

Université de Montréal

Identification de nouveaux substrats de la voie Ras-MAP Kinase

par Eric Vaillancourt Jean

Département de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en Biologie moléculaire
option biologie des systèmes

Décembre 2017

© Eric Vaillancourt Jean, 2017

Résumé

ERK1 et ERK2 (ERK1/2) sont des kinases membres de la voie de signalisation Ras-MAP Kinase impliquées dans la régulation de la croissance, de la division ainsi que de la différenciation des cellules. Bien que le rôle crucial de la voie MAP Kinase dans ces fonctions soit bien documenté, les mécanismes à son origine le sont moins. Ainsi, de nombreux effecteurs en aval de ces kinases continuent à ce jour d'être identifiés et caractérisés. Dans un effort pour identifier de nouveaux substrats des kinases ERK1/2, deux études phosphoprotéomiques à grande échelle furent effectuées par notre laboratoire et ont permis d'identifier plus d'une centaine de nouveaux substrats potentiels. Parmi ceux-ci se retrouvent notamment des régulateurs de l'épissage alternatif de l'ARN messager. Les mécanismes de régulation de ce processus par les voies de signalisation ne sont cependant toujours pas bien caractérisés.

La première étude de cette thèse s'intéresse ainsi à la validation de ces nouveaux substrats de ERK1/2. Nous avons notamment identifié et validé les régulateurs de l'épissage CDK12, RNPS1, MBNL2 et SRPK2 comme de nouveaux substrats de ERK1/2 par essai kinase *in vitro*. En regard au rôle potentiel qu'une régulation de ces substrats par la voie MAP Kinase pourrait avoir, nous avons étudié les étapes précoces de la différenciation telle qu'entraînée par l'expression de la kinase ERK1 dans un modèle de cellules souches embryonnaires murines déficientes en ERK1/2. Nous avons identifié une soixantaine de transcrits épissés de manière différentielle suivant l'expression de ERK1, dont notamment ceux de DNMT3b et de la delta-caténine. Nous avons ainsi observé une diminution de l'épissage du transcrit de DNMT3b en réponse à l'activité ERK1, menant à une augmentation de l'expression de l'enzyme avec l'exon encodant le domaine catalytique.

La dernière étude de cette thèse porte finalement sur l'identification de la beta-caténine comme nouveau substrat de MEK1/2. Nos expériences suggèrent que cette phosphorylation

survient de manière prédominante sur la thréonine 472 et que ce site a un rôle important dans la stabilité de la protéine.

Ainsi, cette thèse édifie, d'une part, les bases d'une régulation à grande échelle de l'épissage alternatif par les MAP Kinases ERK1/2, et d'autre part révèle un nouvel élément de régulation entre la voie Wnt/beta-caténine et la voie MAP Kinase par l'identification de la beta-caténine comme nouveau substrat de MEK1/2.

Mots-clés : MAP Kinases, beta-caténine, ERK1/2, MEK1/2, épissage alternatif, cellules souches embryonnaires, signalisation cellulaire, phosphorylation

Abstract

ERK1 and ERK2 (ERK1/2) are members of the Ras-dependent MAP Kinase pathway involved in the regulation of cell proliferation, differentiation and survival. While the roles of these MAP Kinases in the control of these functions are now well documented, the mechanisms behind them are often poorly described. Therefore, many effectors downstream of these kinases are still being identified and characterized. To identify new substrates of the ERK1/2 kinases, two large-scale phosphoproteomic studies were performed by our laboratory and allowed us to identify over a hundred new putative substrates. Among these are some alternative splicing regulators. The mechanisms governing the regulation of this process by upstream signaling pathways aren't quite well understood yet.

The first study within this thesis focuses on the validation of these new substrates of ERK1/2. Namely, we identified and validated that the splicing factors CDK12, RNPS1, MBNL2 and SRPK2 are novel substrates of ERK1/2 by *in vitro* kinase assay. Regarding the potential role that a regulation of these factors by the MAP Kinase pathway might have, we studied the early stages of differentiation as driven by the expression of the ERK1 kinase in a ERK1/2 DKO embryonic stem cells murine model. We identified 60 alternatively spliced transcripts following ERK1 expression, including those from DNMT3b and delta-catenin expression. We notably observed a decrease in the splicing of the DNMT3b transcript in response to ERK1 activity, leading to an increase in the expression of the enzyme with the exon coding the catalytic domain.

The last part of this thesis revolves around the identification and characterization of beta-catenin as a novel substrate of MEK1/2. Our research suggest that this phosphorylation occurs predominantly on threonine 472 and that this site is important in maintaining the stability of the protein.

This thesis lays the ground work for a global understanding on how the MAP Kinases ERK1/2 regulates alternative splicing on one hand, and also defines a novel element of regulation between the Wnt/beta-catenin and the MAP Kinase pathway by identifying beta-catenin as a new substrate of MEK1/2.

Keywords : MAP Kinase, beta-catenin, ERK1/2, MEK1/2, alternative splicing, embryonic stem cells, cell signaling, phosphorylation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles.....	xiii
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1 : Introduction.....	20
1.1 Les voies MAP Kinases.....	20
1.1.1 Les voies MAP Kinases classiques.....	21
1.1.1.1 La voie Ras-MAP Kinase ERK1/2.....	21
Origine.....	21
Composantes et structure.....	22
1.1.1.2 p38.....	23
Origine.....	23
Composantes et structure.....	24
Fonctions.....	25
1.1.1.3 JNK.....	27
Origine.....	27
Composantes et structure.....	27
Fonctions.....	28
1.1.1.4 ERK5.....	29
Origine.....	29
Composantes, structure et fonctions.....	29
1.1.2 Les voies MAP Kinases atypiques.....	30
1.1.2.1 ERK3/4.....	30
Origine.....	30
Composantes, structure et rôles connus.....	31

1.1.2.2 NLK	32
Origine	32
Fonctions.....	32
1.1.2.3 ERK7(8).....	34
Origine	34
Fonctions.....	34
1.2 Régulation de la voie Ras-MAP Kinase	35
1.2.1 Expression des composantes de la voie	35
Localisation subcellulaire des MAP Kinases ERK1/2.....	37
1.2.2 Mécanismes d'induction de la voie.....	39
1.2.2.1 Voie des récepteurs tyrosine kinase.....	39
1.2.2.2 Voie des récepteurs couplés aux protéines G	39
1.2.2.3 Voie des intégrines.....	41
1.2.3 Mécanismes d'inhibition de la voie	42
1.2.3.1 Phosphatases de la voie MAP Kinase.....	43
Protéine-tyrosine phosphatases (PTP)	43
Protéine- sérine/thréonine phosphatases (PSP).....	44
1.2.3.2 Boucles de rétro-inhibition	45
Boucles de rétro-inhibition par phosphorylation d'effecteurs de la voie.....	45
Boucles de rétro-inhibition par régulation de l'expression génique	47
1.3 Substrats de la voie Ras-MAP Kinase	49
1.3.1 Substrats de Raf	49
1.3.2 Substrats de MEK1/2	50
1.3.3 Substrats de ERK1/2	53
Facteurs de transcription.....	53
Kinases et phosphatases.....	56
Protéines du cytosquelette.....	58
GTPases	59
Régulateurs de l'épissage alternatif	60
Protéines de maturation de l'ARN.....	62
1.4 Fonctions biologiques des MAP Kinase ERK1/2.....	63

1.4.1	Rôles dans l'expression des gènes	63
1.4.1.1	Régulation des facteurs de transcription	63
1.4.1.2	Rôles dans la traduction	65
1.4.1.3	Régulation post-transcriptionnelle	66
	Épissage alternatif.....	67
	Contrôle de l'épissage alternatif par la voie MAP Kinase.....	71
1.4.2	Contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire.....	72
	Cyclines et CDKs.....	73
	Rôle de ERK1/2 et des cyclines/CDK dans le cycle cellulaire.....	75
1.4.3	Différenciation cellulaire	76
	DNMT1, DNMT3a et DNMT3b dans la différenciation.....	77
	Rôle de la voie MAP Kinase dans la différenciation	78
1.5	L'oncogène Ras et la voie MAP Kinase dans le cancer	80
1.5.1	Rôles de la voie Ras-MAP Kinase dans le cancer	80
1.5.2	Inhibiteurs de la voie MAP Kinase	84
1.5.3	Le cancer colorectal	86
1.5.2.1	Épidémiologie et bases génétiques de la maladie	86
1.5.2.2	La voie Wnt/beta-caténine	88
	Origine	89
	Activation et fonctions de la voie	90
	Interaction entre les voies MAP Kinases et Wnt/ β -caténine	93
1.6	Hypothèse de recherche et objectifs	94
Chapitre 2 Nouveaux substrats des MAP Kinases ERK1/2 impliqués dans l'épissage alternatif		
.....		98
2.1	Mise en contexte du projet.....	98
2.2	Matériel et méthodes.....	99
2.4	Résultats.....	101
2.4.1	RNPS1 est un substrat <i>in vitro</i> de ERK1/2	101
2.4.2	SRPK2 est un substrat <i>in vitro</i> d'ERK1/2, mais pas SRPK1 et SRPK3.....	103
2.4.3	ERK1/2 phosphoryle CDK12 sur plusieurs résidus.....	105

