regulatory elements in human noncoding sequences. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 399-406.

Eferl, R., Sibilio, M., Hilberg, F., Fuchsbichler, A., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E. F., and Zatloukal, K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol*, **145**, 1049-61.

Ekstrand, A. J., and Zech, L. (1987). Human c-fos proto-oncogene mapped to chromosome 14, band q24.3-q31. Possibilities for oncogene activation by chromosomal rearrangements in human neoplasms. *Exp Cell Res*, **169**, 262-6.

Enslin, H., and Soderling, T. R. (1994). Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes. *J Biol Chem*, **269**, 20872-7.

Enslin, H., Sun, P., Brickey, D., Soderling, S. H., Klamo, E., and Soderling, T. R. (1994). Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **269**, 15520-7.

Enslin, H., Tokumitsu, H., Stork, P. J., Davis, R. J., and Soderling, T. R. (1996). Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10803-8.

- Field, S. J., Johnson, R. S., Mortensen, R. M., Papaioannou, V. E., Spiegelman, B. M., and Greenberg, M. E. (1992). Growth and differentiation of embryonic stem cells that lack an intact c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9306-10.
- Fisch, T. M., Prywes, R., and Roeder, R. G. (1989). An AP1-binding site in the c-fos gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Mol Cell Biol*, **9**, 1327-31.
- Fisch, T. M., Prywes, R., and Roeder, R. G. (1987). c-fos sequence necessary for basal expression and induction by epidermal growth factor, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate and the calcium ionophore. *Mol Cell Biol*, **7**, 3490-502.
- Fisch, T. M., Prywes, R., Simon, M. C., and Roeder, R. G. (1989). Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev*, **3**, 198-211.
- Fleischmann, A., Hafezi, F., Elliott, C., Reme, C. E., Ruther, U., and Wagner, E. F. (2000). Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev*, **14**, 2695-700.
- Fort, P., Rech, J., Vie, A., Piechaczyk, M., Bonnieu, A., Jeanteur, P., and Blanchard, J. M. (1987). Regulation of c-fos gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nucleic Acids Res*, **15**, 5657-67.
- Funk, M., Poensgen, B., Graulich, W., Jerome, V., and Muller, R. (1997). A novel, transformation-relevant activation domain in Fos proteins. *Mol Cell Biol*, **17**, 537-44.
- Gabellini, N., Facci, L., Milani, D., Negro, A., Callegaro, L., Skaper, S. D., and Leon, A. (1991). Differences in induction of c-fos transcription by cholera toxin-derived cyclic AMP and Ca²⁺ signals in astrocytes and 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res*, **194**, 210-7.
- Gaiddon, C., de Tapia, M., and Loeffler, J. P. (1999). The tissue-specific transcription factor Pit-1/GHF-1 binds to the c-fos serum response element and activates c-fos transcription. *Mol Endocrinol*, **13**, 742-51.
- Gamberi, G., Benassi, M. S., Bohling, T., Ragazzini, P., Molendini, L., Sollazzo, M. R., Pompetti, F., Merli, M., Magagnoli, G., Balladelli, A., and Picci, P. (1998). C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology*, **55**, 556-63.
- Gamby, C., Waage, M. C., Allen, R. G., and Baizer, L. (1996). Analysis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function. *J Biol Chem*, **271**, 26698-705.
- Gauthier-Rouviere, C., Basset, M., Lamb, N. J., and Fernandez, A. (1992). Role of fos-AP-1 binding sequence (FAP) in the induction of c-fos expression by purified C-kinase and in c-fos down-regulation following serum induction. *Oncogene*, **7**, 363-9.
- Gauthier-Rouviere, C., Cavadore, J. C., Blanchard, J. M., Lamb, N. J., and Fernandez, A. (1991). p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period. *Cell Regul*, **2**, 575-88.
- Ghosh, A., and Greenberg, M. E. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, **268**, 239-47.
- Gilman, M. Z., Wilson, R. N., and Weinberg, R. A. (1986). Multiple protein-binding sites in the 5'-flanking region regulate c-fos expression. *Mol Cell Biol*, **6**, 4305-16.

- Gineitis, D., and Treisman, R. (2001). Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. *J Biol Chem*, **276**, 24531-9.
- Ginty, D. D. (1997). Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial? *Neuron*, **18**, 183-6.
- Ginty, D. D., Bonni, A., and Greenberg, M. E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*, **77**, 713-25.
- Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S. M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B. (1994). Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev*, **8**, 1502-13.
- Glover, J. N., and Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, **373**, 257-61.
- Greenberg, M. E., Siegfried, Z., and Ziff, E. B. (1987). Mutation of the c-fos gene dyad symmetry element inhibits serum inducibility of transcription in vivo and the nuclear regulatory factor binding in vitro. *Mol Cell Biol*, **7**, 1217-25.
- Greenberg, M. E., Thompson, M. A., and Sheng, M. (1992). Calcium regulation of immediate early gene transcription. *J Physiol Paris*, **86**, 99-108.
- Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q., and Wagner, E. F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol*, **122**, 685-701.
- Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H. A., and Wagner, E. F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, **266**, 443-8.
- Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., and Wagner, E. F. (1995). Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet*, **11**, 436-41.
- Grosset, C., Chen, C. Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., and Shyu, A. B. (2000). A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell*, **103**, 29-40.
- Gruda, M. C., van Amsterdam, J., Rizzo, C. A., Durham, S. K., Lira, S., and Bravo, R. (1996). Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. *Oncogene*, **12**, 2177-85.
- Guo, S., Yamaguchi, Y., Schilbach, S., Wada, T., Lee, J., Goddard, A., French, D., Handa, H., and Rosenthal, A. (2000). A regulator of transcriptional elongation controls vertebrate neuronal development. *Nature*, **408**, 366-9.
- Hafezi, F., Steinbach, J. P., Marti, A., Munz, K., Wang, Z. Q., Wagner, E. F., Aguzzi, A., and Reme, C. E. (1997). The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med*, **3**, 346-9.
- Hai, T., and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3720-4.
- Hardingham, G. E., Chawla, S., Johnson, C. M., and Bading, H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, **385**, 260-5.
- Hayes, T. E., Kitchen, A. M., and Cochran, B. H. (1987). Inducible binding of a factor to the c-fos regulatory region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1272-6.

- Herrera, R. E., Nordheim, A., and Stewart, A. F. (1997). Chromatin structure analysis of the human c-fos promoter reveals a centrally positioned nucleosome. *Chromosoma*, **106**, 284-92.
- Herrera, R. E., Shaw, P. E., and Nordheim, A. (1989). Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature*, **340**, 68-70.
- Herrlich, P. (2001). Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene*, **20**, 2465-75.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, **7**, 2135-48.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., and Wagner, E. F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*, **365**, 179-81.
- Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, **81**, 1159-70.
- Hipskind, R. A., Baccharini, M., and Nordheim, A. (1994). Transient activation of RAF-1, MEK, and ERK2 coincides kinetically with ternary complex factor phosphorylation and immediate-early gene promoter activity in vivo. *Mol Cell Biol*, **14**, 6219-31.
- Hipskind, R. A., Rao, V. N., Mueller, C. G., Reddy, E. S., and Nordheim, A. (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature*, **354**, 531-4.
- Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, V. E., Johnson, R., and Spiegelman, B. M. (1994). Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *Embo J*, **13**, 3094-103.
- Janknecht, R. (1995). Regulation of the c-fos promoter. *Immunobiology*, **193**, 137-42.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., and Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *Embo J*, **12**, 5097-104.
- Jenuwein, T., and Muller, R. (1987). Structure-function analysis of fos protein: a single amino acid change activates the immortalizing potential of v-fos. *Cell*, **48**, 647-57.
- Jochum, W., David, J. P., Elliott, C., Wutz, A., Plenk, H., Jr., Matsuo, K., and Wagner, E. F. (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med*, **6**, 980-4.
- Jochum, W., Passegue, E., and Wagner, E. F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, **20**, 2401-12.
- Johnson, C. M., Hill, C. S., Chawla, S., Treisman, R., and Bading, H. (1997). Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci*, **17**, 6189-202.
- Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D., and Wisdom, R. (1996). Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol*, **16**, 4504-11.
- Johnson, R. S., Spiegelman, B. M., and Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell*, **71**, 577-86.

- Johnson, R. S., van Lingen, B., Papaioannou, V. E., and Spiegelman, B. M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev*, **7**, 1309-17.
- Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W. G., Jr., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1998). The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev*, **12**, 3872-81.
- Karsenty, G. (1999). The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, **13**, 3037-51.
- Kerppola, T. K., and Curran, T. (1991). Fos-Jun heterodimers and Jun homodimers bend DNA in opposite orientations: implications for transcription factor cooperativity. *Cell*, **66**, 317-26.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J. A., and Kaelin, W. G., Jr. (1995). Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science*, **269**, 1444-6.
- Kockel, L., Homsy, J. G., and Bohmann, D. (2001). Drosophila AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene*, **20**, 2347-64.
- Kondo, K., and Kaelin, W. G., Jr. (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*, **264**, 117-25.
- Kovacs, E. J., Oppenheim, J. J., and Young, H. A. (1986). Induction of c-fos and c-myc expression in T lymphocytes after treatment with recombinant interleukin 1-alpha. *J Immunol*, **137**, 3649-51.
- Kovary, K., and Bravo, R. (1991). The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **11**, 4466-72.
- Krauskopf, A., Ben-Asher, E., and Aloni, Y. (1994). Minute virus of mice infection modifies cellular transcription elongation. *J Virol*, **68**, 2741-5.
- Krebs, J., and Honegger, P. (1996). Calmodulin kinase IV: expression and function during rat brain development. *Biochim Biophys Acta*, **1313**, 217-22.
- Krosl, J., and Sauvageau, G. (2000). AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. *Oncogene*, **19**, 5134-41.
- Lamb, N. J., Fernandez, A., Tourkine, N., Jeanteur, P., and Blanchard, J. M. (1990). Demonstration in living cells of an intragenic negative regulatory element within the rodent c-fos gene. *Cell*, **61**, 485-96.
- Lange, C. M., and Bading, H. (2001). The role of putative intragenic control elements in c-fos regulation by calcium and growth factor signalling pathways. *J Neurochem*, **77**, 1293-300.
- Lau, L. F., and Nathans, D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1182-6.
- Lee, G., and Gilman, M. (1994). Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 4579-87.
- Lee, J. M., and Greenleaf, A. L. (1997). Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I. *J Biol Chem*, **272**, 10990-3.
- Lee, S. K., Kim, H. J., Na, S. Y., Kim, T. S., Choi, H. S., Im, S. Y., and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, **273**, 16651-4.

- Lee, S. K., Kim, J. H., Lee, Y. C., Cheong, J., and Lee, J. W. (2000). Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J Biol Chem*, **275**, 12470-4.
- Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *Embo J*, **18**, 420-32.
- Li, S. L., Godson, C., Roche, E., Zhao, S. J., Prentki, M., and Schlegel, W. (1994). Induction of c-fos in pituitary cells by thyrotrophin-releasing hormone and phorbol 12-myristate 13-acetate depends upon Ca²⁺ influx. *J Mol Endocrinol*, **13**, 303-12.
- Lis, J. T., Mason, P., Peng, J., Price, D. H., and Werner, J. (2000). P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev*, **14**, 792-803.
- Liu, Y. C., and Storm, D. R. (1990). Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 107-11.
- Lucibello, F. C., Ehlert, F., and Muller, R. (1991). Multiple interdependent regulatory sites in the mouse c-fos promoter determine basal level transcription: cell type-specific effects. *Nucleic Acids Res*, **19**, 3583-91.
- Lucibello, F. C., Lowag, C., Neuberg, M., and Muller, R. (1989). trans-repression of the mouse c-fos promoter: a novel mechanism of Fos-mediated trans-regulation. *Cell*, **59**, 999-1007.
- Lucibello, F. C., Slater, E. P., Jooss, K. U., Beato, M., and Muller, R. (1990). Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *Embo J*, **9**, 2827-34.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, **20**, 2476-89.
- Mahadevan, L. C., Willis, A. C., and Barratt, M. J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, **65**, 775-83.
- Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., and Flores, O. (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev*, **11**, 2633-44.
- Marx, J. L. (1987). The fos gene as a master switch. *Science*, **237**, 854-6.
- Matsuo, K., Owens, J. M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T. J., and Wagner, E. F. (2000). Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet*, **24**, 184-7.
- Matthews, R. P., Guthrie, C. R., Wailes, L. M., Zhao, X., Means, A. R., and McKnight, G. S. (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol*, **14**, 6107-16.
- McBride, K., and Nemer, M. (1998). The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol Cell Biol*, **18**, 5073-81.
- McHenry, J. Z., Leon, A., Matthaei, K. I., and Cohen, D. R. (1998). Overexpression of fra-2 in transgenic mice perturbs normal eye development. *Oncogene*, **17**, 1131-40.

- Mechti, N., Piechaczyk, M., Blanchard, J. M., Jeanteur, P., and Lebleu, B. (1991). Sequence requirements for premature transcription arrest within the first intron of the mouse c-fos gene. *Mol Cell Biol*, **11**, 2832-41.
- Meijlink, F., Curran, T., Miller, A. D., and Verma, I. M. (1985). Removal of a 67-base-pair sequence in the noncoding region of protooncogene fos converts it to a transforming gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4987-91.
- Metivier, C., Piu, F., Pfarr, C. M., Yaniv, M., Loiseau, L., and Castellazzi, M. (1993). In vitro transforming capacities of mouse c-jun:junD chimeric genes. *Oncogene*, **8**, 2311-5.
- Metz, R., Bannister, A. J., Sutherland, J. A., Hagemeyer, C., O'Rourke, E. C., Cook, A., Bravo, R., and Kouzarides, T. (1994). c-Fos-induced activation of a TATA-box-containing promoter involves direct contact with TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol*, **14**, 6021-9.
- Miao, G. G., and Curran, T. (1994). Cell transformation by c-fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **14**, 4295-310.
- Miller, A. D., Curran, T., and Verma, I. M. (1984). c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell*, **36**, 51-60.
- Miller, H., Asselin, C., Dufort, D., Yang, J. Q., Gupta, K., Marcu, K. B., and Nepveu, A. (1989). A cis-acting element in the promoter region of the murine c-myc gene is necessary for transcriptional block. *Mol Cell Biol*, **9**, 5340-9.
- Miranti, C. K., Ginty, D. D., Huang, G., Chatila, T., and Greenberg, M. E. (1995). Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol*, **15**, 3672-84.
- Misra, R. P., Bonni, A., Miranti, C. K., Rivera, V. M., Sheng, M., and Greenberg, M. E. (1994). L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem*, **269**, 25483-93.
- Molina, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*, **75**, 875-86.
- Montminy, M. R., and Bilezikjian, L. M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, **328**, 175-8.
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, **237**, 192-7.
- Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, **312**, 716-20.
- Muller, R., Tremblay, J. M., Adamson, E. D., and Verma, I. M. (1983). Tissue and cell type-specific expression of two human c-onc genes. *Nature*, **304**, 454-6.
- Muller, R., Verma, I. M., and Adamson, E. D. (1983). Expression of c-onc genes: c-fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *Embo J*, **2**, 679-84.
- Murphy, D. J., Hardy, S., and Engel, D. A. (1999). Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol Cell Biol*, **19**, 2724-33.

- Natesan, S., and Gilman, M. (1995). YY1 facilitates the association of serum response factor with the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol*, **15**, 5975-82.
- Neuberg, M., Schuermann, M., and Muller, R. (1991). Mutagenesis of the DNA contact site in Fos protein: compatibility with the scissors grip model and requirement for transformation. *Oncogene*, **6**, 1325-33.
- Ng, K. W., Ridgway, P., Cohen, D. R., and Tremethick, D. J. (1997). The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *Embo J*, **16**, 2072-85.
- Nichols, M., Weih, F., Schmid, W., DeVack, C., Kowenz-Leutz, E., Luckow, B., Boshart, M., and Schutz, G. (1992). Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *Embo J*, **11**, 3337-46.
- Nudler, E. (1999). Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *J Mol Biol*, **288**, 1-12.
- O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A., and Lis, J. T. (1994). Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature*, **370**, 75-7.
- Okada, S., Wang, Z. Q., Grigoriadis, A. E., Wagner, E. F., and von Ruden, T. (1994). Mice lacking c-fos have normal hematopoietic stem cells but exhibit altered B-cell differentiation due to an impaired bone marrow environment. *Mol Cell Biol*, **14**, 382-90.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, **92**, 105-16.
- Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, **400**, 284-8.
- Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*, **3**, 109-18.
- Panterne, B., Hatzfeld, J., Blanchard, J. M., Levesque, J. P., Berthier, R., Ginsbourg, M., and Hatzfeld, A. (1992). c-fos mRNA constitutive expression by mature human megakaryocytes. *Oncogene*, **7**, 2341-4.
- Paylor, R., Johnson, R. S., Papaioannou, V., Spiegelman, B. M., and Wehner, J. M. (1994). Behavioral assessment of c-fos mutant mice. *Brain Res*, **651**, 275-82.
- Philips, A., Chambeyron, S., Lamb, N., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1999). CHF: a novel factor binding to cyclin A CHR corepressor element. *Oncogene*, **18**, 6222-32.
- Piechaczyk, M., and Blanchard, J. M. (1994). c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol*, **17**, 93-131.
- Pinaud, S., and Mirkovitch, J. (1998). Regulation of c-fos expression by RNA polymerase elongation competence. *J Mol Biol*, **280**, 785-98.
- Plet, A., Eick, D., and Blanchard, J. M. (1995). Elongation and premature termination of transcripts initiated from c-fos and c-myc promoters show dissimilar patterns. *Oncogene*, **10**, 319-28.

- Plet, A., Huet, X., Algarte, M., Rech, J., Imbert, J., Philips, A., and Blanchard, J. M. (1997). Relief of cyclin A gene transcriptional inhibition during activation of human primary T lymphocytes via CD2 and CD28 adhesion molecules. *Oncogene*, **14**, 2575-83.
- Poser, S., Impey, S., Trinh, K., Xia, Z., and Storm, D. R. (2000). SRF-dependent gene expression is required for PI3-kinase-regulated cell proliferation. *Embo J*, **19**, 4955-66.
- Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **20**, 2629-34.
- Rahmsdorf, H. J., Schonthal, A., Angel, P., Litfin, M., Ruther, U., and Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res*, **15**, 1643-59.
- Ran, W., Dean, M., Levine, R. A., Henkle, C., and Campisi, J. (1986). Induction of c-fos and c-myc mRNA by epidermal growth factor or calcium ionophore is cAMP dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8216-20.
- Rane, S. G., and Reddy, E. P. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*, **19**, 5662-79.
- Ransone, L. J., Wamsley, P., Morley, K. L., and Verma, I. M. (1990). Domain swapping reveals the modular nature of Fos, Jun, and CREB proteins. *Mol Cell Biol*, **10**, 4565-73.
- Rech, J., and Fort, P. (1989). Versatile vectors for pulsed expression in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2874.
- Renz, M., Neuberger, M., Kurz, C., Bravo, R., and Muller, R. (1985). Regulation of c-fos transcription in mouse fibroblasts: identification of DNase I-hypersensitive sites and regulatory upstream sequences. *Embo J*, **4**, 3711-6.
- Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron*, **14**, 241-52.
- Roux, P., Blanchard, J. M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P., and Piechaczyk, M. (1990). Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell*, **63**, 341-51.
- Ruther, U., Garber, C., Komitowski, D., Muller, R., and Wagner, E. F. (1987). Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature*, **325**, 412-6.
- Ruther, U., Komitowski, D., Schubert, F. R., and Wagner, E. F. (1989). c-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene*, **4**, 861-5.
- Ruther, U., Muller, W., Sumida, T., Tokuhisa, T., Rajewsky, K., and Wagner, E. F. (1988). c-fos expression interferes with thymus development in transgenic mice. *Cell*, **53**, 847-56.
- Ruther, U., Wagner, E. F., and Muller, R. (1985). Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells. *Embo J*, **4**, 1775-81.
- Ryser, S., Tortola, S., van Haasteren, G., Muda, M., Li, S., and Schlegel, W. (2001). MAP kinase phosphatase-1 gene transcription in rat neuroendocrine cells is modulated by a calcium-sensitive block to elongation in the first exon. *J Biol Chem*, **22**, 22.

Sabatatos, G., Sims, N. A., Chen, J., Aoki, K., Kelz, M. B., Amling, M., Bouali, Y., Mukhopadhyay, K., Ford, K., Nestler, E. J., and Baron, R. (2000). Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med*, **6**, 985-90.

Sadoshima, J., and Izumo, S. (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *Embo J*, **12**, 1681-92.

Saez, E., Rutberg, S. E., Mueller, E., Oppenheim, H., Smoluk, J., Yuspa, S. H., and Spiegelman, B. M. (1995). c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*, **82**, 721-32.

Salvat, C., Jariel-Encontre, I., Acquaviva, C., Omura, S., and Piechaczyk, M. (1998). Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts. *Oncogene*, **17**, 327-37.

Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., and Allis, C. D. (1999). Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, **285**, 886-91.

Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., and Verma, I. M. (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*, **334**, 314-9.

Sassone-Corsi, P., Visvader, J., Ferland, L., Mellon, P. L., and Verma, I. M. (1988). Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev*, **2**, 1529-38.

Schild-Poulter, C., Sassone-Corsi, P., Granger-Schnarr, M., and Schnarr, M. (1996). Nucleosome assembly on the human c-fos promoter interferes with transcription factor binding. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4751-8.

Schorpp, M., Jager, R., Schellander, K., Schenkel, J., Wagner, E. F., Weiher, H., and Angel, P. (1996). The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1787-8.

Schorpp-Kistner, M., Wang, Z. Q., Angel, P., and Wagner, E. F. (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J*, **18**, 934-48.

Schratt, G., Weinhold, B., Lundberg, A. S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., Weinberg, R. A., Ruther, U., and Nordheim, A. (2001). Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 2933-43.

Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P., and Wagner, E. F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *Embo J*, **14**, 5338-49.

Schreiber, M., Wang, Z. Q., Jochum, W., Fetka, I., Elliott, C., and Wagner, E. F. (2000). Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development*, **127**, 4937-48.

Schuermann, M., Neuberg, M., Hunter, J. B., Jenuwein, T., Ryseck, R. P., Bravo, R., and Muller, R. (1989). The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell*, **56**, 507-16.

Selby, C. P., and Sancar, A. (1997). Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11205-9.

Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-400.

- Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G., and Greenberg, M. E. (1988). Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol Cell Biol*, **8**, 2787-96.
- Sheng, M., and Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, **4**, 477-85.
- Sheng, M., McFadden, G., and Greenberg, M. E. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*, **4**, 571-82.
- Sheng, M., Thompson, M. A., and Greenberg, M. E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, **252**, 1427-30.
- Shilatifard, A., Lane, W. S., Jackson, K. W., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science*, **271**, 1873-6.
- Shyu, A. B., Greenberg, M. E., and Belasco, J. G. (1989). The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev*, **3**, 60-72.
- Smeyne, R. J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T., and Morgan, J. I. (1992). fos-lacZ transgenic mice: mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron*, **8**, 13-23.
- Smeyne, R. J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S. J., Miao, G. G., Schilling, K., Robertson, L. M., Curran, T., and Morgan, J. I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*, **363**, 166-9.
- Sobczak, J., Mechti, N., Tournier, M. F., Blanchard, J. M., and Duguet, M. (1989). c-myc and c-fos gene regulation during mouse liver regeneration. *Oncogene*, **4**, 1503-8.
- Spencer, C. A., LeStrange, R. C., Novak, U., Hayward, W. S., and Groudine, M. (1990). The block to transcription elongation is promoter dependent in normal and Burkitt's lymphoma c-myc alleles. *Genes Dev*, **4**, 75-88.
- Stehle, J. H., Foulkes, N. S., Molina, C. A., Simonneaux, V., Pevet, P., and Sassone-Corsi, P. (1993). Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, **365**, 314-20.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-5.
- Sun, P., Enslen, H., Myung, P. S., and Maurer, R. A. (1994). Differential activation of CREB by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*, **8**, 2527-39.
- Susini, S., Van Haasteren, G., Li, S., Prentki, M., and Schlegel, W. (2000). Essentiality of intron control in the induction of c-fos by glucose and glucocorticoid peptides in INS-1 beta-cells. *Faseb J*, **14**, 128-36.
- Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1992). Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev*, **6**, 1810-9.

Thepot, D., Weitzman, J. B., Barra, J., Segretain, D., Stinnakre, M. G., Babinet, C., and Yaniv, M. (2000). Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development*, **127**, 143-53.

Thirman, M. J., Levitan, D. A., Kobayashi, H., Simon, M. C., and Rowley, J. D. (1994). Cloning of ELL, a gene that fuses to MLL in a t(11;19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12110-4.

Thompson, M. A., Ginty, D. D., Bonni, A., and Greenberg, M. E. (1995). L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *J Biol Chem*, **270**, 4224-35.

Thomson, S., Clayton, A. L., Hazzalin, C. A., Rose, S., Barratt, M. J., and Mahadevan, L. C. (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J*, **18**, 4779-93.

Tian, J. H., Wang, X. M., and Han, J. S. (1996). [Transcriptional regulation by CREB and proteins of CREB family]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **27**, 227-32.

Tratner, I., and Verma, I. M. (1991). Identification of a nuclear targeting sequence in the Fos protein. *Oncogene*, **6**, 2049-53.

Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*, **46**, 567-74.

Treisman, R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *Embo J*, **14**, 4905-13.

Treisman, R. (1985). Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell*, **42**, 889-902.

Trouche, D., Grigoriev, M., Lenormand, J. L., Robin, P., Leibovitch, S. A., Sassone-Corsi, P., and Harel-Bellan, A. (1993). Repression of c-fos promoter by MyoD on muscle cell differentiation. *Nature*, **363**, 79-82.

Uptain, S. M., Kane, C. M., and Chamberlin, M. J. (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*, **66**, 117-72.

Velcich, A., and Ziff, E. B. (1990). Functional analysis of an isolated fos promoter element with AP-1 site homology reveals cell type-specific transcriptional properties. *Mol Cell Biol*, **10**, 6273-82.

Veyrune, J. L., Carillo, S., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1995). c-fos mRNA instability determinants present within both the coding and the 3' non coding region link the degradation of this mRNA to its translation. *Oncogene*, **11**, 2127-34.

Veyrune, J. L., Hesketh, J., and Blanchard, J. M. (1997). 3' untranslated regions of c-myc and c-fos mRNAs: multifunctional elements regulating mRNA translation, degradation and subcellular localization. *Prog Mol Subcell Biol*, **18**, 35-63.

Visvader, J., Sassone-Corsi, P., and Verma, I. M. (1988). Two adjacent promoter elements mediate nerve growth factor activation of the c-fos gene and bind distinct nuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9474-8.

Wada, T., Orphanides, G., Hasegawa, J., Kim, D. K., Shima, D., Yamaguchi, Y., Fukuda, A., Hisatake, K., Oh, S., Reinberg, D., and Handa, H. (2000). FACT relieves DSIF/NELF-mediated

inhibition of transcriptional elongation and reveals functional differences between P-TEFb and TFIIF. *Mol Cell*, **5**, 1067-72.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S., and Handa, H. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev*, **12**, 343-56.

Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., and Cochran, B. H. (1990). The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *Embo J*, **9**, 4477-84.

Wang, H., Rodgers, W. H., Chmell, M. J., Svitek, C., and Schwartz, H. S. (1995). Osteosarcoma oncogene expression detected by in situ hybridization. *J Orthop Res*, **13**, 671-8.

Wang, Y., and Simonson, M. S. (1996). Voltage-insensitive Ca²⁺ channels and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases propagate signals from endothelin-1 receptors to the c-fos promoter. *Mol Cell Biol*, **16**, 5915-23.

Wang, Z. Q., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., and Wagner, E. F. (1991). A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *Embo J*, **10**, 2437-50.

Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U., and Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*, **360**, 741-5.

Watanabe, Y., Johnson, R. S., Butler, L. S., Binder, D. K., Spiegelman, B. M., Papaioannou, V. E., and McNamara, J. O. (1996). Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci*, **16**, 3827-36.

Werlen, G., Belin, D., Conne, B., Roche, E., Lew, D. P., and Prentki, M. (1993). Intracellular Ca²⁺ and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*, **268**, 16596-601.

Wilson, T., and Treisman, R. (1988). Fos C-terminal mutations block down-regulation of c-fos transcription following serum stimulation. *Embo J*, **7**, 4193-202.

Wilson, T., and Treisman, R. (1988). Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature*, **336**, 396-9.

Wind, M., and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *Bioessays*, **22**, 327-36.

Winkler, G. S., Petrakis, T. G., Ethelberg, S., Tokunaga, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2001). RNA Polymerase II Elongator Holoenzyme Is Composed of Two Discrete Subcomplexes. *J Biol Chem*, **276**, 32743-32749.

Wisdom, R., Johnson, R. S., and Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J*, **18**, 188-97.

Wisdom, R., and Verma, I. M. (1993). Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation. *Mol Cell Biol*, **13**, 2635-43.

Wittschieben, B. O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C. D., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*, **4**, 123-8.

- Wu, J. X., Carpenter, P. M., Gresens, C., Keh, R., Niman, H., Morris, J. W., and Mercola, D. (1990). The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene*, **5**, 989-1000.
- Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K., and Greenberg, M. E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci*, **16**, 5425-36.
- Xing, J., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, **273**, 959-63.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41-51.
- Yankulov, K., and Bentley, D. (1998). Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation. *Curr Biol*, **8**, R447-9.
- Yankulov, K., Blau, J., Purton, T., Roberts, S., and Bentley, D. L. (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell*, **77**, 749-59.
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, **276**, 1268-72.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B., and Price, D. H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev*, **11**, 2622-32.

ANNEXES

ANNEXE I

Publication n°3 :

Differential effect of Rac and Cdc42 on p38 kinase activity and cell cycle progression of nonadherent primary mouse fibroblasts. Philips A, Roux P, Coulon V, Bellanger JM, Vie A, Vignais ML, Blanchard JM. J Biol Chem. 2000 Feb 25;275(8):5911-7.

Differential Effect of Rac and Cdc42 on p38 Kinase Activity and Cell Cycle Progression of Nonadherent Primary Mouse Fibroblasts*

(Received for publication, October 18, 1999)

Alexandre Philips^{‡§}, Pierre Roux[¶], Vincent Coulon[‡], Jean-Michel Bellanger[¶], Annick Vié[‡], Marie-Luce Vignais[‡], and Jean Marie Blanchard[‡]

From the [‡]Institut de Génétique Moléculaire, CNRS, UMR 5535, IFR 24, and the [¶]Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, CNRS, UPR 1086, IFR 24, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

The Rho GTPases play an important role in transducing signals linking plasma membrane receptors to the organization of the cytoskeleton and also regulate gene transcription. Here, we show that expression of constitutively active Ras or Cdc42, but not RhoA, RhoG, and Rac1, is sufficient to cause anchorage-independent cell cycle progression of mouse embryonic fibroblasts. However, in anchorage free conditions, whereas activation of either Cdc42 or Ras results in cyclin A transcription and cell cycle progression, Cdc42 is not required for Ras-mediated cyclin A induction, and the two proteins act in a synergistic manner in this process. Surprisingly, the ability of Cdc42 to induce p38 MAPK activity in suspended mouse embryonic fibroblast was impaired. Moreover, inhibition of p38 activity allowed Rac1 to induce anchorage-independent cyclin A transcription, indicating that p38 MAPK has an inhibitory function on cell cycle progression of primary fibroblasts. Finally, a Rac mutant, which is unable to induce lamellipodia and focal complex formation, promoted cyclin A transcription in the presence of SB203580, suggesting that the organization of the cytoskeleton is not required for anchorage-independent proliferation. This demonstrates a novel function for Cdc42, distinct from that of Rac1, in the control of cell proliferation.

The mechanisms by which anchorage-mediated cues are integrated at the level of the cell division cycle remain elusive. Constitutively active Ras mutants are frequently detected in human tumors and expression of mutated, oncogenic Ras in cultured rodent fibroblast cell lines induces alterations in cell morphology, loss of contact inhibition, changes in gene expression, decreased dependence on serum growth factors, and proliferation which is independent of adhesion to a substratum. Data accumulated during the past decade have shown that many of these Ras-promoted cellular transactions are mediated by Ras effectors, among which Rho family members play an important role, linking plasma membrane receptors to the organization of the actin cytoskeleton, cell adhesion, aggregation, motility, and proliferation (3).

The Rho family of small GTPases include various isoforms of Rac (1–3), Rho (A, B, C), RhoD, RhoE, RhoL, RhoH, RhoG, TC10, and Cdc42Hs. Like Ras, these GTPases oscillate between an active GTP-bound and inactive GDP-bound forms (4).

* This work was supported in part by grants from the BIOMED2 program, ARC, and the Ligue Nationale Contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by a contract from the BIOMED2 program and INSERM. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-67-61-36-49; Fax: 33-4-67-04-02-31; E-mail: philips@igm.cnrs-mop.fr.

Transient binding of guanine nucleotides is controlled by guanine nucleotide exchange factors, GTPase-activating proteins, and GDP dissociation inhibitory factors (5–7). In fibroblasts, Rho regulates the formation of focal adhesions and stress fibers, Rac mediates membrane ruffles and lamellipodia, and Cdc42Hs controls the formation of filopodia (8–11). Furthermore, Rac1 and Cdc42Hs have been shown to modulate the activity of the Jun N-terminal kinase (JNK)¹ and p38 stress-activated protein kinase signaling pathways (12, 13).

It has now become evident that Rho family proteins, in addition to regulating the organization of the actin cytoskeleton, play an important role in the control of cell proliferation (14, 15). RhoA, Rac1, and Cdc42 have been implicated in the regulation of transcription (16, 17) and DNA synthesis (14). Expression of activated forms of RhoA and Rac can transform fibroblasts and is essential for the establishment of a fully transformed phenotype following Ras activation (18–21). While these results suggest that RhoA and Rac may act downstream of Ras in the control of cell proliferation, the role of Cdc42Hs in this respect still remains unclear. Expression of an activated form of Cdc42 induces progression of adherent quiescent fibroblasts into S phase (14). However, Cdc42Hs has also been shown to inhibit cell cycle progression through a mechanism requiring p38 activation in NIH 3T3 cells (22). Cdc42Hs has also been implicated in the control of anchorage-independent growth (23). Indeed, the ability of Ras expressing fibroblastic cell lines to proliferate in soft agar depends on Cdc42 activity (23). However, the mechanisms of anchorage-independent growth control, modulated by Cdc42 and Ras are unknown. Extracellular signal response kinase (ERK) activation is not a limiting factor in this response (24), but a potential implication of the JNK/p38 stress-activated protein kinase signaling pathways remain to be established.

Most studies of the mechanisms underlying the control of anchorage-independent cell proliferation have been conducted on immortal or transformed cell lines in which many regulatory loops are altered as a consequence of the adaptation of the cells to *in vitro* culture. Alteration of these checkpoints might thus explain the existence of many apparent cell type-specific differences. Another important source of variability stems from the various experimental settings used for the study of anchorage-proliferation relationships. The ability of cells to form colonies within soft agar does not necessarily correlate with their ability to proliferate under other anchorage-free conditions, such as in liquid suspension on agar-coated dishes (24). Here, we have evaluated the role and putative interplay between Ras, RhoA, RhoG, Rac1, and Cdc42 on anchorage-independent

¹ The abbreviations used are: JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEF, mouse embryonic fibroblasts; BrdUrd, bromodeoxyuridine; MAPK, mitogen-activated protein kinase; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; HA, hemagglutinin.

proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts (MEF) in liquid medium.

Expression of cyclin A is required for fibroblast proliferation. Through its association with cyclin-dependent protein kinases *cdc2/cdk1* and *cdk2*, cyclin A controls the normal progression through the S phase and the G₂/M transition. Even in the presence of growth factors, fibroblasts cultured without substratum contact fail to express cyclin A and, as a consequence, do not enter S phase. However, this situation can be overcome by ectopic expression of cyclin A. Since cyclin A expression is a marker of cell competence for proliferation, we assessed the role of the Rho GTPases in mediating proliferation in the absence of adhesion, through activation of cyclin A transcriptional activity. In the experiments reported here, we show that the anchorage requirement for cyclin A expression and subsequent cell cycle progression of MEF are alleviated by ectopic expression of the activated forms of either Ras or Cdc42, but not by Rac1, RhoA, or RhoG. Anchorage-independent proliferation is promoted by a synergy between Ras and Cdc42, thereby delineating two distinct signaling pathways. Finally, the level of p38 kinase activity seems to be a key regulator of anchorage-independent proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Transient Transfection Experiments—Early primary MEF were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cells were transfected using the calcium phosphate procedure, cultured for 24 h in the presence of serum on agar-coated dishes, and processed for luciferase activity as described previously (1). Normalization was performed using the dual-luciferase reporter assay system from Promega. When required, cells were analyzed according to their DNA content with a FACScan (Becton Dickinson) after labeling with propidium iodide. The following plasmids were used: pCycA-luc is a pGL2-Basic vector containing murine cyclin A promoter sequences spanning nucleotides -177 to +100 relative to the 3' most transcription initiation site; pDCR-Ras (Val-12) is pDCR-based vector containing the Ras mutant under the control of the early cytomegalovirus promoter (gift from M. White); Myc epitope-tagged Rac-1, Cdc42Hs, RhoA, and their various mutants were obtained from Ph. Chavrier and expressed in pcDNA3. Expression vectors for wild type HA-tagged JNK1 (pSR α 3HA.JNK1), its dominant negative form (pcDNA3-HA-JNK1-APF), and wild type HA-ERK2 (pECE-HA-p44 MAPK) were gifts from A. Debant and B. Derjard. Wild type HA-p38 MAPK and its dominant negative form, HA-p38 MAPK-TA-YF, were expressed in a PECE-based expression vector (gift from A. Brunet). pCMV-WASP-GBD was constructed by insertion of an *EcoRI*-*XhoI* fragment of pGEX-KG-WASP (gift from A. Hall) into the same sites of pMYCS1 (gift from C. Sardet). As a result, the Cdc42-interacting domain of WASP extending from amino acid 201 to 321, is cloned in-frame with an upstream Myc-tag located between the *NcoI* and *EcoRI* sites of pcDNA3. 5 μ g of total DNA was used for 10⁵ cells per 3.5-cm diameter Petri dishes (0.5 μ g of pCycA-luc, 0.1 μ g of pRL-TK, expression vector as indicated in each figure legend and pBluescript SKII⁺ for a total amount of 5 μ g). To label cells with BrdUrd, MEF were cultured during 12 h in suspension and BrdUrd was then added for an additional 12 h. Cells were collected and fixed on glass slides before BrdUrd staining was monitored.

Protein Analysis and MAP Kinase Assays—After co-transfection of vectors expressing the various tagged MAP kinases and the small GTPases together with pCycA-luc, MEF were cultured for 24 h in the absence of adhesion. Cells were then lysed in Triton lysis buffer (TLB) containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/ml leupeptine as described (2). Soluble extracts were prepared by centrifugation at 15,000 rpm for 30 min at 4 °C and split into two fractions. The first one was used to test the expression of the tagged proteins, and the second to assay for ERK2, JNK1, or p38 activities. Extracts were incubated with 5 μ l of the 12CA5 anti-HA monoclonal antibody pre-bound to 20 μ l of protein-Sepharose G (Amesham Pharmacia Biotech). After a 2-h incubation at 4 °C, immunoprecipitates were washed three times with TLB and twice with kinase buffer containing 25 mM Hepes (pH 7.5), 25 mM MgCl₂, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol, and 0.1 mM Na₃VO₄. Immunocomplex kinase assays were performed at 30 °C for 30

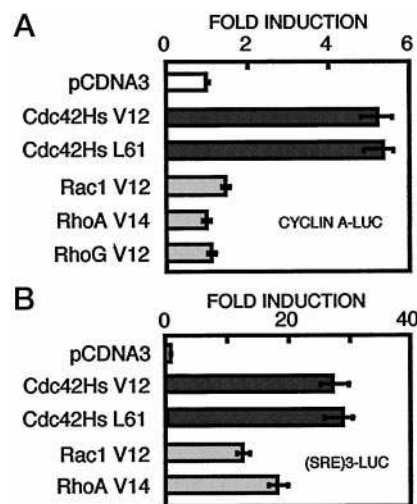


FIG. 1. Only activated Cdc42Hs (Val-12) or Cdc42Hs (Leu-61) and not Rac1 (Val-12), RhoA (Val-14) nor RhoG (Val-12) induce an anchorage-independent expression of a cyclin A reporter in MEF. Fibroblasts were transiently transfected while adherent with the indicated activated GTPase expressing vectors in combination with a Firefly luciferase reporter driven by either cyclin A promoter (A) or by serum responsive element (B), together with a cytomegalovirus-driven Renilla luciferase standard reporter. Cells were then replated on agar-coated dishes for 24 h, luciferase activities determined, and Firefly luciferase activity expressed relative to that of Renilla luciferase.

min in the presence of 50 μ M ATP and 2 μ Ci of [γ -³²P]ATP in 20 μ l of kinase buffer using 4 μ g of myelin basic protein (Sigma), GST-cJun (amino acids 1–79), and GST-ATF2 (amino acids 1–110) as substrates for ERK2, JNK1, and p38 kinase activities, respectively. Reactions were stopped with Laemmli sample buffer and the products resolved by gel electrophoresis through 10% (JNK1 and p38) or 15% (ERK2) polyacrylamide SDS-containing gels. Dried gels were exposed on imaging plates for 1 h, and signals were quantified with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). Western blot analysis were carried out on total cellular extracts after transfer onto nitrocellulose filters, and ECL detection was performed with the following primary antibodies: cyclin A CY-A1, Myc 9E10 (Sigma), and HA12CA5 (Cold Spring Harbor Laboratory) mouse monoclonals, as well as an anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polyclonal rabbit IgG (1).

RESULTS

Activation of the Cdc42Hs-mediated Pathway Promotes Anchorage-independent Cyclin A Expression and S-phase Entry of Nonadherent MEF—Fibroblasts lacking contact with the extracellular matrix are arrested in the G₁ phase of the cell cycle, as can be judged by most of the cells having a 2N DNA content and expressing cyclin D1 to a high level (data not shown) (25). It is well established that Rho family proteins play an essential role both in organizing the actin cytoskeleton (26) and in promoting cell cycle progression in adherent cells (14). We have investigated the effects of four Rho family members (RhoA, RhoG, Rac1, and Cdc42Hs) on cyclin A expression and S phase entry of nonadherent fibroblasts. The activated Myc-tagged mutants of the GTPases were co-expressed in transient transfection experiments with a transfected cyclin A promoter-driven luciferase reporter (pCycA-luc). In nonadherent MEFs, a constitutively activated form of Cdc42Hs (Cdc42Hs (Val-12) or Cdc42Hs (Leu-61)) activated pCycA-luc (Fig. 1A). In contrast, RhoA (Val-14), RhoG (Val-12), and Rac1 (Val-12) failed to stimulate the cyclin A-promoter (Fig. 1A). However, in a parallel experiment, Cdc42Hs, and to a lesser extent RhoA (Val-14) and Rac1 (Val-12), activated serum responsive element-driven transcription (Fig. 1B). We next investigated whether activated Rho proteins modulated the endogenous cyclin A expression in nonadherent MEF. We therefore analyzed endogenous cyclin A expression in nonadherent cells transfected with activated

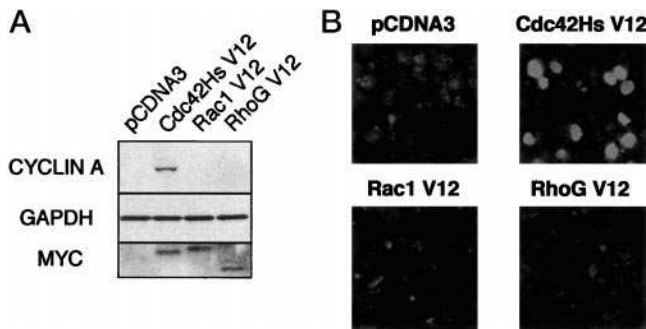


FIG. 2. Activated Cdc42 (Val-12) and not Rac1 (Val-12) nor RhoG (Val-12), induces cyclin A expression and S phase reentry of nonadherent MEF. Fibroblasts were transiently transfected as indicated in Fig. 1. *A*, expression of cyclin A together with the various Myc-tagged GTPases mutants was monitored by Western blotting on total cellular extracts performed successively with anticyclin A and anti-Myc monoclonals. Normalization was carried out with a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) rabbit polyclonal antibody. pCDNA3 indicates cells transfected with the empty vector. *B*, cells entering S phase were detected after BrdUrd incorporation by immunostaining with a fluorescein-conjugated anti BrdUrd monoclonal antibody (Amersham Pharmacia Biotech). A representative field is shown for each transfection.

forms of Cdc42Hs, Rac1, and RhoG. The different mutants were expressed at the same level as monitored by Western blot analysis performed with a monoclonal antibody directed against the Myc epitope (Fig. 2A). Nevertheless, activation of Cdc42Hs, but not RhoG nor Rac1, resulted in a significant expression of endogenous cyclin A in nonadherent MEF. Consistent with these data, BrdUrd labeling (Fig. 2B) indicative of S phase entry, were detected only in cells expressing activated Cdc42Hs. Moreover, using fluorescence-activated cell sorter analysis, we confirmed that these nonadherent MEF cells were competent for cell cycle progression since they accumulated in the S and G₂/M phases of the cell cycle (data not shown).