2.4.4 Autres substrats potentiels de ERK1/2 invalidés par essai kinase <i>in vitro</i>	112
2.5 Discussion	113
2.5.1 Phosphorylation de plusieurs facteurs d'épissage par ERK1/2	114
2.5.2 CDK12 est un nouveau substrat de ERK1/2.....	117
2.5.3 Limitations des études de la phosphorylation de CDK12 par ERK1/2	119
Chapitre 3 : Contrôle de la différenciation cellulaire des cellules souches embryonnaires par ERK1/2	121
3.1 Approche méthodologique.....	122
Matériel et méthodes.....	122
3.2 Résultats.....	125
3.2.1 Analyse de séquençage à haut-débit de cellules ERK1/2 DKO / +ERK1	125
3.2.2 DNMT3b.....	128
3.2.3 CTNND1	131
3.2.4 Identification de MBNL2 comme substrat de ERK1/2.....	133
3.3 Discussion.....	136
3.3.1 L'épissage de DNMT3b est modulé en réponse à l'expression de ERK1/2.....	136
3.3.2 L'épissage de CTNND1 est modulé en réponse à l'expression de ERK1/2.....	138
3.3.3 Identification de facteurs d'épissage régulés par ERK1/2 impliqués dans la différenciation des cellules souches.....	139
Chapitre 4 : La beta-caténine est un nouveau substrat des kinases MEK1/2.....	142
4.1 Mise en contexte du projet.....	142
4.2 Approche méthodologique.....	143
Matériel et méthodes.....	143
4.3 Résultats.....	145
4.3.1 Phosphorylation <i>in vitro</i> de la β -caténine par MEK1	145
4.3.2 Essais de phosphorylation cellulaires	150
4.3.3 MEK1/2 et beta-caténine forment un complexe	153
4.3.4 Impact de la thréonine 472 sur la stabilité de la β -caténine.....	155
4.3.2 Activité transcriptionnelle.....	159
4.4 Discussion.....	160

4.4.1 Validation adéquate de nouveaux substrats de MEK1/2	160
4.4.2 Fonctions possibles d'une phosphorylation de la T472 de la beta-caténine par MEK1/2.....	164
4.4.3 MEK1/2 a-t-il d'autres cibles que la thréonine 472?	168
4.4.4 Stratégies pour l'identification <i>in vivo</i> des sites de phosphorylation de la β -caténine	170
Conclusion	173
Bibliographie.....	175

Liste des tableaux

Tableau I.	Dysfonctions de la voie MAP Kinase dans le cancer	82
Tableau II.	Liste des 60 isoformes épissés de manière différentielle en fonction de l'activité ERK1.	127
Tableau III.	DNMT3b dans l'analyse du séquençage d'ARN à haut-débit.....	128
Tableau IV.	CTNND1 dans l'analyse du séquençage d'ARN à haut-débit.....	131

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1-1	Les voies de signalisation MAP Kinases	21
Figure 1-2	Architecture du domaine kinase de ERK1/2.....	23
Figure 1-3	La voie de signalisation p38.	25
Figure 1-4	Résumé des principaux modes d'activation de la voie MAPK.....	42
Figure 1-5	Résumé de plusieurs des boucles de rétro-inhibition de la voie MAP Kinase .	49
Figure 1-6	Assemblage du spliceosome et excision de l'intron	68
Figure 1-7	Sélection du site d'épissage en fonction d'éléments de régulation.....	69
Figure 1-8	Le modèle en trois étapes du développement du cancer colorectal	88
Figure 1-9	Modèle d'activation de la voie Wnt/beta-caténine	91

Chapitre 2

Figure 2-1	Phosphorylation in vitro de RNPS1 par ERK1/2.....	101
Figure 2-2	Analyse protéomique de la phosphorylation in vitro de RNPS1 par ERK1/2	102
Figure 2-3	Phosphorylation in vitro de SRPK1 et SRPK3 par ERK1/2.....	104
Figure 2-4	Phosphorylation in vitro de SRPK2 par ERK1/2.....	104
Figure 2-5	Constructions de CDK12 par expression en bactérie	106
Figure 2-6	Phosphorylation in vitro des mutants de CDK12	107
Figure 2-7	Analyse protéomique de la phosphorylation de CDK12(2) par ERK1/2 in vitro	108
Figure 2-8	Phosphorylation in vitro des mutants de CDK12	109
Figure 2-9	Phosphorylation in vitro de mutants successifs de CDK12	110
Figure 2-10	Carte phosphopeptidique 2D de la phosphorylation de CDK12(2).....	111
Figure 2-11	Essai kinase in vitro d'autres facteurs d'épissage.....	113

Chapitre 3

Figure 3-1	Schéma du croisement des souris menant à la génération de cellules souches embryonnaires murines ERK1/2 DKO	121
Figure 3-2	Validation par PCR des isoformes court et long de DNMT3b	129

Figure 3-3	Expression des isoformes longs et courts de DNMT3b dans plusieurs lignées cellulaires	130
Figure 3-4	Validation par PCR des isoformes court et long de CTNND1	132
Figure 3-5	Validation des changements d'épissage suivant expression d'ERK1 par électrophorèse capillaire quantitative	133
Figure 3-6	Phosphorylation in vitro de MBNL2 par ERK1/2	135

Chapitre 4

Figure 4-1	Phosphorylation in vitro de beta-caténine par MEK1.....	146
Figure 4-2	La beta-caténine est phosphorylée par MEK1 en provenance de deux sources commerciales distinctes	147
Figure 4-3	Analyse protéomique de la phosphorylation in vitro de β -caténine par MEK1	148
Figure 4-4	Phosphorylation in vitro des mutants de la beta-caténine.....	149
Figure 4-6	Analyse par spectrométrie de masse (MS) de la phosphorylation in vivo de β -caténine	151
Figure 4-7	Essais préliminaires de l'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la T472 de beta-caténine	152
Figure 4-8	La beta-caténine est un partenaire d'interaction de MEK1/2	154
Figure 4-9	Stabilité de la forme ectopique de beta-caténine	156
Figure 4-10	Impact de l'expression d'une forme dominante négative de MEK1/2 sur la stabilité de β -caténine	159
Figure 4-12	Activité TOPFlash de la beta-caténine WT et mutante pour la T472.....	160
Figure 4-13	Phosphorylation in vitro de HSF1 par MEK1.....	162

Liste des sigles

3' UTR : Région non-traduite en 3'

5' TOP : Tract d'oligo poly-pyrimidines en 5'

AC : Adénylate Cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ALE : épissage alternatif du dernier exon

AP-1 : Activator protein 1

APC : Adenomatous polyposis coli

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

ASK : Apoptosis signal-regulating kinase

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

BAX : Bcl-2-associated protein

BMK : Big MAP Kinase

CD domain : common docking domain

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CMGC : CDK, MAPK, GSK3, CDK-like

CD : common docking

CD44 : Cluster of differentiation 44

Cdc : cell-division cycle

CDK : cyclin dependent kinase

COX2 : cyclooxygenase-2

CPB : CREB binding protein

CRC : Cancer colorectal

CTD : Domaine C-terminal

DAG : Diacyl Glycerol

DCC : Deleted in colorectal carcinoma

DEF : Docking site for ERK, FXF
DKO : Double knockout
DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DICE : Élément de contrôle de la différenciation
DSH : disheveled
DTT : Dithiothréitol
DUSP : Phosphatase à double spécificité
EDTA : Acide éthylène-diamine tétra acétique
EGF : Epithelial growth factor
IEG : Gènes immédiats-précoces
eIF4 : Facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes 4
eIF2K : Kinase du facteur d'élongation 2
EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse
ERK : Extracellular-signal regulated kinase
FAK : Focal adhesion kinase
FBS : Sérum foetal bovin
FGF : Fibroblast growth factor
FOXO : Forkhead box protein O
FRS : F-site recruitment site
Fzd : Frizzled
GDP : Guanosine-5'-diphosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GFP : Protéine fluorescente verte
GRB2 : Growth factor receptor bound-protein 2
GSK3 : glycogène synthase kinase-3
GST : Glutathione S-transférase
GTP : Guanosine triphosphate
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIPK : Homeodomain Interacting Protein Kinase
hnRNP : ribonucléoprotéines hétérogènes (heterogenous nuclear Ribonucléoproteins)
HSF : Heat shock factor

HSP : Heat shock protein
HuR : Human antigen R
IL : Interleukine
IP3 : Inositol triphosphate
IRIC : Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
JNK : c-Jun N-terminal kinases
kDa : kilo Dalton
KSR : Kinase suppressor of Ras
LEF : lymphoid enhancer factor
LPS : Lipopolysaccharides
LRP : Low-density lipoprotein receptor related protein
MAP-2 : Microtubule Associated-Protein 2
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAPK : MAP Kinase Activated Protein Kinase
MAPKK : MAPK Kinase
MAPKKK : MAPKK Kinase
MBP : Myelin basic protein
MEK : MAP Kinase/ERK kinase
MEKK : MEK Kinase
mESC : Cellules souches embryonnaires murines
MKP : MAP Kinase phosphatase
MLK : Mixed-lineage protein kinase
MNK : MAP Kinase-interacting serine/threonine-protein kinase
miR : micro-ARN
mM : millimolaire
MMP : Métalloprotéinase matricielle
MSI : Instabilité micro-satellitaire
MSK : Mitogen and stress activated protein kinase
mTORC : mechanistic target of rapamycin complex
NGF : Neuronal growth factor
NLK : nemo-line kinase

NLS : Signal de localisation nucléaire (Nuclear localization signal)
NMD : Dégradation d'ARNm induite par mutation non-sens (Nonsense-mediated *mrna decay*)
NOS : Oxyde nitrique synthase
NTS : Signal de translocation nucléaire
PAGE : Électrophorèse en gel de polyacrylamide
PAK : p21 activated kinase
PBS : Tampon phosphate salin
PCP : Polarité planaire cellulaire
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PHD : Domaine prolyl-hydroxylase
PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI3K : Kinase-3 phosphoinositide
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF : Fluorure de phényl-méthyl sulfoxyde
PP2A : Protéine phosphatase 2A
PR : Riche en prolines
PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2
PSI : Percent Spliced Index
PSP : Protéine-sérine/thréonine phosphatase
PTP : Protéine-tyrosine phosphatase
Raf : Rapidly growing fibrosarcoma
Ral : Ras-Like
Ras : Rat sarcoma
RB : retinoblastoma
RBP : Protéines capables de lier l'ARN
RISC : RNA-induced silencing complex
RNMT : RNA guanine-7 methyltransferase
rpS6 : Protéine ribosomale S6
RS : Domaine riche en arginine et en sérine.

RSK : Ribosomal S6 kinase
RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase
SDS : Dodécyle-sulfate de sodium
snRNP : small nuclear Ribonucleoprotein
SOS : Son of sevenless
SRSF : Serine and arginine rich splicing factors
STAT : Signal transducer and activator of transcription
Sv40 : Simian virus 40
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TAK : Transforming growth factor beta-activated kinase
TCF : Ternary complex factor
TFG α : Transforming growth factor α
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
USP : Ubiquitine par le protéasome
VEGF : Vascular endothelial growth factor
Wg : Wingless
WT : Wild-type

Remerciements

L'aboutissement d'un ouvrage aussi imposant qu'une thèse de doctorat est certainement une immense source de fierté, mais c'est aussi quelque chose qui n'aurait jamais été possible sans l'apport de nombreuses personnes autour de moi. Ces quelques lignes ne me sembleront jamais suffisantes pour exprimer ma gratitude envers tous ceux qui m'ont aidé et supporté à travers ce projet, mais je vous assure que chacune est sincère et authentique

J'aimerais remercier en premier lieu mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Meloche, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir encadré durant les six dernières années. Il m'a toujours accordé sa confiance à travers les multiples projets qu'il m'a confiés et d'une grande liberté pour les mener à bon port. Je suis très reconnaissant du support constant qu'il m'a offert et de ses encouragements, de son optimisme ainsi que sa patience lors des moments plus difficiles. J'ai beaucoup grandi de mon expérience dans le laboratoire et je souhaite le remercier chaleureusement de m'avoir transmis son engouement pour la science. C'est un réel honneur pour moi de pouvoir accomplir un de mes plus grands rêves dans son laboratoire.

J'ai aussi eu la chance de côtoyer des gens formidables au quotidien, et j'ai énormément appris à travers leurs conseils et leur aide à travers toutes ces années. Un merci particulier à Christophe et Pierre-Luc d'avoir su bien me former et m'aiguiller. Merci aussi à mes collègues actuels du labo, votre aide a été indispensable pour que la science « marche » au quotidien et votre présence a rendu l'expérience d'autant plus agréable! Si je n'ai que de bons mots à dire pour tous ceux d'entre vous que je côtoie à tous les jours, j'aimerais remercier en particulier Simon avec qui j'ai eu la chance de cheminer pendant tout le doctorat. Je n'aurais jamais eu autant de plaisir sans sa présence quotidienne et son support, tant moral que technique, a vraiment été un rayon de soleil dans les meilleurs moments comme les pires.

Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi pour leur apport scientifique à mes projets, notamment le Dr Benoit Chabot ainsi que le président de mon comité, le Dr Marc Therrien. Les idées, suggestions et commentaires qu'ils m'ont partagés ont toujours été appréciés et m'ont sans aucun doute beaucoup aidé.

J'aimerais aussi remercier les gens des plateformes technologiques de l'IRIC qui ont su répondre à mes questions et m'aider lors de la planification et la mise en œuvre de mes expériences.

Un grand merci à toute la « gang » de l'IRIC, tant à l'institut que lors de nos sorties, ça aura été toute une aventure! Je n'ai que de beaux souvenirs du temps qu'on a passé ensemble et votre apport scientifique autant que personnel a été indispensable à l'accomplissement de ce projet. Difficile de croire qu'on va tous y arriver après toutes ces années! J'aimerais aussi écrire quelques lignes pour remercier les étudiants avec qui j'ai eu le plaisir de former l'association des étudiants. Si ça n'a pas été toujours de tout repos, collaborer sur tous ces projets aura toujours été très agréable avec vous et les voir s'accomplir me rend très fier de ce que nous avons fait ensemble.

Un merci sincère à ma famille et en particulier mes parents de toujours m'avoir supporté et encouragé à travers mes études. Ils m'ont inculqué des valeurs de travail et de persévérance sans lesquelles je n'y serais jamais arrivé, et je souhaite qu'ils soient aussi fiers de moi que je le suis d'arriver enfin au terme de ce doctorat. Un grand merci aussi à mes amis qui ont toujours été là pour moi, certains depuis plus de 15 ans déjà! Merci particulièrement à Marc-André, Kevin, Jean-François et Guillaume. Je suis convaincu que notre amitié continuera de traverser l'épreuve du temps pour les décennies à venir!

Je garde ces dernières lignes pour remercier la personne la plus importante pour moi, ma chère fiancée, Josée. Merci pour ton affection, ta confiance inébranlable et ton amour. Merci d'avoir accepté tous les sacrifices que nous avons fait pour mener mes ambitions à terme. Merci de me supporter quotidiennement, d'être présente pour moi et de partager ta vie avec moi. À tous les jours, tu as participé à l'écriture de ce document beaucoup plus que tu ne peux
l'imaginer.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Les voies MAP Kinases

Parmi la large gamme d'évènements intra-cellulaires menant à une réponse physiologique de la cellule, peu n'ont autant d'importance que les cascades de signalisation cellulaire. Celles-ci peuvent transmettre une grande variété de signaux de provenance extra-cellulaire afin de moduler une panoplie de réponses biologiques, notamment le cycle cellulaire, la survie, la prolifération, la réponse au stress et la différenciation. Centrales au contrôle de plusieurs de ces processus figurent les voies de signalisation MAP Kinase.

Les principaux acteurs de ces voies sont les Mitogen-activated Protein Kinases (MAP Kinases), qui forment un groupe de 14 sérine/thréonine kinases appartenant à la superfamille des CMGC (CDK, MAPK, GSK3, CDK-like). Elles sont pour la plupart hautement conservées de la levure à l'homme et sont au cœur d'intenses recherches scientifiques depuis maintenant plusieurs décennies. Ensemble, elles se déclinent en deux classes, les MAP Kinases classiques et les MAP Kinases atypiques, qui composent ensemble sept voies de signalisation distinctes qui sont résumées à la figure 1-1. Traditionnellement, l'activation des MAP Kinases survient à l'issue d'une cascade de phosphorylation d'un module de trois kinases : une MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) phosphoryle une MAP Kinase Kinase (MAPKK) conduisant à son activation, qui à son tour phosphoryle une MAP Kinase. La MAP Kinase phosphorylée et activée peut finalement phosphoryler les sérines ou thréonines d'une grande variété de substrats selon le contexte cellulaire. Effectivement, la transduction du signal par ces voies de signalisation est sujette à plusieurs mécanismes de régulation et de rétroinhibition à plusieurs niveaux qui permettent un contrôle strict de l'amplitude, de la durée, de la spécificité et de la nature du signal menant à une réponse physiologique adéquate (1).