Cdc42Hs and Ras Promote Anchorage-independent Proliferation of MEF through Synergistic Signaling Pathways—Experiments aimed at determining whether Cdc42Hs is a key downstream mediator of Ras signaling have led to conflicting results. Thus we investigated in primary fibroblasts whether Ras was necessary for the resumption of cell proliferation as measured by cyclin A expression. MEF were transfected with cytomegalovirus-driven plasmid expressing the HA-tagged mutant of Ras which contains the activating Val-12 mutation. As shown in Fig. 3A, Ras (Val-12) gave rise to a 5-fold increase in cyclin A promoter activity. We next investigated the effect of Ras (Val-12) on endogenous cyclin A expression. Whereas cyclin A was not expressed in nonadherent cells transfected with the empty vector (pDCR) following exposure to serum, introduction of Ras (Val-12) resulted in the accumulation of endogenous cyclin A protein (Fig. 3B). As a consequence, cells entered S phase as monitored by BrdUrd staining (Fig. 3C) and progressed through cell cycle as observed using fluorescence-activated cell sorter analysis (data not shown). We next examined whether Cdc42Hs and Ras stimulate cyclin A expression through activation of the same signaling cascade. The dominant negative Asn-17 mutant form of Cdc42Hs did not block Ras (Val-12) induced cyclin A promoter activity in nonadherent MEF (Fig. 4A). Importantly, the dominant negative Asn-17 Rac mutant inhibited the Ras effect by 50% but did not alter the Cdc42Hs response (Fig. 4A). The latter result is consistent with previous data suggesting that pathways downstream of Rac1 are required for full Ras signaling (18–21). To address whether Cdc42Hs mediates Ras-induced cyclin A transcription in nonadherent MEF, we used the Cdc42Hs-interacting domain of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), a specific effector

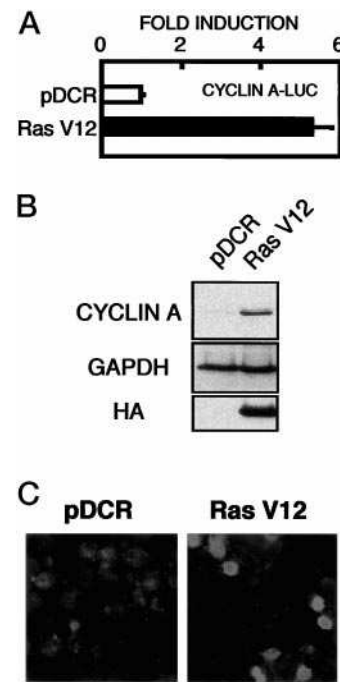


FIG. 3. An activated Ras (Val-12) can alleviate anchorage-requirement for cyclin A expression in MEF. Cells were transiently transfected while adherent with the indicated vectors and then replated on agar-coated dishes for 24 h. *A*, co-transfections were carried out with the mutant Ras-expressing vector together with a cyclin A promoter-driven luciferase reporter. Luciferase activity was normalized as described in the legend to Fig. 1. *B*, expression of cyclin A together with the HA-tagged Ras mutant was monitored by Western blotting on total cellular extracts performed successively with anti-cyclin A and anti-HA monoclonals. Normalization was carried out with a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) rabbit polyclonal antibody. pDCR indicates cells transfected with the empty vector. *C*, cells entering S phase were detected after BrdUrd incorporation as indicated in Fig. 2.

for Cdc42Hs involved in actin polymerization (27, 28). This fragment inhibits Cdc42Hs activity through competition with its effector binding site. Cdc42Hs, but not Ras (Val-12), induced cyclin A transcription was strongly inhibited upon expression of the WASP fragment (Fig. 4A). These results suggest that Ras and Cdc42Hs govern different pathways leading to adhesion-independent cyclin A induction. To determine whether Ras and Cdc42Hs activate co-operative pathways, we concomitantly expressed activated forms of Ras and Cdc42Hs, in nonadherent MEF cells. Separately, Ras (Val-12) and Cdc42Hs (Leu-61) activated cyclin A reporter activity to approximately the same extent (5-fold), whereas their co-expression affected cyclin A in a synergistic manner (15-fold) (Fig. 4B). In conclusion, these data suggest that Cdc42Hs and Ras cooperate to control anchorage-independent proliferation of MEF through parallel pathways.

JNK Is Not Required for Cdc42-mediated Anchorage-independent Proliferation of MEF—Activation of Cdc42Hs and Rac1 in adherent cells has previously been reported to activate the JNK and p38 stress kinases without any effect on the ERK pathway (12, 13, 29). We therefore assessed whether adhesion-independent cyclin A induction required the activation of any of these MAP kinases. MEF were transiently co-transfected with different combinations of HA-tagged versions of ERK2, p38, or JNK1 together with Ras (Val-12), Cdc42Hs (Leu-61), or Rac1 (Leu-61). As shown in Fig. 5A, Ras (Val-12) activated ERK and, to a much lesser extent, JNK in adherent cells. P38 activity was not induced by Ras (Val-12). In contrast, both Cdc42Hs (Leu-61) and Rac1 (Leu-61) had negligible effects on ERK activity whereas they activated p38 and JNK kinases. When the same

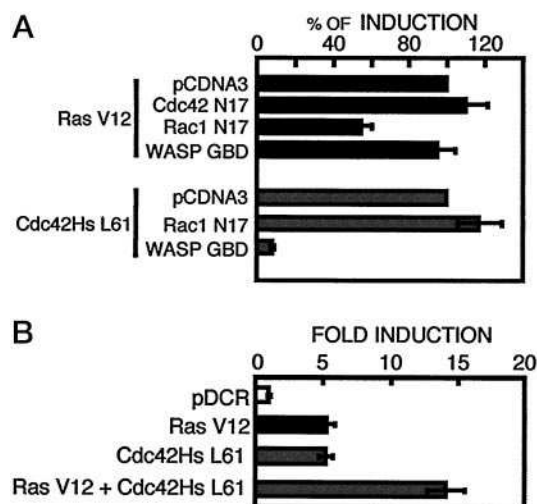


FIG. 4. Cdc42Hs (Leu-61) and Ras (Val-12) delineate two different pathways that cooperate to induce cyclin A transcription in nonadherent MEF. Fibroblasts were transiently transfected by the indicated combinations of expression plasmids with a cyclin A luciferase reporter, as described in the other figures. *A*, Ras (Val-12) or Cdc42Hs (Leu-61) were expressed in conjunction with either the empty pCDNA3 vector or the negative dominant forms of Cdc42, Rac1, or the WASP GTPase-binding domain (WASP GBD). In each case the measured luciferase activity is represented relative to that obtained with the empty vector. *B*, Cdc42Hs (Leu-61) was expressed alone or together with either Ras (Val-12). Activation of the cyclin A reporter is indicated relative to that obtained with the empty vectors (pDCR or pCDNA3).

experiment was carried out on nonadherent cells, Ras (Val-12) still activated ERK, albeit to a lower extent and had negligible effects on JNK. Interestingly, in a nonadherent context, the basal level of p38 activity was inhibited by Ras (Val-12) (Fig. 5B) and Cdc42Hs (Leu-61)- or Rac1 (Leu-61)-induced ERK and JNK activities were equivalent in adherent and nonadherent cells. Importantly, the Cdc42Hs-induced activation of p38 was significantly decreased in nonadherent cells as compared with adherent MEF (Fig. 5A).

In an attempt to identify the effector(s) involved, we used previously described Cdc42Hs and Rac1 variants, mutated in their effector domains, which are impaired in binding to specific effectors (30). Based on the work carried out on Ras, single amino acids substitutions were introduced within the effector loops of the constitutively active Cdc42Hs (Leu-61) and Rac1 (Leu-61) (30). The resulting Cdc42Hs (Q61L/Y40C) and Rac1 (Q61L/Y40C) mutants no longer interact with some Cdc42Hs or Rac1-interactive binding motif-containing proteins such as the Ser/Thr protein kinase p65^{PAK} or WASP (30). In contrast, the F37A substitution in Cdc42Hs (Q61L/F37A) and Rac1 (Q61L/F37A) does not affect the interactions with Cdc42Hs or Rac1-interactive binding domain-containing proteins, but Cdc42Hs (Q61L/F37A) lacks the ability to activate Rac1 (30). The experiments described above were repeated with these two Cdc42Hs (Leu-61) effector loop mutants. As expected, the Cdc42Hs (Q61L/Y40C) mutant did not induce JNK while the Cdc42Hs (Q61L/F37A) mutant weakly, but reproducibly, activated JNK (Fig. 6A). Neither form induced p38 activity in nonadherent cells (Fig. 6B). Importantly, the Cdc42Hs (Q61L/F37A) mutant was almost as potent as Ras (Val-12) or Cdc42Hs (Leu-61) in inducing cyclin A promoter activity after transient expression in nonadherent cells (Fig. 6C). Moreover, Cdc42Hs (Q61L/F37A) cooperated with Ras (Val-12) to the same level as Cdc42Hs (Leu-61).

One interpretation of these results is that Cdc42Hs induced JNK activity is required for cell cycle progression. To test this hypothesis, the dominant negative mutant of JNK (APF-JNK)

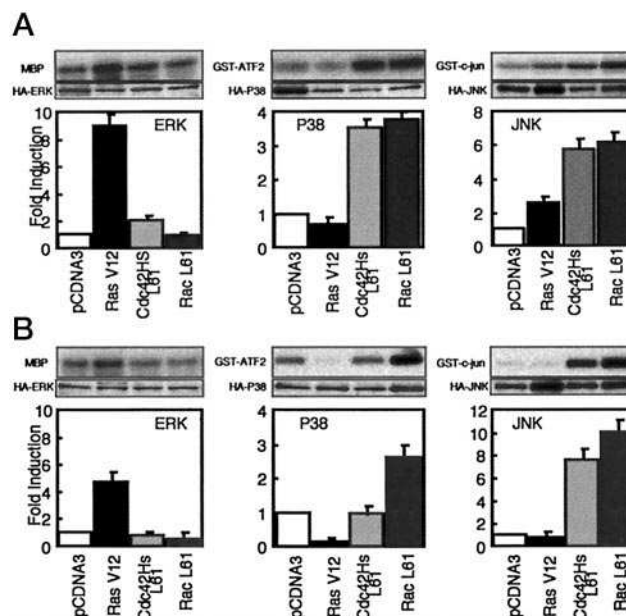


FIG. 5. Ras (Val-12), Cdc42Hs (Leu-61), and Rac1 (Leu-61) differentially activate the MAP kinases ERK2, p38, and JNK1. Cells were transiently co-transfected as indicated in the legend to Fig. 1 with the indicated activated forms of Ras, Cdc42, or Rac1, in the presence of vectors expressing the various HA-tagged MAP kinases. Immunoprecipitated ERK2, p38, and JNK1 activities from either adherent (*A*) or nonadherent (*B*) MEF were determined in the presence of [γ -³²P]ATP and, respectively, MBP, GST-ATF2, and GST-c-Jun recombinant proteins as substrates. Radioactive proteins were separated by electrophoresis through SDS-polyacrylamide gels and signal quantified with a PhosphorImager. Representative images are shown (upper panels) together with Western blots carried out on total extracts with anti-HA monoclonal antibodies and destined to correct for variations in the transfection efficiencies (lower panels). The fold induction is calculated as the ratio of the intensities of signals in the corresponding upper and lower panels.

was expressed in nonadherent cells. Although this dominant negative mutant abolished Cdc42Hs (Leu-61)-induced JNK activity (Fig. 7A), it did not inhibit Cdc42Hs-induced cyclin A expression (Fig. 7B). These data clearly demonstrate that JNK is not involved in Cdc42Hs-induced anchorage-independent proliferation.

Anchorage-independent Proliferation of MEF Is Associated with the Down-regulation of p38 Kinase Activity—Whereas Rac1 (Leu-61) was as potent as Cdc42Hs (Leu-61) in activating JNK, it did not induce cyclin A expression in nonadherent MEF. Interestingly, in contrast with Rac1 (Leu-61), Cdc42Hs did not activate p38 kinase in nonadherent cells (Fig. 5). Moreover, Ras (Val-12), which induced cyclin A expression in nonadherent MEF, strongly down-regulated p38 activity (Fig. 5). We therefore investigated whether the absence of p38 kinase activation was necessary for cyclin A expression in nonadherent MEF, and in particular, whether the ability of Rac1 to activate the p38 pathway could explain its inability to promote cyclin A expression. To test this hypothesis, Rac1 (Leu-61) effector loop mutants were transiently co-transfected into nonadherent MEF expressing HA-tagged versions of p38 or JNK. Rac1 (Q61L/F37A) activated both JNK and p38 kinases, while Rac1 (Q61L/Y40C) had no effect on JNK, and a reduced effect on p38 (Fig. 8, A and B). We next expressed these mutants with the cyclin A-luciferase reporter in nonadherent MEF. As previously observed for Rac1 (Leu-61), neither Rac1 (Q61L/F37A) nor Rac1 (Q61L/Y40C) were able to activate cyclin A promoter activity (Figs. 1A and 8C). However, addition of SB203580, a specific inhibitor of the p38 pathway (31, 32), resulted in strong cyclin A promoter activity in nonadherent Rac1 (Leu-61)-ex-

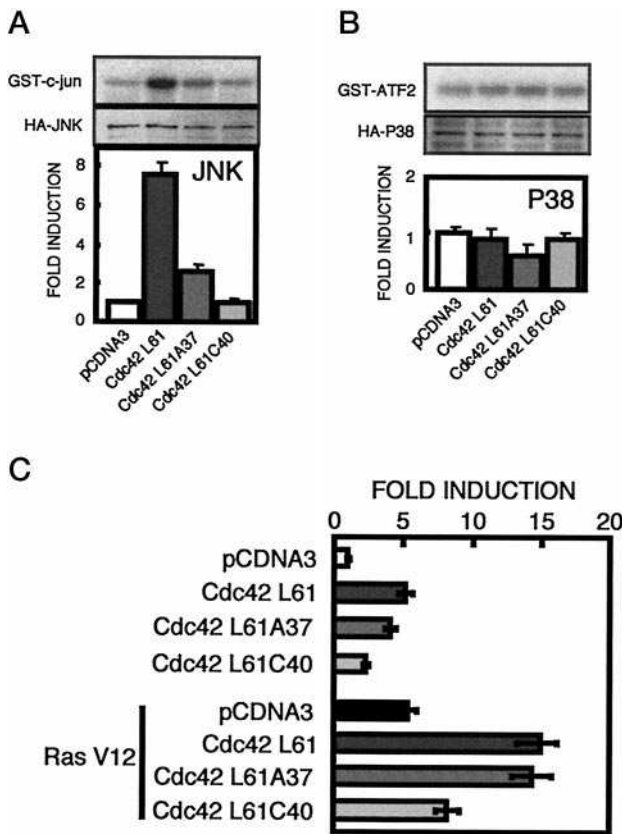


FIG. 6. An effector interacting with Cdc42Hs (Q61L/F37A) but not with Cdc42Hs (Q61L/Y40C) is required for Cdc42-induced cyclin A expression in nonadherent MEF. Cells were transiently co-transfected as indicated in Fig. 1 with the indicated effector loop mutants of Cdc42, in the presence of vectors expressing HA-tagged JNK1 and p38 kinases. Immunoprecipitated JNK1 (A) or p38 (B) kinases activities from nonadherent MEF were determined as described. Legends are as described in the legend to Fig. 5. C, the indicated effector loop mutants of Cdc42 were expressed alone or together with Ras (Val-12), in the presence of pCyc A-luc. Luciferase activity is represented relative to that obtained with the corresponding empty vector (pCDNA3).

pressing cells (Fig. 8C). Indeed, cyclin A expression was as high as that observed in the presence of Cdc42Hs (Leu-61). Similarly, the Rac1 double mutant (Rac1 (Q61L/F37A)) impaired in inducing actin polymerization and focal complex formation (30), activated cyclin A transcription upon inhibition of the p38 pathway (Fig. 8C). In contrast, the Rac1 (Q61L/Y40C) mutant did not activate cyclin A transcription under these conditions (Fig. 8C). This strongly suggests that inactivation of p38 kinase activity is required for the suppression of the block to proliferation as measured by activation of cyclin A transcription. This hypothesis is supported by experiments with a dominant negative form of p38 (YFp38), which led to an activation of cyclin A promoter activity when expressed in conjunction with Rac1 (Leu-61) (Fig. 8C).

In conclusion, inactivation of p38 pathway is required, but not sufficient, for the proliferation of nonadherent MEF. Therefore, anchorage-independent MEF proliferation might result from a dynamic balance involving inactivation of p38 kinase activity and activation of an effector distinct from JNK which interacts with Cdc42Hs.

DISCUSSION

Fibroblasts require both mitogens and integrin-mediated attachment for growth (26, 33, 34). When deprived of anchorage, many adherent cell lines fail to undergo several G₁-specific cell cycle-related transitions, even in the presence of growth factors

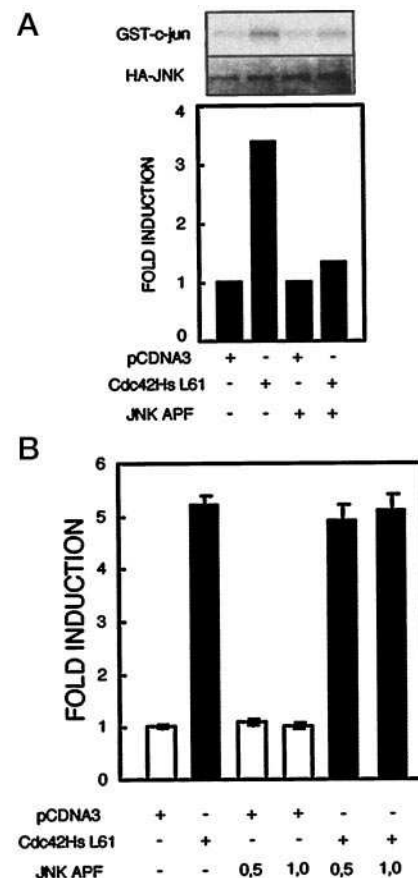


FIG. 7. JNK is not required for anchorage-independent expression of cyclin A in MEF. A, cells were transiently co-transfected as indicated in the previous figures with a vector expressing HA-tagged JNK1 in the presence of Cdc42Hs (Leu-61) and/or a negative dominant form of JNK (JNK-APF). Immunoprecipitated JNK1 kinase activity from nonadherent MEF was determined with GST-c-JUN as a substrate. Legends are as described in the legend to Fig. 5. B, Cdc42Hs (Leu-61) was expressed either alone or together with JNK-APF, in the presence of pCyc A-luc. Luciferase activity from nonadherent cells is represented relative to that obtained with the corresponding empty vector (pCDNA3).

(1, 35–39). However, no such studies have been carried out in primary cells. Stable expression of activated Ras or Cdc42Hs in rodent cell lines has been shown to overcome anchorage-dependent requirements to various extents. However, expression of a mutated Ras is known to induce a wide variety of responses including both gene expression and alterations in cellular morphology. Moreover, it has become clear that the great biological diversity observed within existing cell lines can at least in part be accounted for by the large array of integrin combinations which are expressed at the cell surface. As a result, many cell type-specific differences exist between normal and transformed cells, as well as between cell lines whose proliferation is strictly anchorage-dependent. The differences observed in established cell lines are probably the result of adaptive events that have occurred during cell culture. Thus, the use of primary cells as opposed to immortalized cell lines is particularly important for the investigation of pathways controlling anchorage-independent cell proliferation. Moreover, the use of different experimental conditions to study the links between anchorage and proliferation has also led to many apparent discrepancies. Specifically, growth on soft agar is different from growth in liquid suspension. Some mutants, selected for their ability to form colonies in soft agar are unable to proliferate in liquid suspension (24). In order to overcome these difficulties, we studied the requirements for anchorage-independent proliferation of pri-

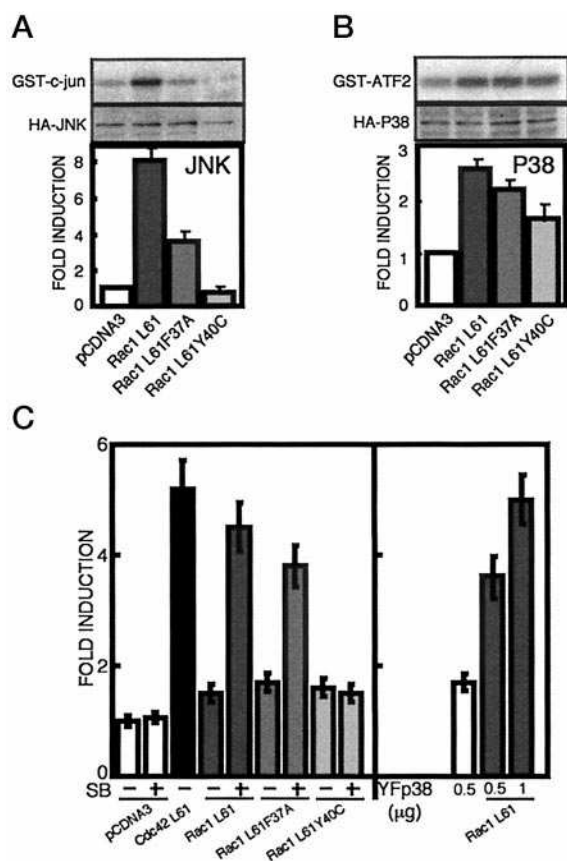


FIG. 8. Down-regulation of p38 kinase activity is required for Rac-induced cyclin A expression in nonadherent MEF. Cells were transiently co-transfected as indicated in the legend to Fig. 1 with the indicated effector loop mutants of Rac1, in the presence of vectors expressing HA-tagged JNK1 and p38 kinases. Immunoprecipitated JNK1 (A) or p38 (B) kinase activities from nonadherent MEF were determined as described. Legends are as described in the legend to Fig. 5. C, the indicated mutants of Rac1 were expressed either alone (C) or with the negative dominant YFP38 kinase (C), in the presence of pCyc A-luc. In the former case, cells were treated with SB203580 (+). Luciferase activity is represented relative to that obtained with the empty pCDNA3 vector.

mary mouse embryo fibroblasts grown in suspension following transient ectopic expression of activated Ras-related small GTPases. Mutants of Ras, Rac1, and Cdc42Hs were used in order to determine the individual contributions of these proteins in activating the cell cycle machinery. Finally, because cyclin A down-regulation is observed in all suspended cells (1, 38), we used cyclin A promoter activation as an index of the ability of a cell to resume cell cycle progression following anchorage deprivation.