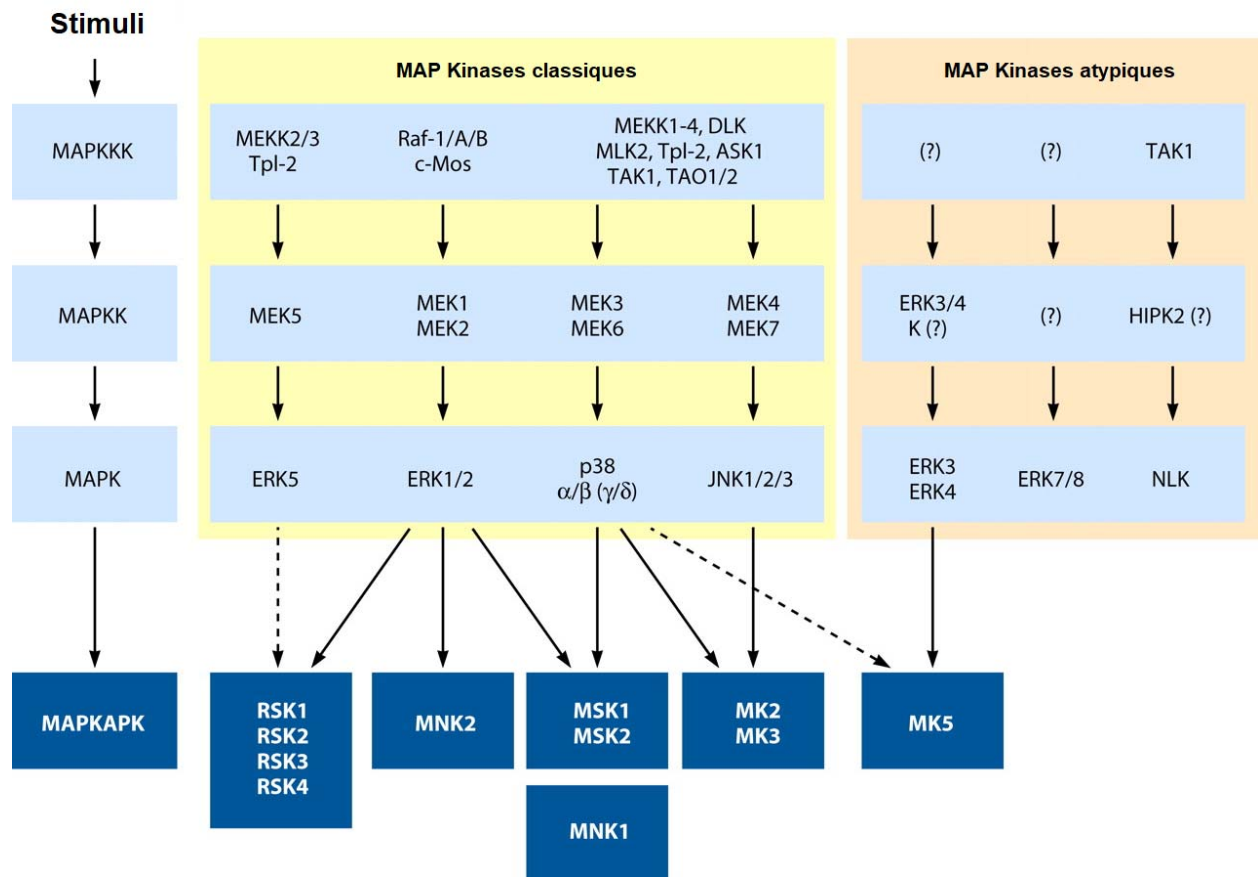


Figure 1-1 Les voies de signalisation MAP Kinases

Adapté de Cargnello et al. (2)

1.1.1 Les voies MAP Kinases classiques

1.1.1.1 La voie Ras-MAP Kinase ERK1/2

Origine

Les premières études sur les composantes de la voie classique Ras-MAP Kinase débutent au milieu des années 1980, alors que le groupe de Tony Hunter s'intéresse aux évènements de phosphorylation découlant de l'activation de récepteurs tyrosine kinase par certains facteurs de croissance (3). Son groupe observe ainsi la phosphorylation de deux

protéines d'environ 42 kDa suivant un traitement à l'EGF, au sérum ainsi qu'au PMA. Une activité kinase fut observée pour ces protéines quelques années plus tard sous forme de phosphorylation de la protéine microtubule-associated protein 2 (MAP-2) en réponse à une stimulation à l'insuline. L'ADNc codant pour la p44-MAPK, *Mapk3*, sera isolé et cloné pour la première fois en 1990 par le groupe de Mélanie H. Cobb, et ceux codant pour les gènes *Mapk1* et *Mapk6* suivirent l'année suivante. Ces protéines ont été renommées Extracellular signal-regulated kinase 1, Extracellular signal-regulated kinase 2 et Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK1/ERK2/ERK3), respectivement (4-6).

La recherche sur les composantes et fonctions de la voie prend rapidement un essor considérable, permettant la découverte de MEK1/2 comme kinases de ERK1/2 et de l'oncogène Raf, identifié plus tôt dans les années 1980, comme kinase en amont de MEK1/2 suivant activation par l'oncogène Ras (7-11).

Composantes et structure

Véritables prototypes de la famille MAP Kinase, les kinases ERK1 et ERK2 (ERK1/2) sont composées d'un unique domaine sérine/thréonine kinase représentant près de 90% de la protéine (figure 1-2) (12, 13). La phosphorylation de ERK1/2 par les kinases MEK1/2 s'effectue dans la boucle d'activation, présente au cœur du domaine kinase, sur la thréonine et la tyrosine du motif T-X-Y, qui est commun à toutes les MAP Kinases classiques (14, 15). Contrairement à MEK1/2, ERK1/2 peut phosphoryler plus d'une centaine de substrats cellulaires (kinases, facteurs de transcription, protéines liant l'ARN...) (16, 17). Cette liste continue d'ailleurs à ce jour de s'allonger, démontrant l'importance de cette voie de signalisation dans un nombre croissant de fonctions cellulaires (18-20). Puisque cette thèse porte en grande partie sur la découverte et la caractérisation de nouveaux substrats de la voie MAP Kinase, les modes de régulations, substrats et fonctions de ce module seront décrit de manière approfondie dans les sections 1.2, 1.3 et 1.4.

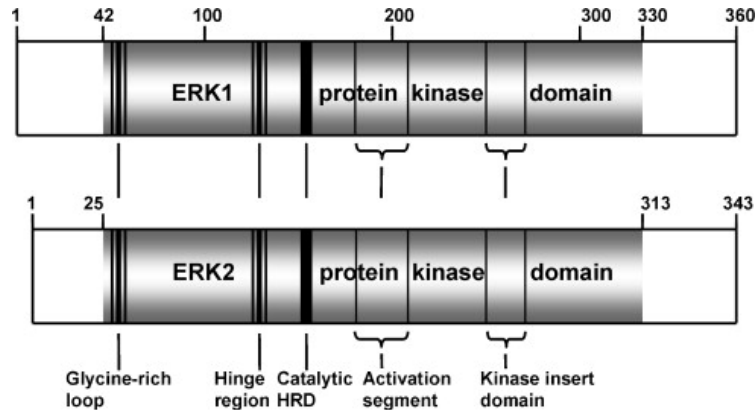


Figure 1-2 **Architecture du domaine kinase de ERK1/2**

Adapté de Roskoski, R. (2012) (13)

ERK1/2 est une kinase à double spécificité « proline-directed », donc pouvant phosphoryler ses substrats sur une sérine ou une thréonine en amont d'une proline. Le motif préférentiel de phosphorylation comporte de plus une proline en position -2, formant le motif consensus P-X-pS/pT-P. Puisque plusieurs kinases comportent un motif de phosphorylation similaire, la spécificité de phosphorylation de ERK1/2 vis-à-vis ses substrats est aussi en partie dépendante de sa capacité à les lier via un domaine d'interaction DEF ou domaine D (21, 22). Ceux-ci possèdent respectivement une séquence consensus F-X-F-P et $(R/K)_{2-3}-(X)_{1-6}-\Phi-X-\Phi$, où Φ est un acide aminé hydrophobe, ce qui permet leur liaison à ERK1/2 sur son domaine CD ou FRS, présents à l'extrémité C-terminale et caractérisés par une séquence riche en acide aminés acides suivis d'un sillon hydrophobe(23-26).

1.1.1.2 p38

Origine

Le premier effecteur de cette voie de signalisation, la MAP Kinase p38 α , fut découvert par plusieurs groupes simultanément quelques années suivant les premiers travaux sur la voie Ras-MAP Kinase. L'activité de la kinase ainsi que la phosphorylation de la thréonine et

tyrosine de son motif T-X-Y furent observés en réponse à différents stress cellulaires (stress osmotique, choc thermique, endotoxines, traitements à l'interleukine-1 et au lipopolysaccharide (LPS) (27-29). L'ADNc codant pour la première isoforme de cette protéine fut cloné en 1995, la même année que la découverte de la première MAPKK en amont, MKK3 (30, 31). Le clonage des trois autres isoformes (p38 β , p38 δ , p38 γ) est survenu les trois années suivante (32-34). Ceux-ci restent à ce jour moins étudiés que la première isoforme identifiée de la famille, p38 α .

Composantes et structure

Similairement aux autres MAP Kinases classiques, la voie p38 est sujette à une signalisation à trois modules. Ainsi, la MAPKKK en amont (TAK1/MLK3/ASK1/MEKK4) phosphoryle son substrat MAPKK (MKK3/4/6), qui à son tour phosphoryle la MAP Kinase p38 dans sa boucle d'activation sur le motif consensus T-X-Y. La cascade de signalisation de cette voie est plus complexe que celle de la voie Ras-MAP Kinase cependant, les MAPKKK de cette voie n'étant pas en mesure d'activer toutes les MAPKK en aval, et similairement tous les isoformes de p38 ne sont pas phosphorylés par les mêmes MAPKK en amont (figure 1-3). Il est intéressant de noter que plusieurs MAPKKK responsables de l'activation de la voie p38 sont aussi aptes d'activer la voie JNK, mais via des MAPKK différentes (MKK4/7 pour JNK, et MKK3/6 pour p38) (35). MKK4 semble toutefois capable d'activer les deux voies simultanément et en réponse aux mêmes stimuli (36, 37). Ainsi, différents stimuli peuvent conduire à l'activation sélective de certaines composantes de la voie et induire une réponse cellulaire spécifique.

Similairement à ERK1/2, les kinases de la famille p38 phosphorylent leurs substrats sur une sérine ou une thréonine suivies d'une proline. L'existence d'une proline en position +1 n'est pas strictement essentielle mais est observée chez une majorité de substrats de p38 (38). Bien que ce motif de phosphorylation soit identique à celui de ERK1/2 et des kinases CDK

classiques, la spécificité de substrat est conférée entre-autres par la présence de domaines de liaison (39).

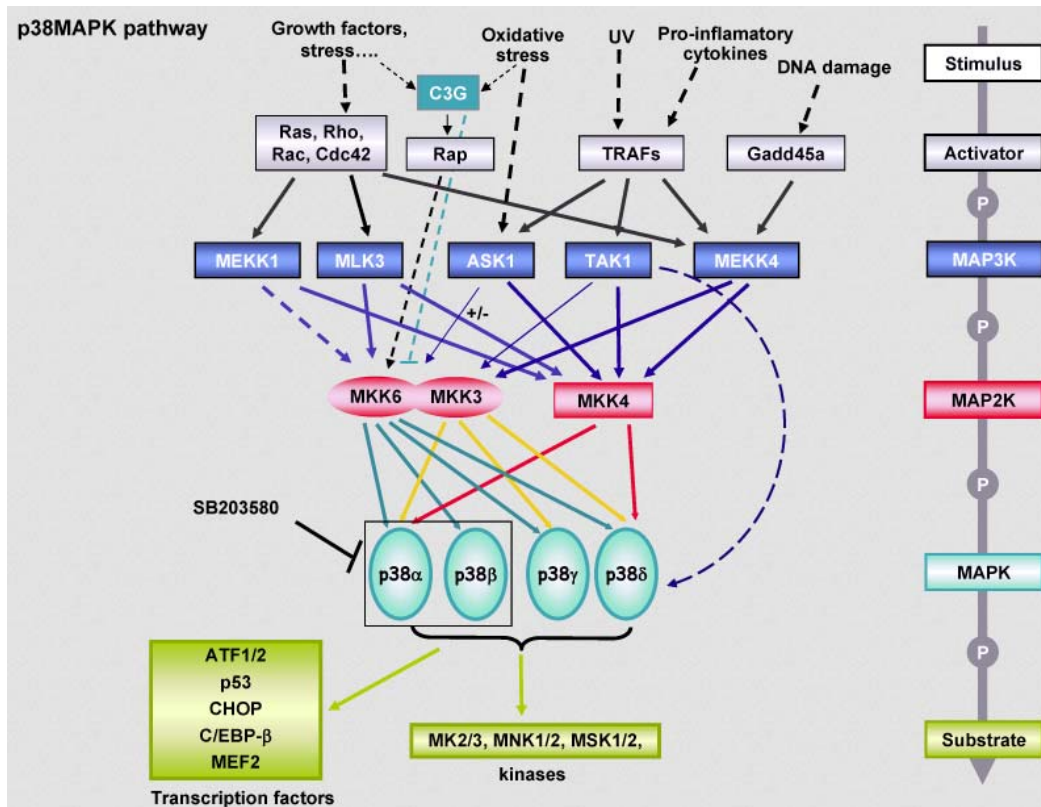


Figure 1-3 La voie de signalisation p38.

Issu du site internet : <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/MAPK14-p38ainCancerID20089.html>

Fonctions

L'isoforme p38 α est sans aucun doute le membre le mieux caractérisé de la famille. L'inactivation du gène codant cette protéine chez la souris mène à la mort de l'embryon tôt dans son développement. Bien qu'une diminution importante du tissu musculaire cardiaque et une malformation des vaisseaux sanguins au niveau du crane ont été observés, ce phénotype semble lié de manière prédominante à une diminution des transferts en nutriments et en oxygène à travers la membrane placentaire (40). L'élimination de ce défaut placentaire permet effectivement aux animaux p38 $\alpha^{-/-}$ de se développer à terme. De plus, la délétion sélective du

gène chez la souris adulte induit une prolifération abondante des cellules progénitrices pulmonaires et une différenciation aberrante (41). Par ailleurs, p38 semble jouer un rôle important dans la différenciation de nombreux types cellulaires, notamment le système hématopoïétique, cardiaque et neuronal (42-44).

Bien qu'un grand nombre de substrats de p38 soient à ce jour identifiés, c'est son implication dans l'inflammation et dans l'immunité qui en fait une voie encore très étudiée (45-48). Effectivement, la stimulation de la voie par des composés chimiotactique, le LPS ou des cytokines telles que l'interleukine 1 (IL-1) induit l'expression de plusieurs gènes liés à la réponse inflammatoire, notamment la cyclooxygénase-2 (COX-2) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) (49-51). De plus, la délétion du gène dans un modèle de macrophages induit une diminution de l'expression d'interleukine 12 (IL-12) et 18 (IL-18) (52). Plusieurs mécanismes ont été suggérés concernant le rôle exact de p38, tels que l'activation de la voie NF- κ B ou encore la stabilisation du transcrit primaire d'ARNm de gènes pro inflammatoires (51, 53).

L'activation de p38 est aussi observée lors de la transition G2/M en réponse à un stress génotoxique, menant à un blocage du cycle cellulaire via un mécanisme dépendant de la phosphorylation de Cdc25 (54). Des études subséquentes dans de multiples modèles ont ensuite clairement démontré un rôle important pour p38 dans l'arrêt du cycle cellulaire suivant plusieurs types de stress induisant un dommage à l'ADN (55-59). Finalement, la voie p38 est aussi impliquée dans la régulation de l'autophagie et de l'apoptose (60-62). En dépit d'une littérature conflictuelle concernant son rôle pro-apoptotique dans les cellules cancéreuses, plusieurs études tendent à démontrer que de manière générale la voie p38 induit l'apoptose, notamment selon un mécanisme dépendant de la phosphorylation directe de p53 par p38 menant à l'arrêt du cycle cellulaire (61, 63-65).

1.1.1.3 JNK

Origine

Similairement à ERK1/2, la première MAP Kinase JNK fut identifiée en 1990 comme une kinase responsable de la phosphorylation de MAP-2 suivant une injection intrapéritonéale de cycloheximide chez le rat (66). La phosphorylation et l'activation du facteur de transcription c-Jun par cette kinase lui a valu le nom de c-Jun N-terminal Kinase (JNK) (67). Deux autres membres de la famille JNK ont rapidement été découverts suivant le traitement à différentes cytokines ou au stress cellulaire (l'irradiation aux rayons ultraviolet, le traitement à l'interleukine 1 et au TNF α) (67–69). La stimulation de cette voie induit notamment l'activation des facteurs de transcription c-Jun, TCF/Elk-1, ATF2, c-myc et c-fos de manière similaire à une stimulation de la voie Ras-MAP Kinase mais en réponse à des stimuli différents et sans activation de l'autre voie signalétique (35, 69-72). En tout, une dizaine d'isoformes ont été découverts pour les trois membres de la famille JNK résultat de l'épissage alternatif (69). Finalement, les kinases en amont de la voie JNK, MKK4/7, ont été identifiées et clonées parallèlement par deux groupes distincts en 1997 (73, 74).

Composantes et structure

Structurellement, les membres de la famille JNK sont similaires aux autres MAP Kinases conventionnelles. JNK1/2 sont ubiquitaires et possèdent une taille de 46 kDa, alors que JNK3 code une protéine de 55 kDa au domaine N-terminal plus long et s'exprime majoritairement dans les gonades ainsi que le tissu neuronal et cardiaque (75). Sa boucle d'activation T-P-Y correspond au motif que partagent toutes les MAP Kinases classiques, et sa phosphorylation dépend de l'activation de MAPKK en amont (76). Puisque cette voie partage une majorité de MAPKKK avec la voie p38, il n'est pas étonnant que plusieurs des mêmes stimuli entraînent l'activation des deux voies (36). Cependant, alors que MKK4 phosphoryle à la fois les membres de la voie JNK et p38, MKK7 est spécifique à JNK (37, 74).

Fonctions

La voie JNK partage plusieurs similarités avec la voie p38, notamment la réponse à divers agents causant du stress cellulaire. Cependant, la réponse cellulaire causée par l'activation de ces voies est souvent opposée. Effectivement, la phosphorylation de c-Jun sur les sérines 63 et 73 par JNK et l'activation subséquente du facteur de transcription AP-1 permet la progression du cycle cellulaire via l'expression de cycline D1, alors que l'activation de p38 agit plutôt en bloquant le cycle en G2/M (77, 78). D'autres études ont cependant démontré que la dégradation de JNK est essentielle à certaines phases du cycle cellulaire. Un groupe a ainsi remarqué que l'expression d'une forme non-dégradable de JNK par l'APC/C(Cdh1) induit des défauts dans l'assemblage du fuseau mitotique et un arrêt des cellules en mitose (79). Ce rôle de régulateur positif de la prolifération a aussi été observé dans un modèle de fibroblastes embryonnaires murin (MEF), où la délétion de *Jnk1* et *Jnk2* mène à une diminution importante de l'expression de cycline D1, et un blocage lors de la transition G1/S (80, 81).

La voie de signalisation JNK joue aussi un rôle important dans le contrôle de l'apoptose. Plusieurs groupes ont ainsi démontré que l'activation de JNK par de multiples stimuli/stress cellulaire est suffisant pour induire l'apoptose (60, 82, 83). Un des mécanismes suggérés passerait par une libération du cytochrome C dans le cytoplasme suivant un dommage à l'ADN (84). JNK peut aussi directement activer certains facteurs apoptotiques mitochondriaux, par exemple suite à l'activation de BAX suivant la phosphorylation du facteur pro-apoptotique BIM (85). JNK peut aussi directement induire l'expression de facteurs pro-apoptotiques via la phosphorylation de facteurs de transcriptions tel que c-Jun (86). Bien que quelques études suggèrent un rôle anti-apoptotique de la voie JNK dans certains contextes, une abondante littérature s'entend pour dire que son activité est généralement d'ordre pro-apoptotique (87, 88).