The stable transfection of an activated Cdc42Hs has previously been shown to enable Rat 1 fibroblasts to grow in soft agar and proliferate in nude mice (23). Interestingly, coexpression of a dominant negative Cdc42 (Asn-17) inhibited Ras-mediated focus formation, growth in soft agar, and reversion of the transformed phenotype, indicating that Cdc42Hs is necessary for Ras transformation. Following transient transfection in the absence of cell adhesion, Cdc42Hs (Val-12), but not Rac1 (Val-12), RhoA (Val-14), or RhoG (Val-12), activated cyclin A promoter to the same extent as Ras (Val-12). Accordingly, transfected cells entered S phase as measured by BrdUrd labeling. We next addressed the possibility that Cdc42Hs could cooperate with Ras mutant in leading to cellular proliferation in a fully anchorage-independent context. A strong synergy was observed when either of two activated forms of Cdc42, Cdc42Hs (Val-12) or Cdc42Hs (Leu-61) were co-transfected with Ras

(Val-12). Importantly, a Cdc42 effector loop mutant (Cdc42Hs (Q61L/F37A)), which is able to interact with Cdc42Hs or Rac-interactive binding motif-containing proteins, synergizes with the Ras mutant. The importance of Cdc42 in this synergy was further demonstrated by an almost complete inhibition of cyclin A promoter activity following coexpression of activated Cdc42 with WASP-GBD. In contrast, neither the dominant negative form Cdc42 (Asn-17) nor WASP-GBD inhibited Ras-induced anchorage independent transcription of cyclin A, suggesting that Ras activates anchorage-independent cell proliferation through a Cdc42Hs-independent pathway.

Although expression of the constitutively active Rac1 was clearly not sufficient to induce anchorage-independent transcription of cyclin A, and thus to proliferation, the ability of the dominant negative Asn-17 form of Rac1 to partially inhibit Ras-induced cyclin A expression places it downstream of Ras in this pathway. Conversely, the inability of the Rac1 (Asn-17) to inhibit Cdc42-induced transcription of cyclin A indicates that the role of Cdc42 in transformation appears to be largely independent of Rac (18, 20). Furthermore, Rac and Cdc42Hs have been shown to delineate distinct pathways that cooperate to transform NIH 3T3 cells (2). Consistent with this, the Cdc42Hs double mutant Cdc42Hs (Q61L/F37A), which is unable to activate Rac (30), was still able to induce cyclin A transcription and cooperate with Ras. These observations suggest that the hierarchy established between Ras, Cdc42, and Rac in the control of cell morphology (40, 41) is not necessarily valid for other processes. Altogether, we show that pathways downstream of Rac1 are required for full Ras signaling, but are not required for Cdc42Hs signaling, in controlling cell cycle progression of MEF cultured under anchorage-free conditions.

Both Cdc42Hs and Rac (but not Rho) can activate the JNK/SAPK and the p38/HOG MAP kinases cascades in adherent cells (12, 13), thereby affecting gene transcription. JNK phosphorylates c-Jun at serines 63 and 73, and this transcription factor is implicated in G_1 progression by inducing cyclin D1 expression (42). Nevertheless, a recent study showed that phosphorylation of serines 63 and 73 of c-Jun was required for protection against UV-induced apoptosis but not for cell proliferation (42). Accordingly, JNK activity is not detected in cells growing on a solid support, and in our work cyclin D1 is normally induced and present in nonadherent MEF. Consistent with this, we show here that a dominant negative form of JNK was unable to inhibit Cdc42Hs-induced cyclin A transcription in MEF cultured under anchorage free conditions. In contrast, p38 MAPK activity has been proposed to participate in the control of the G_1/S transition of some cells (22, 43). Whereas it has been previously shown that Cdc42Hs inhibits proliferation of adherent NIH3T3 cells (22), we show here that it leads to the opposite effect in nonadherent MEFs. Interestingly, however, modulation of p38 kinase activity seems to be instrumental in both situations. In adherent NIH 3T3 cells, inhibition of proliferation is associated with an activation of p38 activity. In contrast, under anchorage-free conditions, we found that Cdc42Hs-mediated cyclin A induction and progression of MEF through G_1/S was associated with impaired p38 activity. Moreover, inhibition of p38 activity allowed Rac1-induced cyclin A transcription. These results indicate that Rac1 and Cdc42Hs use distinct pathways to activate p38 kinase. It is clear that inhibition of p38 kinase activity is not sufficient to trigger proliferation, and additional signals modulated by Cdc42Hs or Rac1 are necessary. It has been postulated that these events require actin polymerization and focal complex formation. However, in our study a Rac1 double mutant (Rac1 (Q61L/F37A)), unable to induce either membrane ruffling or the formation of focal complexes (30), was nevertheless able to induce

G₁ progression when p38 kinase activity was inhibited.

In summary, this study indicates a novel role for Cdc42 in the control of anchorage-independent cell cycle progression. Under these conditions, Cdc42 activity results in a down-regulation of p38 MAPK activity and the Cdc42 effector domain is redirected from JNK to another downstream effector. These findings suggest that unravelling the Cdc42Hs signaling cascade will shed some light on the mechanisms by which a cell integrates peripheral cues into a coordinated proliferation program.

Acknowledgments—M. White, Ph. Chavrier, A. Hall, C. Sardet, B. Dérijard, and A. Brunet are thanked for their gifts of plasmids. We thank Ph. Fort for helpful discussions and N. Taylor for carefully reading the manuscript.

REFERENCES

- Philips, A., Huet, X., Plet, A., Rech, J., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1999) *Oncogene* **18**, 1819–1825
- Roux, P., Gauthier-Rouviere, C., Doucet-Brutrin, S., and Fort, P. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 629–637
- Hall, A. (1998) *Science* **279**, 509–514
- Boguski, M. S., and McCormick, F. (1993) *Nature* **366**, 643–654
- Lamarque, N., and Hall, A. (1994) *Trends Genet.* **10**, 436–440
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2295–2322
- Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L., and Der, C. J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1332**, F1–23
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992) *Cell* **70**, 401–410
- Ridley, A. J., and Hall, A. (1992) *Cell* **70**, 389–399
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 456–459
- Nobes, C. D., Hawkins, P., Stephens, L., and Hall, A. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 225–233
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995) *Cell* **81**, 1137–1146
- Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A., and Karin, M. (1995) *Cell* **81**, 1147–1157
- Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995) *Science* **269**, 1270–1272
- Symons, M. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 668–674
- Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995) *Cell* **81**, 1159–1170
- O'Hagan, R. C., Tozer, R. G., Symons, M., McCormick, F., and Hassell, J. A. (1996) *Oncogene* **13**, 1323–1333
- Khosravi-Far, R., Soltski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S., and Der, C. J. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6443–6453
- Prendergast, G. C., Khosravi-Far, R., Soltski, P. A., Kurzawa, H., Lebowitz, P. F., and Der, C. J. (1995) *Oncogene* **10**, 2289–2296
- Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995) *Nature* **374**, 457–459
- Qiu, R. G., Chen, J., McCormick, F., and Symons, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11781–11785
- Molnar, A., Theodoras, A. M., Zon, L. I., and Kyriakis, J. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13229–13235
- Qiu, R. G., Abo, A., McCormick, F., and Symons, M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3449–3458
- Le Gall, M., Grall, D., Chambard, J. C., Pouyssegur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (1998) *Oncogene* **17**, 1271–1277
- Guadagno, T. M., and Assoian, R. K. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 1419–1425
- Tapon, N., and Hall, A. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 86–92
- Aspenstrom, P. (1999) *Exp. Cell Res.* **246**, 20–25
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996) *Cell* **84**, 723–734
- Frost, J. A., Xu, S., Hutchison, M. R., Marcus, S., and Cobb, M. H. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3707–3713
- Lamarque, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P. D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J., and Hall, A. (1996) *Cell* **87**, 519–529
- Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C., and Young, P. R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 533–538
- Young, P. R., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Kassiss, S., Doyle, M. L., McNulty, D., Gallagher, T. F., Fisher, S., McDonnell, P. C., Carr, S. A., Huddleston, M. J., Seibel, G., Porter, T. G., Livi, G. P., Adams, J. L., and Lee, J. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12116–12121
- Assoian, R. K., and Zhu, X. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 93–98
- Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J., and Parise, L. V. (1997) *Nature* **390**, 632–636
- Guadagno, T. M., Ohtsubo, M., Roberts, J. M., and Assoian, R. K. (1993) *Science* **262**, 1572–1575
- Bohmer, R. M., Scharf, E., and Assoian, R. K. (1996) *Mol. Biol. Cell* **7**, 101–111
- Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R. M., Roberts, J. M., and Assoian, R. K. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 391–403
- Schulze, A., Zerfass-Thome, K., Berges, J., Middendorp, S., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4632–4638
- Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1996) *Science* **271**, 499–502
- Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. W., and Ridley, A. J. (1997) *J. Cell Sci.* **110**, 707–720
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) *Cell* **81**, 53–62
- Wisdom, R., Johnson, R. S., and Moore, C. (1999) *EMBO J.* **18**, 188–197
- Wang, S., Nath, N., Minden, A., and Chellappan, S. (1999) *EMBO J.* **18**, 1559–1570

ANNEXE II

Publication n°4 :

The gene for a new brain-specific RhoA exchange factor maps to the highly unstable chromosomal region 1p36.2-1p36.3. Oncogene, sous presse.



The gene for a new brain specific RhoA exchange factor maps to the highly unstable chromosomal region 1p36.2–1p36.3.

Marion De Toledo¹, Vincent Coulon², Susanne Schmidt¹, Philippe Fort¹ and Anne Blangy^{*,1}

¹Centre de Recherches en Biochimie Macromoléculaire, CNRS IFR24-UPR 1086, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France; ²Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS IFR24-UMR 5535, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

Guanine nucleotide exchange factors from the Dbl family are proto-oncogenic proteins that activate small GTPases of the Rho family. Here we report the characterization of GEF720, a novel Dbl-like protein related to p115Rho-GEF. GEF720 activated RhoA both in our recently developed Yeast Exchange Assay and in biochemical *in vitro* exchange assays. GEF720 induced RhoA dependent assembly of actin stress fibers in REF52 fibroblastic cells. In NIH3T3 cells this Dbl-like protein elicited formation of transformation foci with a morphology similar to RhoA-V14 induced foci. In the PC12 neuron-like cell line, expression of GEF720, whose mRNA is brain specific, inhibited NGF-induced neurite outgrowth. Finally, GEF720 gene is located on human chromosome 1 on band 1p36, between Tumor Protein 73 and Tumor Necrosis Factor Receptor 12, two genes rearranged in many neuroblastoma cell lines. Together, these results show that this new Dbl related protein, GEF720, is an exchange factor that can directly activate RhoA *in vivo* and is potentially involved in the control of neuronal cell differentiation. GEF720 is also a new candidate gene involved in the progression of neuroblastoma and developmental abnormalities associated with rearrangements in the 1p36 chromosomal region. *Oncogene* (2001) 20, 7307–7317.

Keywords: Rho GTPase; Dbl exchange factor; transformation; 1p36; chromosome 1

Introduction

The Rho related GTPases are involved in a variety of cellular processes and have a prominent role in the control of the actin cytoskeleton as well as cell growth and transformation (Fort, 1999; Ridley, 1999). These small GTPases function as molecular switches: they are inactive when bound to GDP, and active when bound to GTP. The release of GDP and subsequent binding of GTP is catalyzed by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that function as GTPase activators. The GEFs from the Dbl family are Rho-specific

exchange factors (Whitehead *et al.*, 1997). These proteins are characterized by a catalytic Dbl-Homology (DH) domain of about 200 aminoacids, usually followed by a pleckstrin homology (PH) domain (Stam and Collard, 1999). There are over 40 proteins present in databases that contain a DH domain. About half of these putative exchange factors have been characterized as Rho protein activators. Some are specific for a single GTPase, while others can activate several Rho related proteins, but the specificity of many Dbl-like GEFs remains to be established, especially *in vivo* (Aghazadeh *et al.*, 1998; Stam and Collard, 1999).

Beside their prominent role in the dynamics of the actin cytoskeleton, Rho GTPases are also important in the control cell proliferation, transformation and invasion (Fort, 1999). Rho proteins are essential for Ras-induced oncogenic transformation and RhoA dominant negative mutants can block the entry into the cell cycle induced by active Ras (Olson *et al.*, 1998). Several Rho GTPases have been shown to have intrinsic although limited transforming properties by decreasing anchorage dependent cell growth, reducing cell contact inhibition or inducing tumor formation in nude mice (Fort, 1999). Some Rho GTPases cooperate to induce focus formation in NIH3T3 cells, suggesting a cross-talk between Rho-controlled pathways (Roux *et al.*, 1997). The activation of RhoA enhances tumor cell invasion (Fukushima *et al.*, 2000) and RhoC is sufficient to induce metastasis (Clark *et al.*, 2000). Several recent studies revealed a critical role of Rho GTPases in the control of cell proliferation suggesting that inhibiting these small molecules could be a new therapeutic strategy against cancer (Clark *et al.*, 2000; Fukushima *et al.*, 2000; Mira *et al.*, 2000).

Compared to the moderate activity of the Rho GTPases, some of the Dbl related exchange factors have high oncogenic transforming capacities (Stam and Collard, 1999; Whitehead *et al.*, 1997). The Dbl oncogene was originally isolated as a transforming gene when transfected in NIH3T3 cells (Eva and Aaronson, 1985). Several other Dbl related proteins, such as Dbs, Ect-2, Lbc, Lfc, Lsc, Net, Ost and Tim were identified from genomic or cDNA libraries as transforming proteins when transfected into NIH3T3 cells (Stam and Collard, 1999). The transforming activity of Rho GEFs appears to be a common

*Correspondence: A Blangy; E-mail: blangy@crbm.cnrs-mop.fr.

Received 12 March 2001; revised 25 June 2001; accepted 14 August 2001

characteristic since other Dbl related proteins such as p115-RhoGEF that were isolated by different approaches also have transforming or invasive activities (Hart *et al.*, 1996). GEFs like Dbl (Janssen *et al.*, 1999; Noguchi *et al.*, 1988), Bcr (McWhirter and Wang, 1997) and LARG (Fukuhara *et al.*, 2000; Kourlas *et al.*, 2000) are mutated in several human cancers, and others like α PIX/ARHGEF6 (Kutsche *et al.*, 2000) in developmental disorders. The oncogenic activations of these GEFs are due to chromosomal rearrangements that modify the regulation of the genes or the sequence of the proteins themselves.

The distal region of chromosome 1 is one of the most frequently rearranged in the human genome (Slavotinek *et al.*, 1999). In particular band 1p36 which can be duplicated (Heilstedt *et al.*, 1999), translocated (Amler *et al.*, 2000) or deleted (Caron *et al.*, 2001; Hogarty *et al.*, 2000; Ohira *et al.*, 2000). Rearrangements in this region are frequently associated with neuroblastoma (Hogarty *et al.*, 2000), but also leukemia and lymphoma as well as colorectal, hepatocellular or breast cancer (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP/mitelsum.cgi> for details). Therefore, it is of particular interest to determine the identity and the function of the genes in this region of human chromosome 1.

Here we report the characterization of GEF720, a new member of the Dbl family. GEF720 is related to p115Rho-GEF. The GEF720 is a 21 exon gene located on human chromosome 1 at locus 1p36.2–p36.3, immediately upstream of the gene encoding the surface receptor TNFRSF12/APO3/DR3 (Grenet *et al.*, 1998). Its mRNA is mainly expressed in brain. GEF720 behaves as a specific activator of mammalian RhoA in the Yeast Exchange Assay (De Toledo *et al.*, 2000) and directly activates guanine nucleotide exchange by RhoA *in vitro*. GEF720 overexpression induced an increase in the level of stress fibers in REF52 fibroblastic cells, elicited transformation foci in NIH3T3 cells with a morphology characteristic of RhoA activation. Finally, as does activated RhoA, GEF720 inhibited nerve growth factor induced neurite outgrowth in the neuron-like PC12 cell line. Being part of the 1p36 chromosomal region involved in many human cancer, in particular neuroblastomas, GEF720 is a new candidate tumor regulator gene known to be present in this region.

Results

KIAA0720 encodes GEF720, a Dbl related protein

KIAA0720 is a 5' truncated cDNA from the HUGE protein database of the Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/huge>), predicted to encode a Dbl-related protein referred to as GEF720. We first performed database searches and identified a complete human cDNA of 3608 bp: Est AK024676, which contains an open reading frame

of 912 amino acids with an ATG in a favorable Kozak's consensus context as well as a polyadenylation signal at the C-terminus (Figure 1). The expected molecular mass for GEF720 is 111 kDa. Protein analysis showed that the DH domain is located between aminoacids E249 and Q439 and the PH domain between Q490 and N590 (Figure 1, shaded sequences). There is no other remarkable motif in the sequence of GEF720.

GEF720 is divergent from the other GEFs characterized so far: the closest known mammalian Dbl-related proteins are p115RhoGEF/Lsc (Glaven *et al.*, 1996; Kozasa *et al.*, 1998) and KIAA380/PDZ-RhoGEF (Fukuhara *et al.*, 1999; Rumenapp *et al.*, 1999) and there are no known homologues of GEF720 in other organisms such as *Drosophila* or *C. elegans*. The DH domain of GEF720 is only 33 and 28% identical to that of p115- and PDZRhoGEF respectively and the PH domain 21% and 19% identical respectively (Figure 2a), while p115RhoGEF, Lsc and PDZ-RhoGEF DH domains are more than 50% identical (Fukuhara *et al.*, 1999). GEF720 thus constitutes a new stem in the Dbl-family, clearly distinct from the Lsc, PDZ- and p115RhoGEFs subgroup and from the p114- and p190RhoGEF, Lbc, Lfc/GEF-H1 subgroup (Figure 2b), within which the GEFs share over 50% homology in their DH domains (Blomquist *et al.*, 2000; Fukuhara *et al.*, 1999).

GEF720 is an exchange factor for RhoA

We next used the Yeast Exchange Assay to determine the specificity of GEF720 (De Toledo *et al.*, 2000) and tested the ability of the exchange factor to activate RhoA, Rac1, Cdc42Hs and RhoG. We expressed the wild type GTPases fused to LexA DNA binding domain together with their respective effectors fused to GAD and tested the ability of GEF720 to induce the binding of the GTPases to their effectors. The β -galactosidase filter assays showed that GEF720 can activate RhoA in yeast, allowing the binding of the GTPase to its effector Rock, while it has no or little effect on Rac1, Cdc42Hs and RhoG (Figure 3a) nor on Rac2 and 3 (data not shown). In the same experiment, the Cdc42Hs specific exchange factor α PIX (Manser *et al.*, 1998) had no effect on the binding of RhoA to its effector.

Quantitative ONPG assays showed that the increase in β -galactosidase activity in the presence of GEF720 was 3.58-fold while in the same experiment, the exchange factor TrioD2 gave an increase of 4.37-fold (Figure 3b). Given the high degree of similarity between RhoA and RhoB and RhoC (respectively 82 and 92% identical aminoacids), we assayed the activity of GEF720 on these two GTPases. In contrast to RhoA, GEF720 did not significantly activate RhoB and C: we observed respectively a 1.45- and 1.47-fold increase in β -galactosidase activity, which was not significantly different from the activity measured in the absence of exchange factor (Figure 3b). This suggested

[illegible]

Figure 1 GEF720 cDNA and predicted 912 aminoacid sequence. The DH (aminoacids E249 to Q439) and PH (aminoacids Q490 to N590) are shaded (sequence accession number AK02476)

that GEF720 is indeed a Rho protein exchange factor, with a specificity toward RhoA.

To confirm the results obtained in yeast and verify the direct activation of RhoA by GEF720, we performed *in vitro* exchange assays using purified proteins. GST-fused RhoA and GEF720 DH domain were affinity purified from bacteria. RhoA was loaded with GDP and we examined the effect of GEF720 on the rate of nucleotide exchange by the GTPase. Addition of GEF720 DH domain did induce an acceleration of the GDP/GTP exchange reaction by

RhoA (Figure 3c). We obtained similar results using a GEF720 construct containing both the DH and the PH domains (data not shown).

These results indicate that GEF720 is an exchange factor specific for RhoA.