Fonctionnellement, peu de différences ont été décrites entre JNK1 et JNK2, leur principaux rôles consistant notamment au contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération, de

l'apoptose, de la réponse immunitaire, de l'inflammation, de la différenciation, de la migration et dans la tumorigénèse (revue dans (86, 88, 89)). JNK3 semble cependant avoir des rôles uniques au niveau de plusieurs pathologies de dégénérescence neuronale, dont la maladie d'Alzheimer. Plusieurs études ont noté que l'expression et l'activation de JNK3 suite à un stress important au système nerveux induit l'apoptose de ces tissus, et que la délétion du gène chez la souris protège celles-ci suite à une ischémie (90, 91).

1.1.1.4 ERK5

Origine

ERK5, identifiée sous le nom de BMK1 (Big MAP Kinase 1), est le dernier membre de la famille des MAP Kinases classique à être découvert et sans aucun doute le moins bien caractérisé (92). L'identification des MAP Kinases en amont de ERK5 n'est survenue qu'à partir de 1997, et la caractérisation de ses variants d'épissage n'a suivi qu'en 2001 (93-95). Les travaux précoces sur cette protéine lui suggèrent un rôle similaire à celui des MAP Kinases ERK1/2 en réponse à des traitements aux facteurs de croissance ainsi qu'au stress oxydatif et osmotique (95, 96). Encore aujourd'hui, cette voie reste peu étudiée en comparaison aux autres voies de signalisation MAP Kinase.

Composantes, structure et fonctions

ERK5 possède une taille beaucoup plus grande que les autres MAP Kinases classiques, à 98 kDa. Le motif de la boucle d'activation est le même que celui d'ERK1/2, mais ERK5 diffère par la grande taille de son domaine C-terminal et la présence d'un domaine régulateur « loop-12 » riche en séquences P-A / P-T dont la fonction précise est encore inconnue (97, 98). La queue C-terminale semble avoir deux fonctions inhibitrices quant à l'activité catalytique de ERK5 (99). Premièrement, la délétion graduelle de cette portion induit une augmentation importante de l'activité enzymatique de la kinase. De plus, il semble que l'autophosphorylation d'ERK5 sur cette section induit un changement conformationnel qui

libère le domaine NLS et permet la translocation d'ERK5 vers le noyau, où ses principaux substrats se situent (99). L'autophosphorylation de la portion C-terminale contribue aussi à potentialiser l'activité kinase de l'enzyme (100). Contrairement aux autres MAP Kinases classiques, ERK5 est le seul membre de son module, de même que la MAPKK en amont, MEK5. Il est intéressant de noter que les MAPKKK MEKK2 et MEKK3 sont capables à la fois de phosphoryler MEK5, spécifique à la voie ERK5, et les MAPKK des voies p38 et JNK (101-104).

Similairement à ERK1/2, ERK5 semble aussi avoir des rôles dans la prolifération, le cycle cellulaire, la différenciation, la migration et la survie (97, 98, 105-107). Il a été observé que la délétion du gène d'ERK5 dans un modèle murin induit la mort embryonnaire dû à des défauts dans le développement du système cardiovasculaire, suggérant son importance dans le développement (108, 109). Un groupe a subséquentement démontré que ERK5 régulerait la différenciation normale du tissu endothélial en réponse au VEGF (110, 111). Finalement, une expression élevée d'ERK5 est observée dans plusieurs types de cancers, et pourrait contribuer à la régulation de l'angiogenèse en réponse au VEGF (112-114).

1.1.2 Les voies MAP Kinases atypiques

1.1.2.1 ERK3/4

Origine

La découverte et le clonage des gènes codant pour les deux MAP Kinases ERK2 et ERK3 de rat, *Mapk1* et *Mapk6* respectivement, survient simultanément en 1991 (5). Ces découvertes sont effectuées par homologie de séquence à l'aide d'une sonde basée sur la séquence du domaine kinase de ERK1. La taille prédite pour la protéine ERK3 est alors d'approximativement 63 kDa. Le clonage subséquent de *Mapk6* chez l'homme et chez la souris révèle cependant qu'une erreur de séquençage lors de sa caractérisation chez le rat lui confère un codon stop prématuré, et indique que la protéine serait plutôt d'environ 100 kDa (115, 116). Le gène codant ERK4, *Mapk4*, fut cloné l'année subséquente par le groupe de

Roger J. Davis et son produit est aussi initialement décrit comme une protéine de 63 kDa (117). Ce gène fut également revisité à la suite de la réalisation de l'erreur sur la séquence de ERK3 et a permis d'établir que ERK4 aurait en fait une masse de 70 kDa (118).

ERK3 et ERK4 diffèrent significativement de ERK1/2 au niveau structurel. Combiné au fait qu'on ne lui identifie pas de substrats ou de rôles aussi important que ceux des MAP Kinases ERK1/2 tôt suite à sa découverte, ces caractéristiques font que ERK3/4 sont peu étudiées en comparaison aux autres membres de cette famille.

Composantes, structure et rôles connus

Les MAP Kinases ERK3/4 diffèrent du reste des MAP Kinases classiques de plusieurs façons. Premièrement, la boucle d'activation du domaine kinase ne présente pas le motif T-X-Y commun à ces dernières, mais plutôt une séquence S-E-G, où seule la phosphorylation de la sérine est observée. Les kinases en amont responsables de cette phosphorylation, p21-activated kinases 1/2/3 (PAK1/2/3) furent identifiées en 2011 (119, 120). L'absence de l'identification d'un module à trois MAP Kinases à ce jour est une autre caractéristique qui distingue cette voie de la famille classique. Il a été démontré cependant qu'une forme constitutivement active de la MAPKKK B-Raf induit fortement l'expression d'ERK3, sans toutefois sembler jouer un rôle dans l'activation de la voie ou de sa phosphorylation (121). Afin d'étudier le rôle dans l'activité kinase de la boucle d'activation d'ERK3/4, le motif S-E-G, le groupe de Mélanie H. Cobb a inséré ce motif en remplacement de la boucle classique T-E-Y au sein de ERK2 et observé la perte totale d'activité catalytique (122). Cette observation, ainsi que l'absence de substrats connus de ERK3/4 jusqu'en 2008, ont soulevé l'hypothèse que ces kinases n'aient pas d'activité catalytique. Cette hypothèse fut réfutée lorsque le premier substrat de ERK3/4, MK5, fut identifié et qu'on reconnaisse que la phosphorylation de la sérine du motif S-E-G présent dans la boucle d'activation soit à la fois suffisant et nécessaire pour lui incomber une activité kinase (123).

Les deux kinases, et en particulier ERK3, possèdent une longue extrémité C-terminale dont le rôle n'est pas encore bien défini. Certaines études lui suggèrent un rôle dans la

localisation cellulaire de l'enzyme ou pour la liaison de protéines comme la cycline D3 et Cdc14A (124, 125). Le portion N-terminale des deux enzymes contient le domaine kinase qui possède une homologie de séquence de près de 50% avec les kinases ERK1/2.

Très peu de fonctions ont été découvertes concernant l'activité de ERK3/4. D'une part, un seul substrat connu n'a été caractérisé à ce jour, la kinase MK5, dont les rôles dans la cellule sont encore peu documentés (119). Considérant que la voie ERK3/4 ne réagit pas aux stimuli extracellulaires à l'instar de plusieurs autres MAP Kinases, les fonctions connues de cette kinase s'appuient sur des études de surexpression ou d'inhibition de la protéine. La génération d'une souris transgénique dont le gène de ERK3 fut remplacé par une cassette LacZ suggère que ERK3 a un rôle dans le développement, plus particulièrement au niveau de la maturation pulmonaire (126). Des données provenant de notre laboratoire, en collaboration avec celui du groupe de Nathalie Labrecque, suggèrent aussi que ERK3 aurait un rôle dans la différenciation et la maturation des thymocytes (127, 128).

1.1.2.2 NLK

Origine

Le gène codant la kinase Nemo a été identifié en 1994 chez l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*, où la mutation du gène cause une rotation incomplète des cellules photoréceptrices de l'œil de la mouche lors de son développement et induit une baisse importante de leur viabilité (129). L'homologue murin de cette protéine fut cloné quelques années subséquentes par homologie de séquence avec ERK1 et renommé Nemo-like kinase (NLK) (130). Bon nombre d'études sur cette kinase s'intéressent principalement à ses fonctions de régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine et dans le développement (131-136).

Fonctions

Similairement aux MAP Kinases atypiques ERK3/4, NLK diffère des MAP Kinase classiques de par ses extrémités N- et C-terminales plus longues, le motif phospho-accepteur unique de sa boucle d'activation T-Q-E et par la présence d'un domaine AHQr (riche en alanine, histidine et glutamine) à son extrémité N-terminale. Le rôle de ce domaine pour NLK reste toutefois inconnu à ce jour.