GEF720 elicits stress fiber assembly in REF-52 fibroblasts

To investigate whether GEF720 could also activate RhoA *in vivo*, we transiently expressed the *myc*

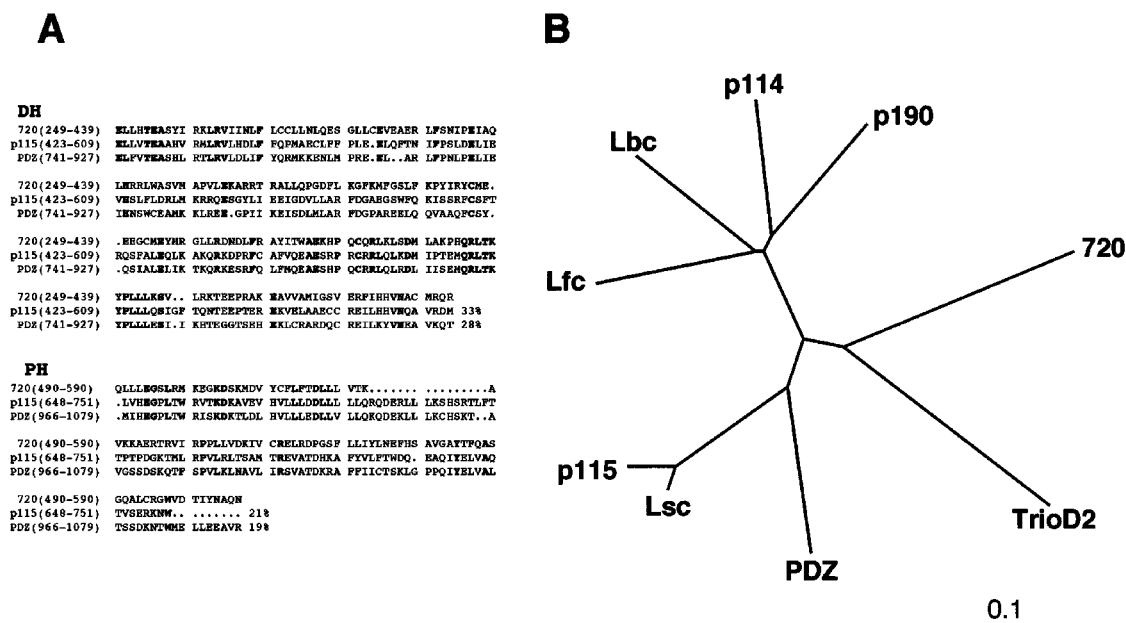


Figure 2 (a) Alignment of the DH and PH domains of GEF720 with those of p115RhoGEF and PDZ-RhoGEF (accession numbers U64105 and AB002378 respectively). In bold letters are shown the aminoacids conserved between the three proteins, percents correspond to the identities between GEF720 and p115RhoGEF or PDZRhoGEF. (b) Similarity tree drawn from distances computed from alignment of the DH domain sequences of GEF720 (720: aminoacids 249 to 439), PDZ-RhoGEF (PDZ: aminoacids 741 to 920), p115RhoGEF (p115: 423 to 608), Lsc (aminoacids 418 to 607, accession number U58203), p114RhoGEF (p114: aminoacids 103 to 299, accession number AB011093), p190RhoGEF (p190: aminoacids 848 to 1184, accession number MMU73199), Lbc (aminoacids 67 to 272, accession number NM_006738), Lfc (aminoacids 238 to 431, accession number MMU28495) and Trio exchange domain 2 (TrioD2: aminoacids 1914 to 2085, accession number U42390) using ClustalW and Treeview. The bar length at the bottom represents 10% divergence

epitope tagged protein in REF-52 rat embryo fibroblasts. In these cells, expression of a RhoA specific exchange factor results in an increase in the level of actin stress fibers (De Toledo *et al.*, 2000). When GEF720 was expressed in REF-52 cells we observed a higher level of stress fibers in 60 to 80% of the transfected cells (Figure 4c,d), similar to what was observed when the dominant active GTPase RhoA-V14 was expressed (Figure 4a,b). We did not observe any lamellipodia or filipodia associated with the activation of Rac1, Cdc42Hs, RhoG (Gauthier-Rouvière *et al.*, 1998), TC10 (Murphy *et al.*, 1999), TCL (Vignal *et al.*, 2000) or chp (Aronheim *et al.*, 1998). This suggested that GEF720 specifically activated endogenous RhoA protein in fibroblastic cells. To verify the activation of RhoA, we co-expressed GEF720 together with a fragment of kinectin (KID2: aa 1117 to 1356 of kinectin) that binds RhoA in the two hybrid system (Alberts *et al.*, 1998) and inhibits RhoA-V14 in REF52 cells (Vignal *et al.* submitted). As shown in Figure 4, cells expressing GEF720 and GFP-KID2 did not exhibit any increase in the level of actin stress fibers : in e–g, compare the cell expressing only GEF720 (white arrow) to the two cells which express both GFP-KID2 and GEF720 (white stars).

These results show that GEF720 can induce stress fiber assembly in REF-52 cells through the activation of endogenous RhoA.

GEF720 has a moderate transforming activity in NIH3T3 cells

A transforming activity has been described for several but not all Db1 related proteins (Stam and Collard, 1999; Whitehead *et al.*, 1997), while dominant active RhoA mutants were reported to have a weak transforming activity in NIH3T3 cells as compared to Ras (Khosravi-Far *et al.*, 1995). We determined the transforming activity of GEF720 using focus formation assays in NIH3T3 fibroblasts. Consistent with previous reports (Khosravi-Far *et al.*, 1995), we found that the dominant active mutant of RhoA had a weak transformation activity (980 ± 79 foci per μg) as compared to Ras ($15\,600 \pm 900$ foci per μg) (Figure 5a). In the same assay, GEF720 had a transforming activity significantly higher than RhoA (2070 ± 81 foci per μg) but still about 7.5-fold lower than Ras-V12. The transforming activities measured for RhoA-V14 and GEF720 were within the range of the oncogenic potentials measured for dominant active RhoA and activated Vav and Vav-2 in similar experimental conditions (Schuebel *et al.*, 1998). The cells in GEF720- and RhoA-V14-induced foci were rounded and densely packed (Figure 5b) as reported for other RhoA GEFs (Stam and Collard, 1999), while Ras-V12 caused the appearance of larger, swirled foci with characteristic spindle shape cells (Figure 5b).

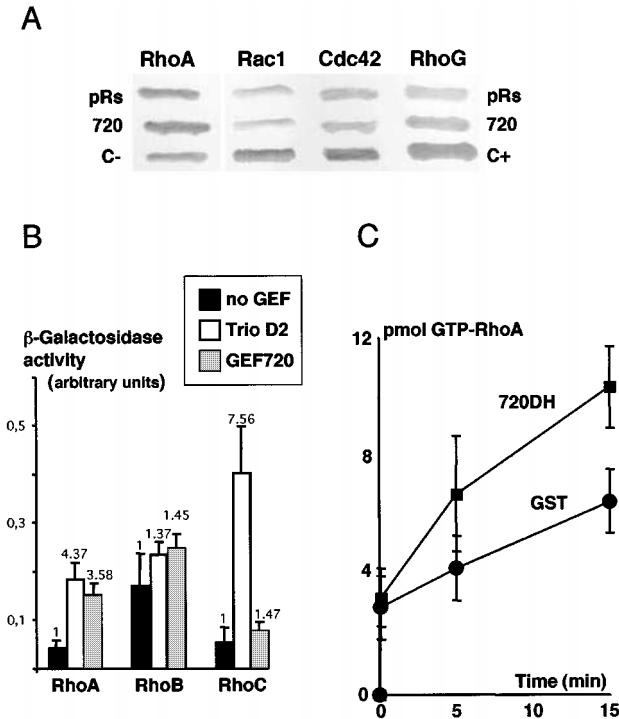


Figure 3 GEF720 is a RhoA specific exchange factor. (a) Filter assay showing β -galactosidase activity in TAT7 (or 12.1 in the case of Cdc42) yeast expressing wt GTPases fused to LexA, their effector fused to GAD and either GEF720 (lane 720) or a control GEF (lane c: aPIX for RhoA and Cdc42Hs; TrioD1 for Rac1 and RhoG) or the control vector alone (pRs). (b) β -galactosidase activity measured by ONPG liquid assay using 5 μ g of total protein extracts from yeast expressing LexA-RhoA, B or C, GAD-ROCK, and the indicated exchange factor: no exchange factor (black bars), Trio GEFD2 (white bars) or GEF720 (gray bars). Activities are expressed in arbitrary units. Figures above the bars are fold increases of β -galactosidase activity compared to the activities measured in the absence of exchange factor (black bars). Shown are the means and s.e.m. from five independent yeast transformants. (c) *In vitro* exchange assay: 1 μ M of GST-fused RhoA and 1 μ M of GST fused GEF720 DH domain (720DH) or GST alone were incubated in the presence of GTP- $[\gamma^{35}\text{S}]$ and the amount of radioactivity bound to the GTPase was determined for each indicated time point. Shown are the means and s.e.m. from three experiments

Like other members of the Dbl family (Stam and Collard, 1999; Whitehead *et al.*, 1997), GEF720 has a moderate transforming activity in NIH3T3 cells, transformed cells looking similar in GEF720 and RhoA-V14 induced foci. Together with the above results, these observations show that this new Dbl family member GEF720 is a direct activator of RhoA *in vivo*.

GEF720 is specifically expressed in brain and inhibits neurite outgrowth in PC12 neuron like cells

We next examined the expression pattern of GEF720 mRNA. We hybridized a 2.7 kb GEF720 probe (nt 578 to 3296 of the cDNA) to a Northern blot membrane for multiple mouse tissues. It revealed a single band around 3.7 kb, compatible with the size of the cDNA.

GEF720 mRNA was expressed only in brain (Figure 6a, Br lane), with a possible but very weak expression if any in heart and skeletal muscle (Figure 6a, see dots in H and M lanes).

Since GEF720 expression is brain specific, we analysed its activity in PC12 neuron-like cells. In this system, it has been reported previously that active RhoA inhibits neurite outgrowth triggered by NGF-treatment (Sebok *et al.*, 1999). In the presence of serum, PC12 cells expressing GEF720 maintained the same morphology as untransfected cells (Figure 6b, panels a and b). We obtained the same results upon RhoA-V14 expression (data not shown). However, after serum starvation and NGF treatment, 95% of GEF720 expressing cells showed a spread morphology but failed to produce neurite outgrowth, while non expressing cells underwent neuronal differentiation and presented long extensions (Figure 6b, panels c and d). In similar conditions, we also observed the inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells expressing RhoA-V14 (Figure 6b, panels d and e).

This shows that the expression of GEF720 can in fact interfere with neuronal differentiation through its ability to activate endogenous RhoA.

GEF720 gene is located on human chromosome 1 at 1p36.2–1p36.3

Database searches revealed a partially ordered and sequenced genomic fragment of 102 681 pb from human chromosome 1 (GeneBank reference NT_022059). This fragment contains the whole GEF720 gene, except exon V which lies within a non sequenced gap. The gene is made of 21 exons encompassing at least 27 kilobases (Figure 7a). GEF720 gene is at the 1p36.23–1p36.31 junction, 5' upstream of the Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family (TNFRSF) 12 gene, a 5 kb gene also termed DR3, WSL1, LARD and APO3 (Marsters *et al.*, 1998), and downstream of the FLJ20430 putative protein gene and the p53 related Tumor Protein 73 (TP73) gene (Stiewe and Putzer, 2000) (Figure 7b). Interestingly, while all Est cDNAs present in databases such as AK024676 finish just after the consensus polyadenylation signal, KIAA0720 displays a 1 kb extension at the 3' end which overlaps the first exon of the TNFRSF12 gene (Figure 7c). This suggests that KIAA0720 corresponds to a mRNA which was not matured properly and indicates that the two genes encoding GEF720 and TNFRSF12 are very close on chromosome 1. The chromosomal rearrangements in the 1p36.2–36.3 chromosomal region involving TP73 and TNFRSF12 genes are frequently observed in different cancers and in particular in neuroblastoma (Grenet *et al.*, 1998; Nomoto *et al.*, 2000; Hogarty *et al.*, 2000).

GEF720, a new member of the Dbl family with transforming properties, that maps between TP73 and TNFRSF12, thus appears as an interesting candidate gene whose deregulation might prove important for the progression toward neuroblastoma.

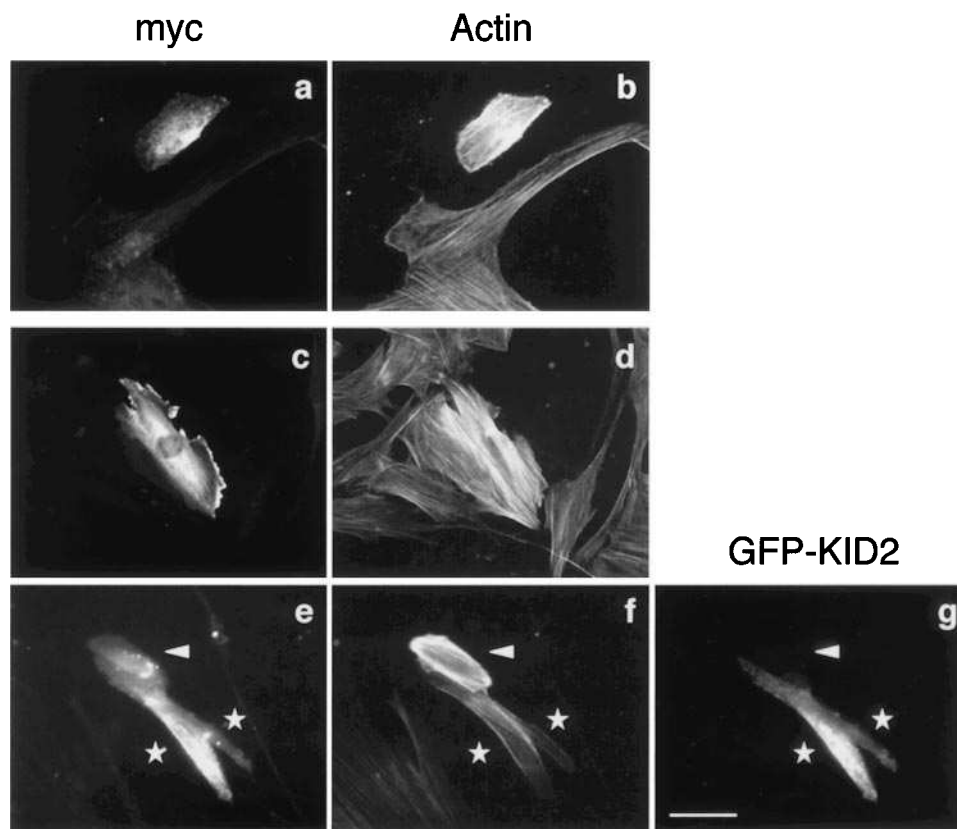


Figure 4 GEF720 induces RhoA dependent stress fiber assembly in fibroblasts. REF52 cells were transfected with constructs expressing *myc*-tagged RhoA-V14 (a) or GEF720 (c,e) and GFP-tagged KID2 (g), actin was visualized with TRITC-phalloidin (b,d,f). Scale bar : 10 μ m

Discussion

We have characterized a new exchange factor from the Dbl family: GEF720. We used the Yeast Exchange Assay and *in vitro* biochemical exchange assays and established that GEF720 can directly catalyse nucleotide exchange on RhoA, as suggested by its homology to PDZ-RhoGEF and p115RhoGEF. GEF720 was not active on RhoB, RhoC, RhoG, Rac1-3 and Cdc42Hs. Expression of GEF720 in REF-52 fibroblastic cells elicited an increase in the level of actin stress fibers, characteristic of RhoA activation and when over-expressed in NIH3T3 cells, GEF720 induced the formation of transformation foci. GEF720 mRNA is expressed almost exclusively in brain and as shown for RhoA activation, it inhibited NGF-induced neurite outgrowth. GEF720 is encoded by a gene located on chromosome 1 next to DR3/APO3 at 1p36.2–1p36.3, a region prone to multiple rearrangements in various human cancers and in developmental disorders. These *in vitro* and *in vivo* studies show that GEF720 is a new brain exchange factor specific for RhoA.

Although Rho-related proteins are essential regulators of many signal transduction pathways (Ridley, 1999), how these GTPases are activated in the cell still remains largely unknown. There are more than 40 GEFs identified and their activities on the 18 Rho-

related GTPases is to be established. To identify and characterize novel exchange factors, we used the consensus for the catalytic DH domain and searched for novel Dbl related proteins in databases. We found a new putative Rho exchange factor, GEF720. GEF720 is related to the p115RhoGEF subgroup of RhoA exchange factors, that contains three closely related GEFs: p115RhoGEF, KIAA380/PDZ-RhoGEF and lsc which share over 50% identity within their DH-PH domains (Fukuhara *et al.*, 1999). Another subgroup related to GEF720 are the proteins similar to p114RhoGEFF: p114-, p190RhoGEF, lbc and lfc, which are also highly homologous in their DH-PH domains (Blomquist *et al.*, 2000). Nevertheless, GEF720 is clearly divergent from these proteins and defines a new branch of RhoA specific exchange factors.

The variety of intracellular pathways controlled by the Rho GTPases is reflected by a still growing family of Dbl related proteins. In particular, 15 Dbl-related exchange factors active on RhoA have been characterized so far, that have ubiquitous or tissue specific expression patterns and that can activate only RhoA or several Rho GTPases: GEF720 (this work), p114RhoGEF (Blomquist *et al.*, 2000), KIAA380/PDZ-RhoGEF (Fukuhara *et al.*, 1999; Rumenapp *et al.*, 1999), GEF337 (De Toledo *et al.*, 2000), p115RhoGEF/Lsc

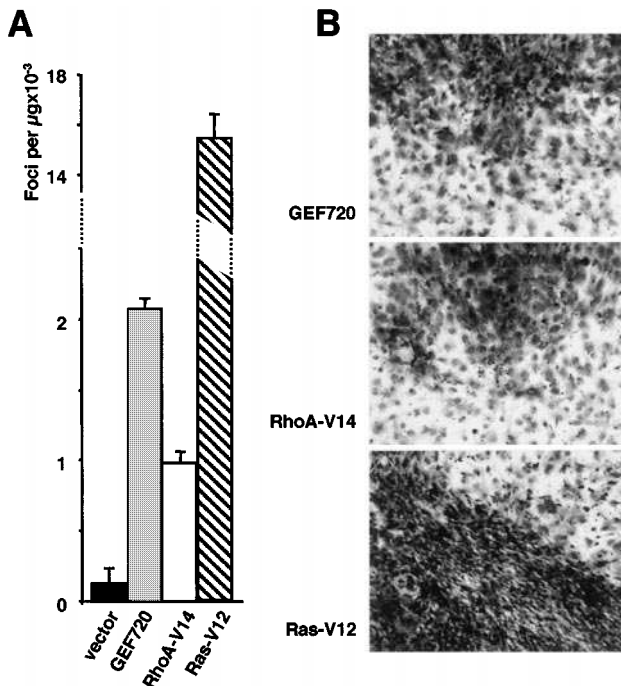


Figure 5 Oncogenic potential of GEF720 in NIH3T3 cells. (a) 50 ng of a plasmid expressing GEF720 (gray bar), RhoA-V14 (white bar) or the empty pRcCMV vector (black bar) or 10 ng of a plasmid expressing Ras-V12 (dashed bar) were transfected in NIH3T3 cells. Foci of transformed cells were scored 2 weeks after transfection. Shown are the average number of foci per μg of transfected DNA with SEM for four plates. (b) Focus morphology of NIH3T3 transfectants. Morphologically transformed foci were photographed 2 weeks after transfection of the plasmids expressing GEF720, RhoA-V14 and Ras-V12

(Kozasa *et al.*, 1998), p190RhoGEF (van Horck *et al.*, 2000), Vav, Vav-2 and Vav-3 (Han *et al.*, 1997; Movilla and Bustelo, 1999; Schuebel *et al.*, 1998), TrioD2 (Bellanger *et al.*, 1998), Ect2 (Tatsumoto *et al.*, 1999), Dbs (Whitehead *et al.*, 1999), Ost (Horii *et al.*, 1994), mNET (Alberts and Treisman, 1998), GEF-H1 and Lbc (Glaven *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1998). There are comparatively many less exchange factors identified for Rac, Cdc42, RhoG or the other Rho GTPases. This may reflect the fact that RhoA functions as a common intracellular switch towards which a broad variety of signaling cascade converge, involving for instance G protein coupled receptors (Fukuhara *et al.*, 1999), integrins (Miranti *et al.*, 1998), or interleukin receptors (Singh *et al.*, 1999). The organization of the cytoskeleton is indeed regulated through a crosstalk between the antagonistic Rac and Rho pathways (Moorman *et al.*, 1999; Sander *et al.*, 1999). These reports show that the activation of RhoA does not result in Rac1 inactivation and that RhoA can induce modifications of the actin cytoskeleton even though Rac1 and Cdc42Hs remain active. On the other hand, activation of Rac1 and Cdc42Hs results in the concomitant inactivation of RhoA (Moorman *et al.*, 1999; Sander *et al.*, 1999 and references therein). These studies suggest that the action of RhoA is dominant on Rac1 and Cdc42Hs. In such a context, the regulation of the

balance between these GTPases would require ubiquitous GEFs to ensure a basal activation of Rac1 and Cdc42Hs, while more tissue or signal specific GEFs would activate RhoA, thereby inhibiting the action of Rac1 and Cdc42. This may explain the many exchange factors identified for RhoA compared to Rac1 and Cdc42Hs.

Our understanding of these RhoA dependent signaling cascades relies on the identification of the specific upstream activators of the exchange factors. In the case of neuronal differentiation, RhoA appears to be involved in different steps of NGF-induced neuronal differentiation (Sebok *et al.*, 1999) suggesting that different RhoA GEFs may be sequentially active or that the same GEF may be activated through different cascades. Identifying the proteins that interact with GEF720, a GEF specifically expressed in adult and fetal brain, should provide new insights in understanding the role of RhoA in controlling neural differentiation pathways.