La kinase directement en amont de NLK n'a pas été identifiée à ce jour, mais l'activation de NLK par la MAPKKK TAK1 est maintenant bien documentée (131, 134, 137). Alors qu'une étude propose que HIPK2 serait apte à phosphoryler NLK dans sa boucle d'activation, d'autres groupes suggèrent plutôt que NLK s'autophosphoryle afin d'atteindre un niveau maximal d'activité kinase (130, 138).

Plusieurs substrats ont été identifiés pour NLK, incluant des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF, STAT3, le proto-oncogène c-myb, Notch ainsi que la protéine adaptatrice de mTORC1, raptor (137-142). Dans plusieurs cas, l'activation de NLK est corrélée à l'inhibition de ces voies de signalisation. Par exemple, la phosphorylation de Notch par NLK empêche sa forme clivée cytosolique de lier ses partenaires CBF-1 et mastermind et limite son activité transcriptionnelle (142). De plus, l'inhibition de l'expression de NLK dans l'organisme modèle *Danio rerio* cause une activation importante de la voie Notch. Similairement, la phosphorylation du facteur de transcription TCF par NLK empêche β -caténine de former un complexe avec ce dernier, inhibant en partie l'aboutissement de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (137). Certains groupes s'intéressent d'ailleurs au potentiel thérapeutique de NLK, puisque l'activité de cette voie semble freiner *in vitro* la progression de certaines lignées cellulaires cancéreuses, notamment des lignées de cancer colorectal et du cancer du poumon à petites cellules (132, 143).

1.1.2.3 ERK7(8)

Origine

À l'instar de beaucoup d'autres MAP Kinases, le gène encodant ERK7, *Mapk15*, a été identifié chez le rat à partir de sondes basées sur la séquence de ERK1 (144). En dépit d'une faible homologie de séquence de 69% seulement, l'homologue humain de cette protéine fut découvert et cloné trois ans plus tard par le même groupe, qui nommèrent cette dernière ERK8 (145). Les composantes en amont de ERK7 ne sont toujours pas identifiées à ce jour et seulement 3 substrats ont été caractérisés. Le domaine de recherche de ERK7 pourrait cependant prendre un essor considérable ces prochaines années puisque de précieux outils ont récemment été mis au point, notamment un modèle de structure tri-dimensionnel du domaine kinase, des anticorps spécifiques à la forme phosphorylée et active d'ERK7, l'identification d'un résidu mutant « gatekeeper » et d'un inhibiteur spécifique de la protéine chez *Trypanosoma brucei* (146-148).

Fonctions

Bien que ERK7 possède le motif typique T-E-Y des MAP Kinases classiques dans sa boucle d'activation, suggérant l'existence d'une MAPKK en amont, une étude a démontré que ERK7 est capable d'autophosphorylation sur ces résidus et, conséquemment, de sa propre activation (149). Cette activation survient même suivant le sevrage des cellules en sérum, ce qui est intéressant considérant qu'un des premiers rôles associés à la signalisation de cette voie serait le contrôle de la prolifération (144). La queue C-terminale de ERK7, unique à cette protéine dans la famille MAP Kinase, semble jouer un rôle régulateur dans l'activation d'ERK7 ainsi que dans sa localisation subcellulaire (144, 149).

Similairement à ERK1/2, ERK7 est capable de phosphoryler la protéine basale de myéline (MBP) mais sur des résidus différents, ce qui lui suggère une spécificité de substrat différente de ERK1/2 (148). Plus récemment, la protéine régulatrice d'actine capZIP a été

identifiée comme substrat d'ERK7 (150). Dans un processus dépendant de la formation d'un complexe capZIP-Disheveled-ERK7, cette phosphorylation semble avoir un rôle important dans le développement du cil primaire. Finalement, dans une étude datant de 2016, il a été démontré que ERK8 peut phosphoryler et contrôler l'activité de HuR, une protéine de liaison à l'ARN (151). Effectivement, la phosphorylation de HuR empêcherait cette dernière de se lier et stabiliser l'ARNm de certains transcrits primaires, notamment du gène suppresseur de tumeur PDCD4. Dans le mécanisme proposé, HuR compétitionne avec un microARN, miR-21, pour la liaison à la région non traduite en 3' (3'UTR) de l'ARNm de PDCD4 et induit soit sa stabilisation ou sa dégradation, respectivement.

Outre ces substrats, quelques études de pertes de fonction ont permis d'impliquer ERK7 dans plusieurs processus cellulaires, notamment dans la protection contre le dommage à l'ADN, la signalisation des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, la sécrétion de protéines et la régulation du système de recapture de la dopamine (152-155). Les fonctions précises d'ERK7 associées à ces processus restent cependant majoritairement incomprises à ce jour.

1.2 Régulation de la voie Ras-MAP Kinase

1.2.1 Expression des composantes de la voie

Les protéines ERK1/2 sont exprimées de manière ubiquitaire et constitutive dans notre organisme. Une écrasante majorité des rôles connus pour ces kinases dépendent de leur activité catalytique suivant l'activation de la voie. Ainsi, compte tenu que ces protéines sont stables et fortement exprimées de manière générale, peu d'études s'intéressent à la régulation transcriptionnelle d'ERK1/2 en opposition à son état d'activation et de ses substrats.

L'expression de ces kinases peut varier en fonction du type cellulaire, notamment dans le cœur, le cerveau, le muscle squelettique et le thymus où l'expression la plus forte est détectée (5). ERK2 s'exprime à des niveaux plus élevés que ERK1 dans la majorité des types

de cellules chez les mammifères (156). Cependant, cette différence d'expression ne semble pas liée à une différence de fonction entre les kinases ERK1 et ERK2, qui partagent à ce jour les mêmes substrats et propriétés biochimiques. Cette question sur la redondance est intéressante puisque suivant la délétion des gènes *Mapk3*^{-/-} ou *Mapk1*^{-/-}, les animaux déficients en ERK1 sont viables et fertiles, alors que les animaux déficients en ERK2 meurent tôt dans le développement au stade embryonnaire (157, 158). Curieusement, chez le lézard, l'expression d'ERK2 n'est pas détectée dans plusieurs tissus, compensée par une forte expression d'ERK1 (156). Ceci suggère qu'un seuil minimal des niveaux totaux d'expression de l'une de ces kinases, ou la combinaison des deux, suffit pour assurer le développement normal de l'organisme. Cette hypothèse a pu être validée par une étude récente de notre laboratoire où l'expression transgénique de hauts niveaux de ERK1 dans un modèle déficient en ERK2 est suffisant pour assurer le sauvetage du phénotype de létalité embryonnaire (159). L'hypothèse à ce jour veut donc que les souris *Mapk3*^{-/-} (ERK1) sont ainsi viable en raison d'un seuil élevé de ERK2 présent de manière naturelle chez l'animal.

Un mécanisme influençant les niveaux d'expression de MAPK, l'homologue de ERK1/2 chez *D. melanogaster*, fut révélé dans les cellules S2 (160). À la suite d'un criblage d'ARNi afin d'identifier des régulateurs de la voie, il fut démontré que l'inhibition des protéines du complexe exon-jonction (EJC) induit une diminution importante de l'expression de MAPK suite à des défauts dans l'épissage de l'ARNm du gène *Mapk*. Ce mécanisme serait particulièrement critique pour les transcrits d'ARNm possédant de longues séquences introniques flanquant les exons, tel que dans le cas du transcrit du gène *Mapk*. Considérant que les homologues du gène chez le mammifère possèdent aussi ces longues séquences, il n'est pas exclu que ce mécanisme s'applique similairement pour ces espèces.

ERK1/2 sont des kinases stables de manière générale, mais la demi-vie observée varie de façon importante en fonction de l'organisme. D'une part, des études protéomiques dans une lignée murine de fibroblastes suggère des demi-vies pour ERK1 et ERK2 de 68h et 53h, respectivement (161). Dans une autre étude du groupe de Marc Therrien chez la drosophile, la

demi-vie de la protéine MAPK semble plutôt de l'ordre d'environ 13h (162). Ce même groupe a d'ailleurs démontré que la déubiquitinase USP47 joue un rôle stabilisateur auprès de MAPK chez la mouche (162). Un crible à l'ARN interférant a permis de lier des composantes de la machinerie de la règle N-terminale comme régulateur de la stabilité de MAPK en opposant l'action de USP47. Le mécanisme d'action de ces enzymes sur la stabilité de MAPK reste toutefois à être déterminé. Le groupe de Tony Hunter a cependant démontré dans une lignée murine de fibroblastes que suivant un choc osmotique, la MAPKKK MEKK1 pouvait exercer une activité ubiquitine-ligase auprès de ERK1/2 via son domaine PHD, ciblant ces dernières pour dégradation par le système ubiquitine-protéasome (163). Ces données restent toutefois à valider, puisqu'aucun effet sur les niveaux d'ERK1/2 n'ont été observés par un autre groupe en réponse à un choc hyperosmotique (164). De plus, l'expression d'une forme sauvage ou mutante pour le domaine ubiquitine-ligase de MEKK1 chez la souris n'induit pas de différence significative dans la stabilité de ERK1/2 (165).

Localisation subcellulaire des MAP Kinases ERK1/2

Les composantes de la cascade MAP Kinase se situent, en l'absence d'une stimulation, dans le cytoplasme de la cellule. Effectivement, celles-ci doivent être en mesure de répondre rapidement à un stimulus en provenance de l'extérieur de la cellule, notamment via la liaison d'un facteur de croissance à son récepteur transmembranaire. Une telle stimulation entraîne le recrutement des composantes de la voie à la membrane plasmique où la cascade de phosphorylation a lieu.