As shown for Lbc, Lsc and Tim, overexpression of the full length GEF720 can induce focus formation in NIH3T3 cells, without requiring truncation or post-translational modification of the protein as reported for Dbl, Net1, Vav, Vav-2 or Ect2 (Stam and Collard, 1999; Whitehead *et al.*, 1997). Several members of the Dbl family possess a high oncogenic activity. The activation of these cellular proto-oncogenes often occurs through a specific mutation or a chromosomal rearrangement event which results in deregulated activity of the protein (Stam and Collard, 1999). Interestingly GEF720, that exhibits a slight transforming potential, is located at 1p36.2–p36.3 between TP73 and TNFRSF12/DR3/APO3 genes, the polyadenylation signal of GEF720 mRNA being only 846 nucleotides upstream of the first exon of TNFRSF12. The distal part of the short arm of chromosome 1 is among the chromosomal regions most affected by rearrangements; chromosomal alterations within the 1p36 region are often involved in various human cancers (information at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP/mitelsum.cgi>) as well as various developmental disorders and inflammatory diseases (Cho *et al.*, 2000; Knight-Jones *et al.*, 2000; Slavotinek *et al.*, 1999). There has been a great interest in identifying genes located in this chromosomal region to get better understanding of the etiology of the associated diseases. Loss of heterozygosity in the 1p36 region has been associated with most neuroblastoma (Grenet *et al.*, 1998; Hogarty *et al.*, 2000; Ohira *et al.*, 2000) but also lung cancer (Nomoto *et al.*, 2000), breast carcinoma (Ejeskar *et al.*, 2000) or prostate cancer (Ahman *et al.*, 2000) etc. In particular, GEF720 gene is located in a 1 megabase consensus at 1p36.3 which is often deleted in primary neuroblastoma (Hogarty *et al.*, 2000) and which also contains the two genes TNFRSF12/DR3/APO3 (Grenet *et al.*, 1998) and TP73 (Kaghad *et al.*, 1997). There has been a great effort in identifying new genes lying in this 1p36 rearranged region to try and elucidate more precisely the molecular mechanisms controlling the various

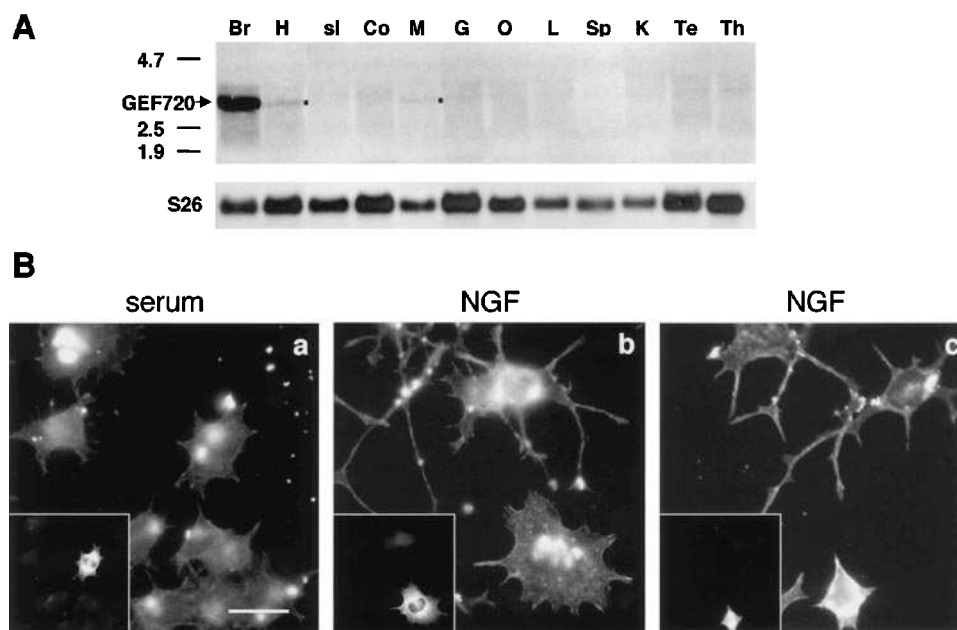


Figure 6 GEF720 is specifically expressed in brain and inhibits neurite outgrowth. (a) GEF720 mRNA distribution in murine tissues. A radiolabeled probe corresponding to nucleotides 598 to 3296 of GEF720 cDNA was hybridized with total RNA blots prepared from the indicated mouse tissues (Br: Brain, H: Heart, sl: small Intestine, Co: Colon, M: Muscle, G: Gut, O: Ovary, L: Lung, Sp: Spleen, K: Kidney, Te: Testis, Th: Thymus). The control probe for 26S mRNA was hybridized with the same membrane as a control. The arrow and dots indicate the bands of GEF720 mRNA. (b) PC12 cells were transfected with constructs expressing *myc*-tagged GEF720 (panels a and c) and grown in serum rich medium (panels a–b) or differentiation medium (panels c–d). Actin was visualized with TRITC-phalloidin (panels b and d). Scale bar: 10 μ m

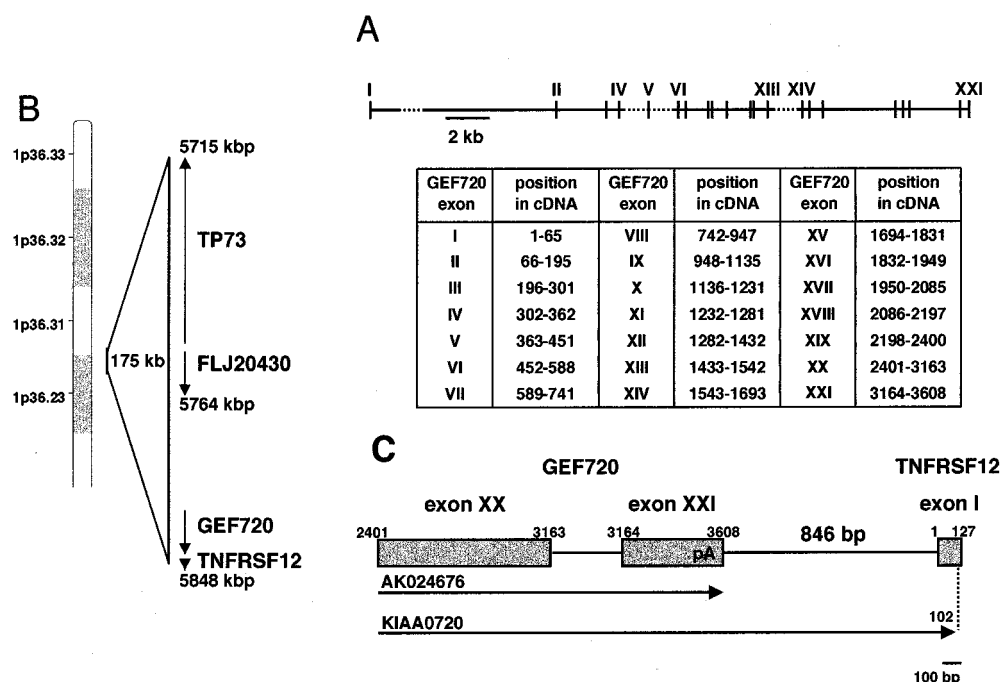


Figure 7 Chromosomal location and organization of GEF720 gene. (a) Schematic representation of GEF720 gene structure. GEF720 exons (I to XXI) on chromosome 1 are represented by vertical bars. Dotted lines correspond to sequences absent from the genomic NT-022059 sequence. Table shows the position of GEF720 exons I to XXI in AK02676 cDNA. (b) Ideogram of the end of chromosome 1 showing the location of GEF720 gene and the closest identified cDNAs at 1p36.2–p36.3. TP73: p53-related tumor protein 73 (accession number XM-001504); FLJ20430: putative protein; TNFRSF12: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12 (accession number NM-003790) also known as DR3 (death receptor 3) WSL1, LARD (lymphocyte-associated receptor of death) and APO3. Approximate position of genes in kilobase pairs is shown. (c) Structure of the chromosomal region between GEF720 and TNFRSF12. Shown are the last two exons of GEF720 (XX and XXI) and the first exon of TNFRSF12, the 846 base pair fragment between the two genes and the end of AK024676 and KIAA0720 cDNAs. pA: position of the polyadenylation signal of GEF720 mRNA

disorders associated with genetic abnormalities in this region and in particular the frequent loss of heterozygosity observed in primary neuroblastoma (Hogarty *et al.*, 2000). In that prospect, GEF720 which is specifically expressed in brain and belongs to the Dbl family, appears as an interesting candidate gene in the control of neuroblastoma progression. Further study on the structure of GEF720 gene and expression of the protein should help in understanding a potential link of RhoA activation with neuroblastoma progression.

Materials and methods

Plasmids and sequence analysis

KIAA0720 cDNA encoding GEF720 (GenBank accession number AB018263) was kindly provided by Dr T Nagase (Kazusa DNA Research Institute, Chiba, Japan). The *SalI*-*BamHI* fragment of KIAA0720 (containing GEF720 aminoacids from L49 to V912) was *myc* tagged in plasmid pRs426MET (Tirode *et al.*, 1997) for yeast expression and in plasmid pRcCMV (In Vitrogen) for tissue culture cell expression. GEF720 DH domain (aminoacids L249 to A445) was fused to GST in pGEX-5X2 (Pharmacia). RhoB was fused to LexA in plasmid pVJL12 (Tirode *et al.*, 1997) and pLexRhoC was a gift from G Zalcman (Institut Curie, Paris, France). All the other yeast expression vectors have been described previously (De Toledo *et al.*, 2000). Sequence analysis were performed using the NCBI facilities at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Protein sequences were aligned using MULTALIN; distance matrixes were computed and used to draw a similarity tree using ClustalW and Treeview (refs in Vignal *et al.*, 2000).

Yeast exchange assay

The yeast exchange assay was performed as described (De Toledo *et al.*, 2000). Briefly, TAT7 or *cdc24^{ts}* 12.1 yeasts expressing the LexA fused wild type (wt) GTPases and GAD-AD (GAD) fused effectors, Rock for RhoA, Kinectin for Rac1 and RhoG and PAK for Cdc42Hs (De Toledo *et al.*, 2000), were transformed with the empty pRs426MET vector or the same plasmid expressing the indicated exchange factors. After selection, the transformants were assayed for β -galactosidase activity by filter or colorimetric assay as described (De Toledo *et al.*, 2000).

In vitro guanine nucleotide exchange assay

GST-fused GTPases and exchange factors were purified from *E. coli* as described (Blangy *et al.*, 2000). For the exchange assay, GDP-loaded RhoA (1 μ M) was incubated at 30°C in exchange buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 μ M GTP- γ S and 1 μ Ci GTP-[γ - 35 S]) in the presence of 1 μ M GST-GEF720 or GST. After 0.5, 5 and 15 min, aliquots of the reaction were filtered on nitrocellulose, rinsed with stop buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$) and the amount of GTP-[γ - 35 S] bound to the GTPase was measured.

Tissue culture cell, immunofluorescence and transformation assays

Rat embryo fibroblasts (REF-52) were cultured at 37°C in the presence of 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% fetal

calf serum (FCS). PC12 cells were cultured at 37°C in the presence of 5% FCS and 10% horse serum (HS). REF-52 cells were plated onto 12 mm glass coverslips and PC12 cells were plated on the same coverslips coated with collagen. Both cell types were transfected using the lipofectamine plus methods (Life Technologies). Four hours after transfection, the medium was replaced with fresh medium. For PC12 differentiation, 48 h after transfection, cells were placed in DMEM with 0.5% HS and 50 ng/ml Nerve Growth Factor (NGF) (Promega). Cells were fixed for immunofluorescence for 5 min in 3.7% formalin in PBS, permeabilized for 2 min with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated in 0.1% Bovine Serum Albumine (BSA) in PBS. The *myc*-tagged proteins were detected using anti-*myc* 9E10 monoclonal antibody followed by anti-mouse 7-Amino-4-MethylCoumarin-3-Acetic acid (AMCA) conjugated antibody (1:50 dilution, Amersham). Actin filaments were stained using a solution of TetramethylRhodamine IsoThioCyanate (TRITC)-phalloidin (0.5 u/ml, Sigma). Cells were washed in PBS, mounted in Mowiol (Aldrich) and observed under a DMR Leica microscope using a 63 $\times$ planapochromat lens. Images were recorded using a micromax 1300Y/HS camera (Princeton Instruments Inc, USA) using the Metamorph acquisition software, transferred to Adobe Photoshop and printed on an Epson Color 750 printer. All transfections were repeated at least three times and at least 100 transfected cells were examined. Transformation assays were performed essentially as described (Schubel *et al.*, 1998). Briefly, NIH3T3 cells were grown at 37°C in the presence of 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% (FCS). Cells were transfected as described above with plasmids expressing Ha-tagged Ras-V12 (2, 10 50 or 500 ng per 60 mm dish), *myc*-tagged RhoA-V14, GEF720 or with the empty pRcCMV vector (5, 200, 500 or 1000 ng per 60 mm dish). When cells reached confluency, the amount of serum was reduced to 4%. Two weeks after transfection, dishes were stained with 0.4% crystal violet in 30% methanol to visualize transformed foci. For each plasmid concentration, three to four dishes were counted.

RNA extraction and Northern blotting

Total RNA was prepared from 6 week adult Swiss mice as described (Chomczynski and Sacchi, 1987). Forty μ g total RNA of each tissue were resolved on a classical 3.7% formaldehyde phosphate-buffered 1.2% agarose gel and transferred onto nitrocellulose membranes and hybridized as described (Coulon *et al.*, 1999) with the α ³²P-dCTP labeled *SalI*-*BamHI* fragment of KIAA0720 and S26 ribosomal protein cDNA (Vincent *et al.*, 1992). After washing, blots were exposed on Kodak Biomax MR film or phosphorimager cassettes.

Acknowledgments

The authors want to thank Jacques Camonis and Gérard Zalcman for the gift of pLexRhoC and Pierre Roux for helpful advice for the transformation assays. M De Toledo was supported by a fellowship from the Ministère de l'Education et de la Recherche (France), V Coulon was supported by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer (France), and S Schmidt was supported by a fellowship from the Recherche Suisse Contre le Cancer (Switzerland). This work was mainly supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée) and for a minor part by the Association pour la Recherche contre le Cancer.

References

- Aghazadeh B, Zhu K, Kubiseski TJ, Liu GA, Pawson T, Zheng Y and Rosen MK. (1998). *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1098–1107.
- Ahman AK, Jonsson BA, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M and Gronberg H. (2000). *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 292–296.
- Alberts AS, Bouquin N, Johnston LH and Treisman R. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 8616–8622.
- Alberts AS and Treisman R. (1998). *EMBO J.*, **17**, 4075–4085.
- Amler LC, Bauer A, Corvi R, Dihlmann S, Praml C, Cavenee WK, Schwab M and Hampton GM. (2000). *Genomics*, **64**, 195–202.
- Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B and Abo A. (1998). *Curr. Biol.*, **8**, 1125–1128.
- Bellanger JM, Lazaro JB, Diriong S, Fernandez A, Lamb N and Debant A. (1998). *Oncogene*, **16**, 147–152.
- Blangy A, Vignal E, Schmidt S, Debant A, Gauthier-Rouviere C and Fort P. (2000). *J. Cell. Sci.*, **113**, 729–739.
- Blomquist A, Schworer G, Schabowski H, Psoma A, Lehnen M, Jakobs KH and Rumenapp U. (2000). *Biochem. J.*, **352** Pt 2, 319–325.
- Caron H, Spieker N, Godfried M, Veenstra M, van Sluis P, de Kraker J, Voute P and Versteeg R. (2001). *Genes Chromosomes Cancer*, **30**, 168–174.
- Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, Fields CT, Rabenau K, Corradino S, Brant SR, Espinosa R, LeBeau M, Hanauer SB, Bodzin J and Bonen DK. (2000). *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1425–1432.
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987). *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES and Hynes RO. (2000). *Nature*, **406**, 532–535.
- Coulon V, Veyrune JL, Tourkine N, Vie A, Hipskind RA and Blanchard JM. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 30439–30446.
- De Toledo M, Colombo K, Nagase T, Ohara O, Fort P and Blangy A. (2000). *FEBS Lett.*, **480**, 287–292.
- Ejeskar K, Abel F, Sjöberg R, Backstrom J, Kogner P and Martinsson T. (2000). *Cytogenet. Cell. Genet.*, **89**, 62–66.
- Eva A and Aaronson SA. (1985). *Nature*, **316**, 273–275.
- Fort P. (1999). In P. Jeanteur (ed.) *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Vol. 22, pp. 159–181.
- Fukuhara S, Chikumi H and Gutkind JS. (2000). *FEBS Lett.*, **485**, 183–188.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T and Gutkind JS. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 5868–5879.
- Fukushima S, Yamada T, Hashiguchi A, Nakata Y and Hata J. (2000). *Exp. Hematol.*, **28**, 391–400.
- Gauthier-Rouviere C, Vignal E, Mérianne M, Roux P, Montcourier P and Fort P. (1998). *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 1379–1394.
- Glaven JA, Whitehead IP, Nomanbhoy T, Kay R and Cerione RA. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 27374–27381.
- Grenet J, Valentine V, Kitson J, Li H, Farrow SN and Kidd VJ. (1998). *Genomics*, **49**, 385–393.
- Han J, Das B, Wei W, Van Aelst L, Mosteller RD, Khosravi-Far R, Westwick JK, Der CJ and Broek D. (1997). *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1346–1353.
- Hart MJ, Sharma S, elMasry N, Qiu RG, McCabe P, Polakis P and Bollag G. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 25452–25458.
- Heilstedt HA, Shapira SK, Gregg AR and Shaffer LG. (1999). *Clin. Genet.*, **56**, 123–128.
- Hogarty MD, Liu X, Guo C, Thompson PM, Weiss MJ, White PS, Sulman EP, Brodeur GM and Maris JM. (2000). *Med. Pediatr. Oncol.*, **35**, 512–515.
- Horii Y, Beeler JF, Sakaguchi K, Tachibana M and Miki T. (1994). *EMBO J.*, **13**, 4776–4786.
- Janssen JW, Braunger J, Ballas K, Faust M, Siebers U, Steenvoorden AC and Bartram CR. (1999). *Int. J. Cancer*, **80**, 857–862.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D. (1997). *Cell*, **90**, 809–819.
- Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS and Der CJ. (1995). *Mol. Cell Biol.*, **15**, 6443–6453.
- Knight-Jones E, Knight S, Heussler H, Regan R, Flint J and Martin K. (2000). *Dev. Med. Child Neurol.*, **42**, 201–206.
- Kourlas PJ, Strout MP, Becknell B, Veronese ML, Croce CM, Theil KS, Krahe R, Ruutu T, Knuutila S, Bloomfield CD and Caligiuri MA. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2145–2150.
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G and Sternweis PC. (1998). *Science*, **280**, 2109–2111.
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H and Gal A. (2000). *Nat. Genet.*, **26**, 247–250.
- Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, Tan I, Leung T and Lim L. (1998). *Mol. Cell*, **1**, 183–192.
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A and Ashkenazi A. (1998). *Curr. Biol.*, **8**, 525–528.
- McWhirter JR and Wang JY. (1997). *Oncogene*, **15**, 1625–1634.
- Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC and Knaus UG. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 185–189.
- Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS and Shattil SJ. (1998). *Curr. Biol.*, **8**, 1289–1299.
- Moorman JP, Luu D, Wickham J, Bobak DA and Hahn CS. (1999). *Oncogene*, **18**, 47–57.
- Movilla N and Bustelo XR. (1999). *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7870–7885.
- Murphy GA, Solski PA, Jillian SA, Perez de la Ossa P, D'Eustachio P, Der CJ and Rush MG. (1999). *Oncogene*, **18**, 3831–3845.
- Noguchi T, Galland F, Batoz M, Mattei MG and Birnbaum D. (1988). *Oncogene*, **3**, 709–715.
- Nomoto S, Haruki N, Tatematsu Y, Konishi H, Mitsudomi T and Takahashi T. (2000). *Genes Chromosomes Cancer*, **28**, 342–346.
- Ohira M, Kageyama H, Mihara M, Furuta S, Machida T, Shishikura T, Takayasu H, Islam A, Nakamura Y, Takahashi M, Tomioka N, Sakiyama S, Kaneko Y, Toyoda A, Hattori M, Sakaki Y, Ohki M, Horii A, Soeda E, Inazawa J, Seki N, Kuma H, Nozawa I and Nakagawara A. (2000). *Oncogene*, **19**, 4302–4307.
- Olson MF, Paterson HF and Marshall CJ. (1998). *Nature*, **394**, 295–299.
- Ren Y, Li R, Zheng Y and Busch H. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 34954–34960.
- Ridley AJ. (1999). *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **22**, 1–22.
- Roux P, Gauthier-Rouviere C, Doucet-Brutin S and Fort P. (1997). *Current Biol.*, **7**, 629–637.

- Rumenapp U, Blomquist A, Schworer G, Schablowski H, Psoma A and Jakobs KH. (1999). *FEBS Lett.*, **459**, 313–318.
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van Der Kammen RA and Collard JG. (1999). *J. Cell Biol.*, **147**, 1009–1022.
- Schuebel KE, Movilla N, Rosa JL and Bustelo XR. (1998). *EMBO J.*, **17**, 6608–6621.
- Sebok A, Nusser N, Debreceni B, Guo Z, Santos MF, Szeberenyi J and Tigyi G. (1999). *J. Neurochem.*, **73**, 949–960.
- Singh R, Wang B, Shirvaikar A, Khan S, Kamat S, Schelling JR, Konieczkowski M and Sedor JR. (1999). *J. Clin. Invest.*, **103**, 1561–1570.
- Slavotinek A, Shaffer LG and Shapira SK. (1999). *J. Med. Genet.*, **36**, 657–663.
- Stam JC and Collard JG. (1999). In Jeanteur P. (ed). *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Vol. 22, pp. 51–83.
- Stiewe T and Putzer BM. (2000). *Nat. Genet.*, **26**, 464–469.
- Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto T and Miki T. (1999). *J. Cell Biol.*, **147**, 921–928.
- Tirode F, Malaguti C, Romero F, Attar R, Camonis J and Egly JM. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 22995–22999.
- van Horck FP, Ahmadian MR, Haeusler LC, Moolenaar WH and Kranenburg O. (2000). *J. Biol. Chem.*, **276**, 4948–4956.
- Vignal E, De Toledo M, Comunale F, Ladopoulou A, Gauthier-Rouviere C, Blangy A and Fort P. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 36457–36464.
- Vincent S, Jeanteur P and Fort P. (1992). *Mol. Cell Biol.*, **12**, 3138–3148.
- Whitehead IP, Campbell S, Rossman KL and Der CJ. (1997). *Biochim. Biophys. Acta.*, **1332**, F1–23.
- Whitehead IP, Lambert QT, Glaven JA, Abe K, Rossman KL, Mahon GM, Trzaskos JM, Kay R, Campbell SL and Der CJ. (1999). *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7759–7770.

ANNEXE III

Publication n°5 :

The carboxylic terminus of the metabotropic glutamate receptor subtypes 2 and 7 specifies the receptor signaling pathways. J Biol Chem, sous presse.

The C Terminus of the Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes 2 and 7 Specifies the Receptor Signaling Pathways*

Received for publication, July 20, 2001, and in revised form, September 11, 2001
Published, JBC Papers in Press, October 2, 2001, DOI 10.1074/jbc.M106876200

Julie Perroy‡, Gustavo J. Gutierrez§, Vincent Coulon¶, Joel Bockaert‡, Jean-Pilippe Pin‡, and Laurent Fagni‡

From the ‡CNRS, UPR 9023, CCIPE, 34094 Montpellier Cedex 5, France, §EMBL, Meyerhofstrasse 1, Heidelberg D-69117, Germany, and ¶Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR 5535 CNRS, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

There is accumulating evidence that the specificity of the transduction cascades activated by G protein-coupled receptors cannot solely depend on the nature of the coupled G protein. To identify additional structural determinants, we studied two metabotropic glutamate (mGlu) receptors, the mGlu2 and mGlu7 receptors, that are both coupled to G_o proteins but are known to affect different effectors in neurons. Thus, the mGlu2 receptor selectively blocks N- and L-type Ca^{2+} channels via a protein kinase C-independent pathway, whereas the mGlu7 receptor selectively blocks P/Q-type Ca^{2+} channels via a protein kinase C-dependent pathway, and both effects are pertussis toxin-sensitive. We examined the role of the C-terminal domain of these receptors in this coupling. Chimeras were constructed by exchanging the C terminus of these receptors and transfected into neurons. Different chimeric receptors bearing the C terminus of mGlu7 receptor blocked selectively P/Q-type Ca^{2+} channels, whereas chimeras bearing the C terminus of mGlu2 receptor selectively blocked N- and L-type Ca^{2+} channels. These results show that the C terminus of mGlu2 and mGlu7 receptors is a key structural determinant that allows these receptors to select a specific signaling pathway in neurons.

The physiological actions of most neurotransmitters are mediated by activation of both ionotropic and G protein-coupled receptors (GPCRs¹ or metabotropic receptors). For instance, the metabotropic receptors activated by the excitatory neurotransmitter, glutamate, play crucial roles in synaptic plasticity, neurotoxicity, as well as neuroprotection. These effects result from a large variety of regulations such as direct mediation of glutaminergic synaptic transmission or modulation of neurotransmitter release or membrane excitability (1). Transduction of extracellular signals to intracellular responses via GPCR

includes stimulation of the receptor, activation of a trimeric G protein, and subsequent mobilization of specific effectors. The regions of the receptor involved in G protein activation have been studied extensively (2). The second intracellular loop of mGlu receptors is responsible for the selective recognition of the G protein α subunit (3, 4), whereas all other receptor intracellular segments control the coupling efficacy (4).

Eight genes encoding mGlu receptors have been identified and classified into three groups, according to their sequence and intracellular signaling. The group I mGlu receptors (mGlu1 and -5) are coupled to G_q -like proteins and activate phospholipase C, whereas the group II (mGlu2 and -3) and group III (mGlu4 and -6–8) receptors are coupled to G_i/G_o proteins and inhibit cAMP formation (5, 6). The signaling cascades of mGlu receptors seem, however, to be far more complex than these consensual pathways. These receptors can indeed activate cGMP phosphodiesterase (7), phospholipase D (8), phospholipase A_2 (9), and mitogen-activated protein kinase cascades (10). Through these pathways, the mGlu receptors can control ionic channel activities (11–13). Thus it is remarkable that mGlu receptors activating the same group of G proteins inhibit distinct Ca^{2+} channel subtypes (14–16). A series of studies (17–20) have suggested that G protein β subunits may be essential for the specific coupling of various metabotropic neurotransmitter receptors to Ca^{2+} channels, but others (21–24) have shown that the same G protein $\beta\gamma$ subunit combination can inhibit different Ca^{2+} channel subtypes and vice versa. The mGlu receptors have even been shown to activate directly effectors and generate cellular responses independently of G protein activation (25). This large variety of mGlu receptor actions together with the limited number of functional G protein subunit combinations (26) suggest that the signaling cascade specificity of a given GPCR cannot arise solely from the nature of the activated G protein. The aim of the present study was to examine whether receptor structural determinants are involved in the specificity of GPCR signaling.

To address this issue we studied two GPCRs, the mGlu2 and mGlu7 receptor subtypes. These receptors are both coupled to G_i/G_o proteins but trigger different second messenger cascades, in cultured cerebellar granule cells. Thus, both receptors activate a pertussis toxin-sensitive G protein, but the mGlu2 receptor selectively blocks N- and L-type Ca^{2+} channels (15), whereas the mGlu7 receptor blocks the P/Q-type Ca^{2+} channels (27). Moreover, the effect of the mGlu7 (27) but not mGlu2 (15) receptor is PKC-dependent. To examine the possible role of the C-terminal intracellular domain of these receptors in specifying their transduction cascade, the coupling to N- and L- or P/Q-type Ca^{2+} channels of chimeric receptors bearing either the C-terminal domain of mGlu2 or that of mGlu7 was examined in cultured cerebellar granule cells. We found that the C

* This work was supported by grants from the CNRS, Fondation pour la Recherche Médicale, Bayer (to J. B.), Association Française contre les Myopathies (to L. F.), Retina France, Ligue Nationale Contre le Cancer (to V. C.), Action Incitative Physique et Chimie du Vivant from CNRS (00-134), and Molécule et Cibles Thérapeutiques program from INSERM and CNRS (to J. P. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: CNRS, UPR 9023, CCIPE, 141 Rue de la Cardonille, 34000 Montpellier, France. Tel.: 33 467 142 945; Fax: 33 467 542 432; E-mail: fagni@bachus.montp.inserm.fr.

¹ The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; mGlu, metabotropic glutamate; PKC, protein kinase C; DHPG, dihydroxyphenyl glycine; GFP, green fluorescent protein; DL-AP4, DL-amino-phosphonobutylate; IP, inositol phosphate.

terminus of the mGlu7 receptor was necessary and sufficient to select a PKC-dependent inhibitory pathway specific to the P/Q-type Ca^{2+} channel, whereas the C terminus of the mGlu2 receptor was necessary and sufficient for a PKC-independent inhibition of N- and L-type Ca^{2+} channels. These findings reveal a new role of the C terminus of mGlu2 and mGlu7 receptors in specifying their respective transduction cascades downstream from the G protein activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Primary cultures of cerebellar cells were prepared as described previously (28). Briefly, 1-week-old newborn mice were decapitated and the cerebellum dissected. The tissue was then gently triturated using fire-polished Pasteur pipettes, and the homogenate was centrifuged at 500 rpm. The pellet was resuspended and plated in tissue culture dishes previously coated with poly-L-ornithine. Cells were maintained in a 1:1 mixture of Dulbecco's minimum essential medium and F-12 nutrient (Life Technologies, Inc.) supplemented with glucose (30 mM), glutamine (2 mM), sodium bicarbonate (3 mM), HEPES buffer (5 mM), decalcified fetal calf serum (10%), and 25 mM KCl to improve neuronal survival. One-week-old cultures contained 1×10^6 cells.

Plasmids and Transfection—The chimeric receptors were constructed as follows. The mGlu2/7 and mGlu7/2 chimeras were obtained by exchanging the C-terminal region proximal to the seventh transmembrane domain of the mGlu7a receptor (beginning with HPELN-VQKRR) with its homologous mGlu2 receptor domain (beginning with QPQKNVSHR) (see Fig. 2), using the polymerase chain reaction overlap method (29). The construction of the mGlu1/2 chimera containing the N-terminal extracellular domain of the mGlu1 receptor and the heptahelical and C-terminal regions of the mGlu2 receptor has been described previously (30). The mGlu1/2/7 chimera was constructed by replacing the fragment encoding the 3'-half of the mGlu1/2 chimera by that of the mGlu2/7 chimera, using the *Bsr*GI and *Xba*I restriction sites of the mGlu2 receptor heptahelical domain coding sequence and the pRK5 poly-linker, respectively.

The wild type and chimeric receptors were tested for their coupling to G protein using the method that we described previously (31). Briefly, inositol phosphate (IP) accumulation was measured in HEK-293 cells co-transfected with the tested receptor and a recombinant G protein. The mGlu1 receptor was co-transfected with a GHQ protein, whereas the mGlu2, mGlu7a, mGlu2/7, mGlu7/2, mGlu1/2, and mGlu1/2/7 receptors were co-transfected with a chimeric G_{q19} protein. In the G_{q19} chimeric protein, the C-terminal 9 residues of the G protein α_q subunit were replaced by those of the G protein α_{12} subunit, enabling the coupling of the receptors to phospholipase C (4, 30, 31).

Immediately before plating, cerebellar cultures were co-transfected with the mGlu2 or mGlu7a receptors or one of the chimeras, and the transfection marker green fluorescent protein (GFP)-containing plasmid, pEGFP-N1 (CLONTECH), using the transfection lipid, Transfast (32).

The wild type mGlu7a and chimeric mGlu7/2 receptors were tagged at their N terminus with a Myc epitope, as described previously (27). The presence of these Myc-tagged proteins at the cell surface was examined in living (non-permeabilized) cultured neurons. Cells were exposed for 30 min at 37 °C to a polyclonal rabbit anti-Myc (1/300; ABR, Inc.) primary antibody and then rinsed, fixed in a 4% paraformaldehyde, 0.1 M glucose-containing phosphate-buffered saline solution, and exposed for 2 h at room temperature to a goat Texas Red-conjugated anti-rabbit IgG (1/1000; Jackson ImmunoResearch). Cells were then rinsed with phosphate-buffered saline and mounted on a glass coverslip for observation on an Axiophot 2 Zeiss microscope. The intensity of Myc immunolabeling was measured on the cell body using the NIH Image program (Wayne Rasband). The ratio of total fluorescence of the cell body area over background (noise) fluorescence was determined in non-saturating conditions of the camera. The fluorescence values were then averaged and compared between neurons transfected with N-Myc-mGlu7a and -mGlu7/2 receptors.

Electrophysiology—We used the whole-cell patch clamp configuration to record Ba^{2+} current (IBa) from GFP-expressing (mGlu receptor co-transfected) cerebellar granule cells, after 9 ± 1 days *in vitro*, as described previously (32). The bathing medium contained (in mM) BaCl_2 (20), HEPES (10), tetraethylammonium acetate (10), tetrodotoxin (3×10^{-4}), glucose (10), sodium acetate (120), and MK-801 (1×10^{-3}), adjusted to pH 7.4 with NaOH and 330 mosm with sodium acetate. Drug solutions were prepared in this medium, and pH was readjusted

to 7.4. The N-methyl-D-aspartic acid receptor channel blocker, MK-801 (1 μM), was added to all solutions to avoid activation of this receptor by the D-isoform of DL-AP4.² Patch pipettes were made from borosilicate glass, coated with Sylgard, and their tip fire-polished. Pipettes had resistances of 3–5 megohms when filled with the following internal solution (in mM): cesium acetate (100), MgCl_2 (2), HEPES (10), glucose (15), CsCl (20), EGTA (20), Na_2ATP (2), and cAMP (1) adjusted to pH 7.2 with CsOH and 300 mosm with cesium acetate.

Barium currents were evoked by 500-ms voltage clamp pulses, from a holding potential of -80 mV, to a test potential of 0 mV, applied at a rate of 0.1 Hz. Current signals were recorded using an Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), filtered at 1 kHz with an 8-pole Bessel filter, and sampled at 3 kHz on a Pentium II PC computer. Analyses were performed using the pClamp6 program of Axon Instruments. Barium currents were measured at their peak amplitude and values expressed as mean $\pm$ S.E. of the indicated number (*n*) of experiments. The Student's *t* test ($p \leq 0.05$) was used for comparison.

Materials—DL-Aminophosphonobutyrate (DL-AP4), dihydroxyphenyl glycine (DHPG), and MK-801 were purchased from Tocris Cockson (UK). Nimodipine and GF109203X were purchased from Research Biochemicals. ω -Agatoxin-IVA and ω -conotoxin-GVIA were from Alomone Labs (Israel). LY354740 was a generous gift from D. Schoepp (Lilly). An antibody raised against the G_o protein was a generous gift from V. Homburger. This antibody has been shown previously to recognize specifically the G protein α_o subunit but not the α_i subunit (33).

RESULTS

Selective Blockade of Distinct Subtypes of Ca^{2+} Channels by the mGlu2 and mGlu7 Receptors—The effect of mGlu2 and mGlu7 receptors on Ba^{2+} currents (IBa) was studied in cultured cerebellar granule cells transfected with GFP alone (control) or in combination with either one of these receptors. In control neurons, the selective P/Q-type (ω -agatoxin-IVA; 250 nM), N-type (ω -conotoxin-GVIA; 1 μM) and L-type (nimodipine; 1 μM) Ca^{2+} channel blockers inhibited 41, 10, and 22% IBa, respectively. The remaining 27% IBa resulted from activation of the R-type Ca^{2+} channels. Similar data were obtained in non-transfected neurons (15) or neurons co-transfected with GFP and either the mGlu7 (Fig. 1A) or mGlu2 (Fig. 1C) receptors. These results indicated that the transfection procedure did not alter functional expression of the native Ca^{2+} channels.

As previously shown, the group III mGlu receptor agonist, DL-AP4 (500 μM), had no significant effect on IBa, in non-transfected or control (transfected with GFP alone) cerebellar granule cells (27), indicating the absence of mGlu7 receptor in the soma of these cells. After transfection, the mGlu7 receptor was expressed in the cell body, which allowed us to study the effect of this receptor on IBa (27). Under this condition, DL-AP4 selectively blocked IBa, and the inhibitory effect of this drug on IBa²⁺ was additive with those of ω -conotoxin-GVIA and nimodipine but not with that of ω -agatoxin-IVA (Fig. 1B). These results indicated that the transfected mGlu7 receptor blocked specifically P/Q-type Ca^{2+} channels.

In non-transfected (15, 34) as in mGlu2 receptor-transfected neurons (Fig. 1D), the mGlu2 receptor agonist, LY354740 (1 μM), selectively inhibited N- and L-type Ca^{2+} channels. Because cultured cerebellar granule cells express native mGlu2 receptor, LY354740 could activate both the endogenous and the transfected mGlu2 receptors. To rule out any activation of the endogenous receptor, we constructed the so-called mGlu1/2 chimeric receptor that harbored the N-terminal domain of the mGlu1 receptor and the seven transmembranes with C-terminal domains of the mGlu2 receptor (Fig. 2). This chimera was transfected in cultured cerebellar granule cells and activated with the group I mGlu receptor agonist, DHPG (400 μM). Because of the presence of native mGluR1 receptors in granule neurons, DHPG was applied in the presence of Bay36-7620 (10

² J. Perroy, G. J. Gutierrez, V. Coulon, J. Bockaert, J.-P. Pin, and L. Fagni, unpublished observations.

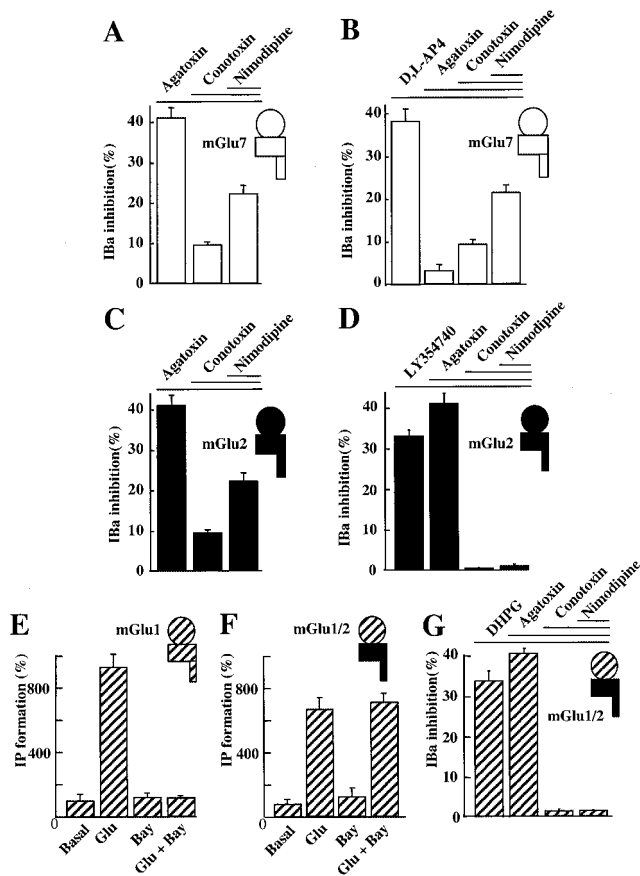


FIG. 1. Inhibitory effects of transfected mGlu2, mGlu7, or mGlu1/2 receptors on IBa. *A–D* and *G*, inhibitory effects of the indicated drugs and toxins (250 nM ω -agatoxin-IVA, 1 μ M ω -conotoxin-GVIA, 1 μ M nimodipine, 500 μ M DL-AP4, 1 μ M LY354740, and 400 μ M DHPG) obtained in cultured cerebellar granule cells co-transfected with GFP and either the mGlu7 (*A* and *B*), mGlu2 (*C* and *D*), or mGlu1/2 receptor (*G*). Each bar of histogram represents the mean ($\pm$ S.E.) of at least eight experiments. *E* and *F*, Bay36-7620 is selective for the mGlu1 over the mGlu1/2 receptor. IP accumulation was measured in HEK-293 cells transiently expressing mGlu1 (*E*) or mGlu1/2 (*F*) receptors and incubated in the presence of 1 mM glutamate (Glu), 10 μ M Bay36-7620, or both. The data are expressed as the percentage of basal IP formation obtained in the absence of drug (*Basal*). Each bar of histogram represents the mean $\pm$ S.E. of four independent experiments performed in triplicate.

μ M), a non-competitive and highly selective mGlu1 receptor antagonist that acts within the transmembrane domains of this receptor (30). Thus, this antagonist blocked the native (32) or recombinant mGlu1 receptor (Fig. 1*E*) but not the mGlu2 (30) or mGlu1/2 receptor (Fig. 1*F*). In neurons transfected with the mGlu1/2 receptor, DHPG induced similar IBa inhibition (Fig. 1*G*) as the mGlu2 receptor agonist (Fig. 1*D*), indicating that the transfected mGlu1/2 receptor displayed similar selective coupling to N- and L-type Ca^{2+} channels, as the native mGlu2 receptor, in the same cells.

In cerebellar granule cells co-transfected with the mGlu7 and mGlu1/2 receptors, the respective receptor agonists induced selective and additive inhibitions of P/Q- and N-/L-type Ca^{2+} channels (Fig. 3). Thus co-transfection and overexpression of the mGlu1/2 and mGlu7 receptors did not change the selective coupling of these receptors to distinct Ca^{2+} channels in the studied neurons.

We have shown previously that in neurons transfected with the mGlu7 receptor, intracellular injection of a specific antibody raised against the G protein α_o subunit blocked the inhibitory effect of DL-AP4 on IBa, without significantly altering the current density in the absence of agonist (27). Here, the same

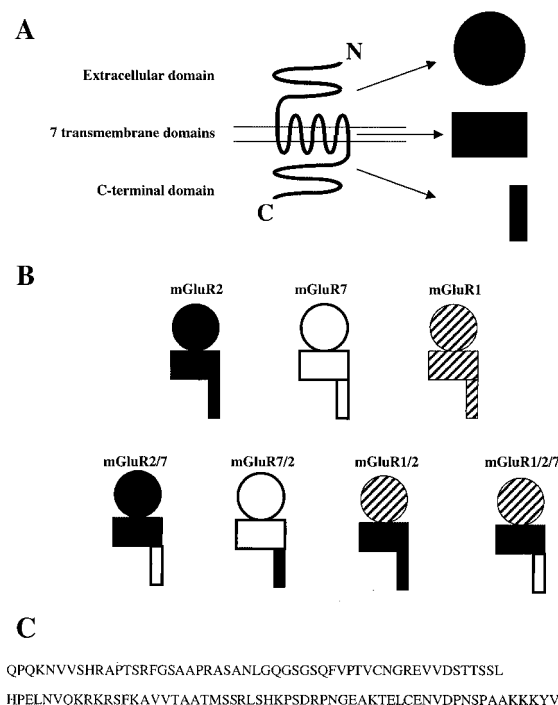


FIG. 2. Schematic representation of wild type and chimeric mGlu receptors. *A*, the circle, horizontal box, and vertical box represent the extracellular N-terminal, transmembrane, and intracellular C-terminal domains of mGlu receptors, respectively. *B*, schematic representation of the wild type and chimeric constructions. *C*, amino acid sequence of the exchanged C-terminal domains of mGlu2 and mGlu7 receptors.

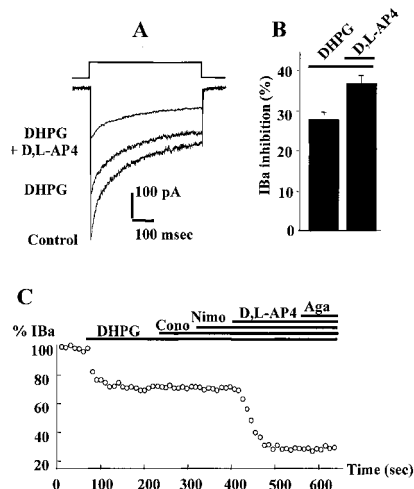


FIG. 3. Additive inhibitory effects of the mGlu1/2 and mGlu7 receptors on IBa, in mGlu1/2, and mGlu7 co-transfected cerebellar granule cells. *A*, IBa recorded in a co-transfected neuron, in the absence (*control*) or presence of the indicated drugs. *B*, inhibitory effects of the mGlu7 (DL-AP4) and mGlu1/2 (DHPG) agonists on IBa. Each bar of histogram represents the mean ($\pm$ S.E.) of at least seven experiments. Note that the mGlu7 and mGlu1/2 agonists induced similar IBa inhibitions as in neurons transfected with mGlu7 or mGlu1/2 alone (Fig. 1, *B* and *G*). *C*, time course of the inhibitory effect of the indicated drugs and toxins.

antibody injected in mGlu2-transfected neurons antagonized the inhibitory effect of LY354740 on IBa (LY354740 induced $12 \pm 2\%$ inhibition; $n = 7$). The boiled antibody was without effect. These results showed that both mGlu2 and mGlu7 receptors acted via a G_o protein.

The C Terminus of mGlu2 and mGlu7 Receptors Determines Their Coupling Selectivity to Ca^{2+} Channels—We investigated

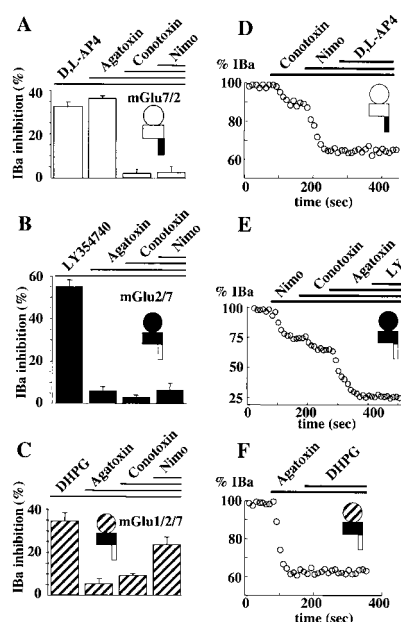


FIG. 4. Inhibitory effect of the mGlu7/2, mGlu2/7, or mGlu1/2/7 receptors on IBA in transfected cerebellar granule cells. A–C, inhibitory effects of agonist and toxins on IBA. Each bar of histogram represents the mean ($\pm$ S.E.) of at least 10 experiments. D–F, inhibitory effect of reversed applications of the agonists and toxins on IBA. Each graph was obtained from a different single neuron and was representative of at least 5 other cells. Note the selective blockade of N- and L-type IBA by the mGlu7/2 receptor agonist (DL-AP4) in A and D, N-; L- and P/Q-type IBA by the mGlu2/7 receptor agonist (LY354740) in B and E; P/Q-type IBA by the mGlu1/2/7 receptor agonist (DHPG) in C and F.

the role of the C terminus of mGlu2 and mGlu7 receptors in the selective coupling of these receptors to Ca^{2+} channels. To this end, we exchanged the C terminus of the mGlu2 and mGlu7 receptors to obtain the reciprocal mGlu2/7 and mGlu7/2 chimeras (Fig. 2, A and B). The amino acid sequences of the exchanged C-terminal regions are represented in Fig. 2C. In mGlu7/2-transfected neurons, DL-AP4 inhibited 32% of IBA. The remaining IBA was not significantly affected by ω -conotoxin-GVIA or nimodipine. However, the current was further depressed by ω -agatoxin-IVA (Fig. 4A) and in similar proportions as in control cells (compare with Fig. 1A). These results show that exchanging the C terminus of mGlu7 receptor with the one of mGlu2 receptor switched the selective coupling of the mGlu7 receptor to that of the mGlu2 receptor. No statistical difference was observed between cell surface immunolabeling of the mGlu7 and mGlu7/2 receptors (immunofluorescence values: 7.0 ± 0.6 , $n = 10$; 7.4 ± 0.8 , $n = 10$, respectively; $p \leq 0.05$), indicating that the difference observed in the selective coupling of these receptors to Ca^{2+} channels could not result from differential cell surface expression of the receptors.

In mGlu2/7-transfected cells, LY354740 blocked 55% of IBA. Following this inhibition, neither ω -conotoxin-GVIA, nimodipine, nor ω -agatoxin-IVA further inhibited IBA (Fig. 4B). These results were consistent with a blockade of P/Q-type as well as N- and L-type Ca^{2+} channels by the mGlu2 receptor agonist, probably through activation of the transfected mGlu2/7 and native mGlu2 receptors, respectively. To avoid any activation of the endogenous mGlu2 receptor, we transfected the mGlu1/2/7 receptor construct (N terminus of mGlu1 with the seven transmembrane domains of mGlu2 and the C terminus of mGlu7; Fig. 2) and stimulated this chimera with DHPG, in the presence of Bay36-7620. Under these conditions, DHPG inhibited 34% of IBA. Application of ω -conotoxin-IVA and nimodipine, in the presence of these drugs, inhibited 9 and 23% of total IBA, whereas ω -agatoxin-IVA had no significant additional effect

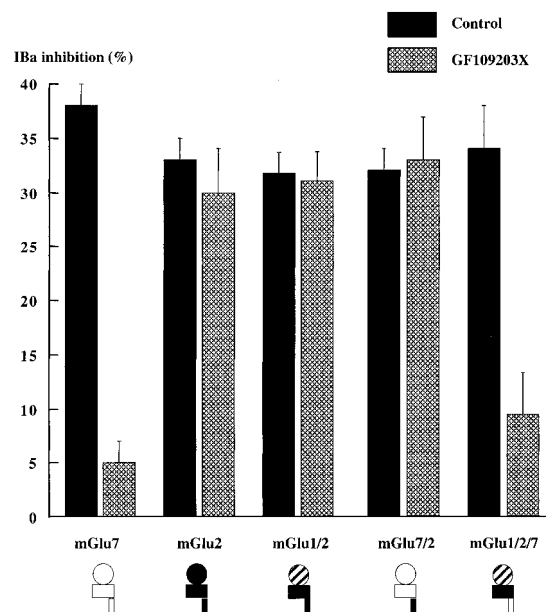


FIG. 5. Involvement of a PKC pathway in mGlu7- and mGlu1/2/7- but not in mGlu2-, mGlu1/2-, or mGlu7/2-mediated inhibitions of IBA in transfected cerebellar granule cells. Mean ($\pm$ S.E.; $n = 5$ to 10) fractional reduction of the IBA induced by DL-AP4 (500 μM) in mGlu7 and mGlu7/2 transfected neurons, LY354740 (1 μM) in mGlu2 transfected neurons and DHPG (400 μM), in mGlu1/2 and mGlu1/2/7 transfected neurons, treated or not for 30 min with the PKC inhibitor, GF109203X (10 μM).

(Fig. 4C). These results indicated that DHPG blocked selectively P/Q-type Ca^{2+} channels. In a separate series of experiments, an initial application of a given channel blocker was immediately followed by application of the transfected receptor agonist. Thus, in mGlu7/2 receptor-transfected cells, after blockade of N- and L-type Ca^{2+} channels with ω -conotoxin-GVIA and nimodipine, respectively, the resistant IBA was not affected by subsequent application of DL-AP4 (Fig. 4D). In mGlu2/7-transfected cells, after blockade of N-, L-, and P/Q-type Ca^{2+} channels with ω -conotoxin-GVIA, nimodipine, and ω -agatoxin-IVA, the drug/toxin-insensitive IBA was not further depressed by application of LY354740 (Fig. 4E). Finally, in mGlu1/2/7 receptor-transfected cells, after blockade of P/Q-type Ca^{2+} channels with ω -agatoxin-IVA, DHPG did not further inhibit the remaining IBA (Fig. 4F). Altogether these results indicated that exchanging the C terminus of mGlu2 with the one of mGlu7 receptor switched the selective coupling of mGlu2 to the one of mGlu7 receptor.

We verified that the switch in the coupling to Ca^{2+} channels by exchanging mGlu receptor C termini resulted from a switch in the receptor signaling pathway. The PKC inhibitor, GF109203X (10 μM), strongly reduced the amount of mGlu7 or mGlu1/2/7 receptor-induced IBA inhibition without affecting mGlu2, or mGlu1/2, or mGlu7/2 receptor-induced inhibition (Fig. 5). These results indicated that the C terminus of mGlu2 and mGlu7 receptors specified the receptor signaling pathway, and thus the selectivity of the receptor coupling to Ca^{2+} channels, in neurons.

DISCUSSION

As reviewed in Table I, our results show for the first time that the C terminus of mGlu2 and -7 receptors is a molecular determinant involved in the selectivity of coupling to specific effectors. To characterize this molecular feature, we used chimeric receptors transfected in neuronal cultures. This type of preparation provided a more physiological environment than classical heterologous expression systems, notably for studying

TABLE I
Results summary

Receptors harboring the mGlu7 C terminus select a PKC pathway and specifically inhibit P/Q-type Ca^{2+} channels, whereas receptors harboring the mGlu2 C terminus do not activate the PKC pathway and selectively inhibit N- and L-type Ca^{2+} channels. The C terminus of these receptors is necessary and sufficient to select a specific signaling pathway.

Activated receptors		Inhibited Ca^{2+} channel type		Involvement of PKC pathway
Transfected	Native	P/Q	N,L	
mGlu7 		*		YES
mGlu2 	mGlu2 		*	NO
mGlu1/2 			*	NO
mGlu7/2 			*	NO
mGlu2/7 	mGlu2 	*	*	NOT TESTED
mGlu1/2/7 		*		YES

receptor transduction signaling, because the natural transduction pathway and effectors were expected to be present in our model. Moreover, we verified that the transfection and overexpression of the studied wild type receptors did not modify their signaling pathway and coupling to Ca^{2+} channels as compared with the endogenous receptors. We also verified that the differences observed between functional responses of the wild type and corresponding chimeric receptors did not result from differential cell surface expression of these receptors.

The existence of a large number of GPCR-mediated signaling pathways, with respect to the limited number of functional G protein subunits, raises the question of how a particular receptor is selectively coupled to a given effector. We provide insight into this question by showing that the C terminus of two G_o protein-coupled mGlu receptors is a key molecular determinant for selecting a specific signaling pathway. This part of the mGlu receptors has not been reported to be involved in the coupling specificity to G protein α subunit (3, 4). This was consistent with the idea that activation of a specific class of G protein by a given GPCR does not seem to be sufficient to determine the specificity of the receptor transduction pathway. For instance in sympathetic neurons, various neurotransmitter receptors have been shown to inhibit N-type Ca^{2+} channels whatever the nature of the α and $\beta\gamma$ subunits of the activated recombinant G protein (21).

Consistent with our findings, a growing body of evidence suggests that in addition to the G protein activation, the C terminus of mGlu receptors plays an essential role in the selection of a specific signaling pathway. Because the C terminus of the receptor is the target of a number of kinases and intracellular proteins (35), these factors may support the selectivity of the receptor coupling. The two following examples are in favor of this hypothesis. A first example is the differential coupling of the mGlu5 receptor to either combined IP_3 and cAMP or single IP_3 pathways, depending on the PKC-mediated phosphorylation of two C-terminal serine residues at positions 881 and 890 (35–37). A second example is the PKC-mediated phosphorylation of a C-terminal threonine residue, at position 840 of the mGlu5 receptor. This phosphorylation is responsible for generation of Ca^{2+} oscillations in response to agonist. By contrast, the mGlu1a receptor displays an aspartate residue in

this corresponding position and triggers a single peak Ca^{2+} response (38). Therefore, because of differential phosphorylation of their C terminus, mGlu1 and mGlu5 receptors can display different signaling cascades, although both receptors activate G_q proteins. The same might apply to mGlu2 and mGlu7 receptors, but no such functional specific differential phosphorylation sites have been reported so far for these receptors. Therefore, such a hypothesis would need further specific examination.

Proteins that interact differentially with the C terminus of mGlu2 and mGlu7 receptors are also good candidates for selective activation of different transduction pathways. To our knowledge, no protein has been shown to interact directly with the C terminus of the mGlu2 receptor. By contrast, the mGlu7 receptor C terminus displays binding sites for a number of intracellular proteins (39). Indeed, both calmodulin and $\text{G}\beta\gamma$ subunits can bind, in a mutually exclusive manner, to a subdomain in the C terminus of the mGlu7 receptor. Thus, dissociation of the $\beta\gamma$ subunits from the activated G protein interacts with the mGlu7 receptor C terminus. However, the binding of calmodulin to the receptor will promote dissociation of the G protein $\beta\gamma$ subunits from the receptor, thus making these subunits available for inhibiting P/Q-type Ca^{2+} channels (40). Therefore, it appears that inhibition of Ca^{2+} channels by the mGlu7 receptor may not solely depend on activation of a G protein but also on protein-protein interaction in the C terminus of the receptor. A second candidate is the PDZ domain-containing protein, protein interacting with C kinase 1 (PICK1). This protein interacts with the very last 3 C-terminal amino acids of the mGlu7a receptor (41–43). The PDZ domain of PICK1 also interacts with $\text{PKC}\alpha$ (44) thus creating a functional complex comprising the mGlu7 receptor, a PICK1 dimer and $\text{PKC}\alpha$ (42). These associations may be functionally important in the PKC-dependent coupling of the mGlu7 receptor to P/Q-type Ca^{2+} channels.

Our results may be of particular interest in understanding the physiological significance of alternative splicing of GPCRs. Strikingly, the variable part in GPCR splicing, including the class of mGlu receptors (12), is their C-terminal domain. For example, the natural mGlu7a receptor splice variant, mGluR7b, is generated by an out-of-frame insertion in the C terminus that results in the replacement of the last 16 amino acids of the mGlu7a receptor by 23 different amino acids (45, 46). According to our finding that the C terminus of mGlu receptors plays a key role in the receptor coupling to specific effectors, different mGlu receptor splice variants could lead to different signaling pathways, depending on the splice site choice.

Acknowledgments—We thank Anne Cohen-Solal for technical assistance and Dr. J. Saugstad (Atlanta, GA) for the generous gift of the mGlu7a receptor cDNA.

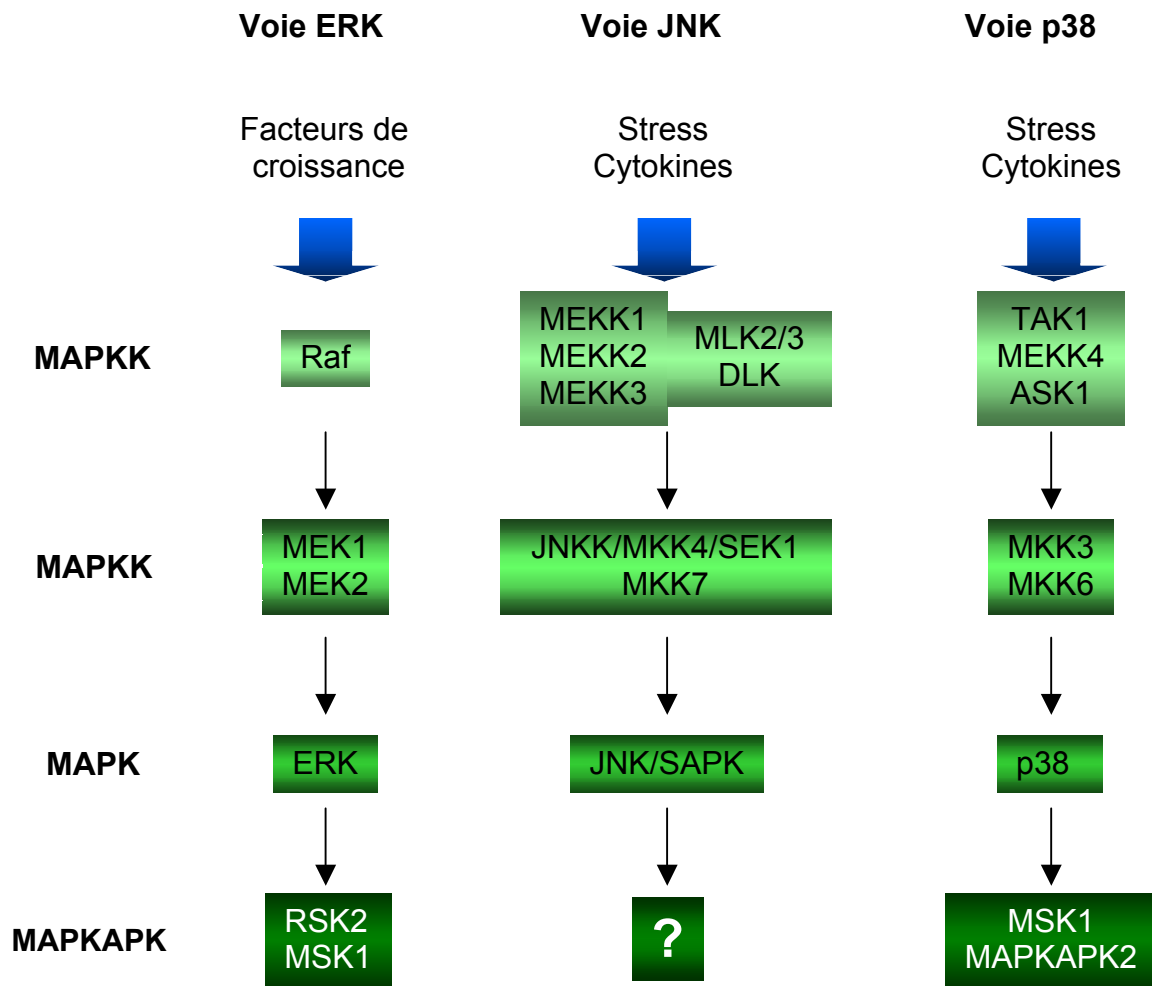
REFERENCES

- Pin, J. P., and Bockaert, J. (1995) *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 342–349
- Bourne, H. R. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 134–142
- Pin, J. P., Joly, C., Heinemann, S. F., and Bockaert, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 342–348
- Gomez, J., Joly, C., Kuhn, R., Knöpfel, T., Bockaert, J., and Pin, J. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2199–2205
- Prezeau, L., Carrette, J., Hespap, B., Curry, K., Pin, J. P., and Bockaert, J. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 570–577
- Conn, P. J., and Pin, J. P. (1997) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205–237
- Nawy, S., and Jahr, C. E. (1990) *Nature* **346**, 269–271
- Boss, V., and Conn, P. J. (1992) *J. Neurochem.* **59**, 2340–2343
- Dumuis, A., Pin, J. P., Oomagari, K., Sebben, M., and Bockaert, J. (1990) *Nature* **347**, 182–184
- Ferraguti, F., Baldani-Guerra, B., Corsi, M., Nakanishi, S., and Corti, C. (1999) *Eur. J. Neurosci.* **11**, 2073–2082
- Kammermeier, P. J., and Ikeda, S. R. (1999) *Neuron* **22**, 819–829
- Fagni, L., Chavis, P., Ango, F., and Bockaert, J. (2000) *Trends Neurosci.* **23**, 80–88
- Champak, S., Gähwiler, B. H., Do, K. Q., and Knöpfel, T. (1990) *Nature* **347**, 765–767
- Sahara, Y., and Westbrook, G. L. (1993) *J. Neurosci.* **13**, 3041–3050

15. Chavis, P., Fagni, L., Bockaert, J., and Lansman, J. B. (1995) *Neuropharmacology* **34**, 929–937
16. Ikeda, S. R., Lovinger, D. M., McCool, B. A., and Lewis, D. L. (1995) *Neuron* **14**, 1029–1038
17. Garcia, D. E., Li, B., Garcia-Ferreiro, R. E., Hernandez-Ochoa, E. O., Yan, K., Gautam, N., Catterall, W. A., Mackie, K., and Hille, B. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 9163–9170
18. Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schultz, G., and Wittig, B. (1991) *Nature* **353**, 43–48
19. Kleuss, C., Scherubel, H., Hescheler, J., Schultz, G., and Wittig, B. (1992) *Nature* **358**, 424–426
20. Kleuss, C., Scherubel, H., Hescheler, J., Schultz, G., and Wittig, B. (1993) *Science* **259**, 832–834
21. Jeong, S. W., and Ikeda, S. R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 907–912
22. Jeong, S. W., and Ikeda, S. R. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 4489–4496
23. Jeong, S. W., and Ikeda, S. R. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 4755–4761
24. Shapiro, M. S., Loose, M. D., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M., Gomeza, J., Wess, J., and Hille, B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10899–10904
25. Heuss, C., and Gerber, U. (2000) *Trends Neurosci.* **23**, 469–475
26. Morris, A. J., and Malbon, C. C. (1999) *Physiol. Rev.* **79**, 1373–1430
27. Perroy, J., Prézeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J., and Fagni, L. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 7896–7904
28. Van Vliet, B. J., Sebben, M., Dumuis, A., Gabrion, J., Bockaert, J., and Pin, J. P. (1989) *J. Neurochem.* **52**, 1229–1239
29. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene (Amst.)* **77**, 51–59
30. Carroll, F., Stolle, A., Beart, P. M., Voerste, A., Brabet, I., Mauler, F., Joly, C., Antonicek, H., Bockaert, J., Muller, T., Pin, J. P., and Prézeau, L. (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**, 965–973
31. Parmentier, M. L., Joly, C., Restituito, S., Bockaert, J., Grau, Y., and Pin, J. P. (1998) *Mol. Pharmacol.* **53**, 778–786
32. Ango, F., Albani-Torregrossa, S., Joly, C., Robbe, D., Michel, J. M., Pin, J. P., Bockaert, J., and Fagni, L. (1999) *Neuropharmacology* **38**, 793–803
33. Lledo, P. M., Homburger, V., Bockaert, J., and Vincent, J. D. (1992) *Neuron* **8**, 455–463
34. Chavis, P., Shinozaki, H., Bockaert, J., and Fagni, L. (1994) *J. Neurosci.* **14**, 7067–7076
35. De Blasi, A., Conn, J. P., Pin, J. P., and Nicoletti, F. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 114–120
36. Gereau, R. W. T., and Heinemann, S. F. (1998) *Neuron* **20**, 143–151
37. Francesconi, A., and Duvoisin, R. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5615–5624
38. Kawabata, S., Tsutsumi, R., Kohara, A., Yamaguchi, T., Nakanishi, S., and Okada, M. (1996) *Nature* **383**, 89–92
39. Dev, K. K., Nakanishi, S., and Henley, J. M. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 355–361
40. O'Connor, V., El Far, O., Bofill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, A., Airas, J. M., Betz, H., and Boehm, S. (1999) *Science* **286**, 1180–1184
41. Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Haganir, R. L., Worley, P., and Craig, A. M. (2000) *Neuron* **28**, 485–497
42. Dev, K. K., Nakajima, Y., Kitano, J., Braithwaite, S. P., Henley, J. M., and Nakanishi, S. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 7252–7257
43. El Far, O., Airas, J., Wischmeyer, E., Nehring, R. B., Karschin, A., and Betz, H. (2000) *Eur. J. Neurosci.* **12**, 4215–4221
44. Staudinger, J., Lu, J., and Olson, E. N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32019–32024
45. Flor, P. J., Van Der Putten, H., Ruegg, D., Lukic, S., Leonhardt, T., Bence, M., Sansig, G., Knopfel, T., and Kuhn, R. (1997) *Neuropharmacology* **36**, 153–159
46. Corti, C., Restituito, S., Rimland, J. M., Brabet, I., Corsi, M., Pin, J. P., and Ferraguti, F. (1998) *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3629–3641

ANNEXE IV

Les voies MAP-Kinases



Les trois principales voies MAP-Kinases. La voie débouchant sur ERK5, encore méconnue, a été omise par souci de clarté. Schéma inspiré de celui de L. Johan NISSEN, Thèse.

TITRE en français

Régulation intragénique de la transcription de *c-fos* : blocage de l'élongation et promoteur alterne.

RESUME en français

c-fos est un proto-oncogène et un gène de réponse précoce. Son activation transcriptionnelle est très rapide et transitoire, ce qui suggère un contrôle très strict.

Au cours de ma thèse, nous avons abordé deux aspects de la régulation transcriptionnelle de *c-fos* par des séquences intragéniques. Le premier consiste en un blocage de l'allongement des transcrits dans le premier intron, dont nous avons montré qu'il intervient dans les fibroblastes Ltk-, comme cela avait été découvert dans les macrophages. Ce blocage est levé par l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, et nous avons montré que ce phénomène est indépendant des CaM-Kinases et de la calcineurine, mais implique la calmoduline dans une nouvelle voie de signalisation.

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, nous avons identifié, en aval de la région décrite ci-dessus, une nouvelle séquence intronique très fortement conservée qui possède les caractéristiques d'un promoteur. Nous avons montré que ce promoteur est fonctionnel en transfection transitoire, ce qui nous a encouragé à recourir aux souris transgéniques pour explorer ses territoires d'expression au cours du développement. Nos résultats préliminaires montrent que cette expression semble être limitée au système nerveux et aux glandes mammaires en développement.

Nous avons donc étudié deux régions régulatrices de la transcription de *c-fos* qui sont proches dans le gène, ce qui suggère un dialogue entre ces différentes fonctions.

TITRE en anglais

Intragenic regulation of *c-fos* transcription : from elongation to alternative initiation.

RESUME en anglais

c-fos is a well-known proto-oncogene and an immediate-early gene whose role is still debated. Its transcriptional activation is very quick and transient, which requires a tight regulation.

c-fos transcriptional control by intragenic sequences was studied through two different aspects. First, a transcriptional block in the first intron was shown to occur in cultured Ltk-fibroblasts, as shown before in macrophages. This block was relieved by increasing calcium intracellular concentration, and we demonstrated that this did not require CaM-Kinases nor calcineurin, but was linked to a new calmodulin-dependent pathway that remains to be characterised.

In the second part of my thesis work, we identified downstream the blockade region a new, very conserved intronic sequence which has many features of a promoter. This alternate promoter was shown to be active in transient transfection. We thus constructed transgenic mice carrying a β -galactosidase reporter under the control of this putative intronic promoter. Thanks to these mice we could detect the activity of this promoter during development restricted to neural structures and developing mammary gland.

We thus studied two very close new regions involved in *c-fos* transcriptional regulation at two different levels, and speculate that these activities are coordinated.

DISCIPLINE

Biologie Moléculaire et Cellulaire

MOTS-CLES

c-fos, proto-oncogene, transcription, élongation, promoteur, signalisation, souris transgéniques.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Oncogènes et régulateurs du cycle cellulaire, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier.
CNRS-UMR5535, IFR24, 1919 route de Mende, 34293 MONTPELLIER CEDEX 05.