Jusqu'à très récemment, la localisation intracellulaire de Raf était reconnue comme purement cytosolique même suite à une stimulation de la voie. Cependant, une étude a démontré qu'après l'endocytose de plusieurs types de récepteurs activés, ceux-ci pouvaient transloquer vers l'espace endosomal périnucléaire et induire une faible proportion de Raf à se retrouver au noyau (166). L'existence d'un signal d'export nucléaire (NES) dans la séquence de Raf n'a pas encore été identifié à ce jour, mais considérant sa propension à se déplacer

rapidement vers le cytoplasme, il n'est pas exclu que son association avec MEK1/2 puisse induire sa sortie du noyau dans un mécanisme similaire à celui de ERK1/2.

MEK1/2 possède en effet une puissante séquence NES qui cause l'export de la protéine du noyau à des taux dix fois supérieur à son import suivant l'activation de la voie (167-169). Cependant, MEK1/2 possède aussi une séquence signal de translocation nucléaire (NTS) à son extrémité C-terminale qui peut être phosphorylée par ERK1/2. La phosphorylation de ce motif est nécessaire pour induire sa translocation vers le noyau et, en dépit d'un signal NES beaucoup plus puissant que le NTS, permettre à MEK1/2 de faire la navette entre les deux compartiments subcellulaires (170). Puisque MEK1/2 phosphoryle ERK1/2 dans le cytoplasme, les rôles de ce mécanisme ne sont pas clairement définis à ce jour mais l'hypothèse que MEK1/2 induise l'export de protéines ne possédant pas de séquence NES, tels que ERK1/2 ou le récepteur nucléaire PPAR γ , est la plus plausible (169, 171).

Similairement à MEK1/2, ERK1/2 possède une séquence NTS pouvant être phosphorylée à son extrémité C-terminale et qui lui permet de transloquer vers le noyau. Ce mécanisme est dépendant de la liaison de ce domaine à l'importine γ et à l'importine β , qui facilite l'entrée nucléaire d'un dimère de ERK1/2 de manière active (172). Un second mécanisme de transport passif a aussi été décrit, où ERK1/2 activé sous forme monomérique peut simplement migrer à travers les pores nucléaires (173). La phosphorylation de ERK1/2 est cependant nécessaire pour induire sa translocation au noyau, sans quoi la protéine reste au cytoplasme. L'absence d'un NES dans la séquence de ERK1/2 lui permet cependant de s'accumuler au noyau suivant stimulation de la voie MAP Kinase afin d'effectuer ses fonctions nucléaires. Suivant la stimulation, une certaine proportion demeure dans le cytoplasme, où de nombreux substrats de ces kinases existent.

1.2.2 Mécanismes d'induction de la voie

1.2.2.1 Voie des récepteurs tyrosine kinase

La voie MAP Kinase peut être activée par la liaison de facteurs de croissance à la portion extracellulaire de son récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) (Figure 1-4). Ce mécanisme fut le premier à être identifié menant à l'observation d'une activité MAP Kinase, notamment suite à une activation des récepteurs à l'EGF, au NGF ainsi qu'au FGF (174-176). L'activation de la voie de signalisation débute par la liaison du ligand extracellulaire à son récepteur membranaire possédant une activité tyrosine kinase, ce qui entraîne la dimérisation de celui-ci et la phosphorylation de certaines tyrosines au sein de son propre domaine intracellulaire (177, 178). Le domaine SH2 de la protéine adaptatrice *Growth factor receptor bound-protein 2* (GRB2) s'ancre à ce motif phospho-tyrosine, ce qui permet par la suite le recrutement d'un facteur d'échange de nucléotides guanyliques (GEF), Son of Sevenless (SOS) (179-181). L'activité GEF de SOS est nécessaire à l'échange du GDP pour un GTP sur son substrat, la petite GTPase Ras, ce qui l'active à son tour et permet le recrutement subséquent et la dimérisation de Raf à la membrane plasmique (182, 183). L'activation de la MAPKKK Raf conduit cette dernière à phosphoryler les MAPKK MEK1/2 sur deux sérines présentes dans sa boucle d'activation, induisant un changement conformationnel permettant l'ouverture et l'activation du domaine catalytique de MEK1/2 (8, 184, 185). La cascade de phosphorylation se poursuit ensuite par la phosphorylation et l'activation de l'unique substrat de MEK1/2 bien caractérisé à ce jour, les MAP Kinases ERK1/2 (10, 15).

1.2.2.2 Voie des récepteurs couplés aux protéines G

Un autre mécanisme bien documenté d'activation de la voie est celle des récepteurs couplés aux protéines G (Figure 1-4) (186, 187). Similairement à l'activation par les RTK, la liaison d'un ligand extracellulaire à son récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G hétérotrimériques permet l'induction d'une signalisation de la voie MAP

Kinase. En l'absence d'une stimulation, les trois sous-unités des protéines G restent liées au récepteur, et la sous-unité alpha (qui possède une activité GTPase) reste associée au GDP. Lors d'une stimulation, la portion intracellulaire du récepteur subit un changement conformationnel qui induit l'échange du GDP pour un GTP au sein de la protéine G et stimule sa dissociation du récepteur. Les composantes de la protéine G se dissocient à leur tour en sous-unités β - γ et α -GTP.

Ces deux effecteurs auront ensuite des rôles distincts dans la transmission du signal à l'intérieur de la cellule, mais plusieurs de ces mécanismes peuvent converger vers la voie MAP Kinase. D'une part, la sous-unité β - γ active la phospholipase C (PLC), qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacyl glycerol (DAG) et en inositol trisphosphate (IP₃), deux importants seconds messagers intracellulaires. Le DAG peut ensuite activer la protéine kinase C (PKC), qui elle-même est capable d'activer la voie MAP Kinase par phosphorylation directe de Raf ou encore par phosphorylation de la protéine inhibitrice de Raf kinase (RKIP), ce qui induit sa dissociation de Raf (188-190). Alternativement, les sous-unités β - γ induisent aussi ultimement la phosphorylation de la protéine d'échafaudage Shp, qui se lie à Grb2 et SOS et permet la transmission du signal via un mécanisme dépendant de l'activation de Src par PI3K (191).

L'activation de la voie des récepteurs couplés aux protéines G induit aussi une activation de la voie MAP Kinase via un mécanisme dépendant des β -arrestines (Revu dans (192)). Ce mode d'activation est cependant plus lent et permet une activation de ERK1/2 maximale sur une plus longue période que celle de la voie classique des protéines G (193). De plus, certains agonistes peuvent induire l'activation spécifique de la voie des protéines G, de la voie des beta-arrestines, ou les deux selon le contexte cellulaire (194, 195).

L'activation de la voie des récepteurs couplé aux protéines G peut aussi exercer un effet inverse sur la voie MAP Kinase. Dans un mécanisme démontré par plusieurs groupes simultanément en 1993, il a été rapporté que l'activation de la voie de l'AMPc et de la PKA a

un effet inhibiteur de l'activation du module MAP Kinase (196-199). Effectivement, la sous-unité α -GTP générée par la stimulation du récepteur active l'adénylate cyclase (AC), dont l'activité catalytique consiste en la transformation de l'ATP en AMPc. Ce second messenger induit l'activation de la PKA, qui phosphoryle de nombreux effecteurs intracellulaires, dont la MAPKKK Raf. Le mécanisme se complexifie davantage à ce point, puisque selon l'isoforme de Raf phosphorylé, l'effet de l'AMPc/PKA peut inhiber ou activer la voie. Alors que les groupes de recherche en 1993 observent un effet inhibiteur lorsque PKA phosphoryle C-Raf, des études subséquentes rapportent plutôt que la phosphorylation de B-Raf stimule cette voie dans les cellules PC12 (200, 201).

1.2.2.3 Voie des intégrines

Outre la stimulation de facteurs de croissance ou d'agents mitogéniques, la voie MAP Kinase peut être activée en réponse à des signaux du milieu extracellulaire et en fonction de l'adhésion des cellules à cette matrice. Ces mécanismes dépendent en grande partie de l'induction de la voie des intégrines (Figure 1-4). Par exemple, l'activation des intégrines provoque l'activation de Src aux points focaux d'adhésion, qui phosphoryle la protéine tyrosine-kinase FAK et crée un site de liaison pour la protéine adaptatrice Grb2 via son domaine SH2 (202). Le complexe Grb2/FAK/SOS est ensuite apte à induire l'activation du reste de la voie MAP Kinase. La stimulation des intégrines peut aussi activer Fyn, qui phosphoryle la protéine adaptatrice Shc sur la tyrosine 317 et induit une activation de la voie MAPK dans un mode d'action similaire à celui qui a été décrit pour la stimulation des récepteurs aux protéines G et PI3K (203). Finalement, l'adhésion des intégrines à la fibronectine de la matrice extracellulaire induit la phosphorylation sur la sérine 298 de MEK1 par p21-activated kinase 1 (PAK1) (204, 205). Cette induction de l'activité de PAK1 peut aussi être médiée par la cascade de signalisation Rac1/Cdc42, qui se situe aux complexes d'adhésion focaux et agit en réponse à une signalisation des intégrines (206).

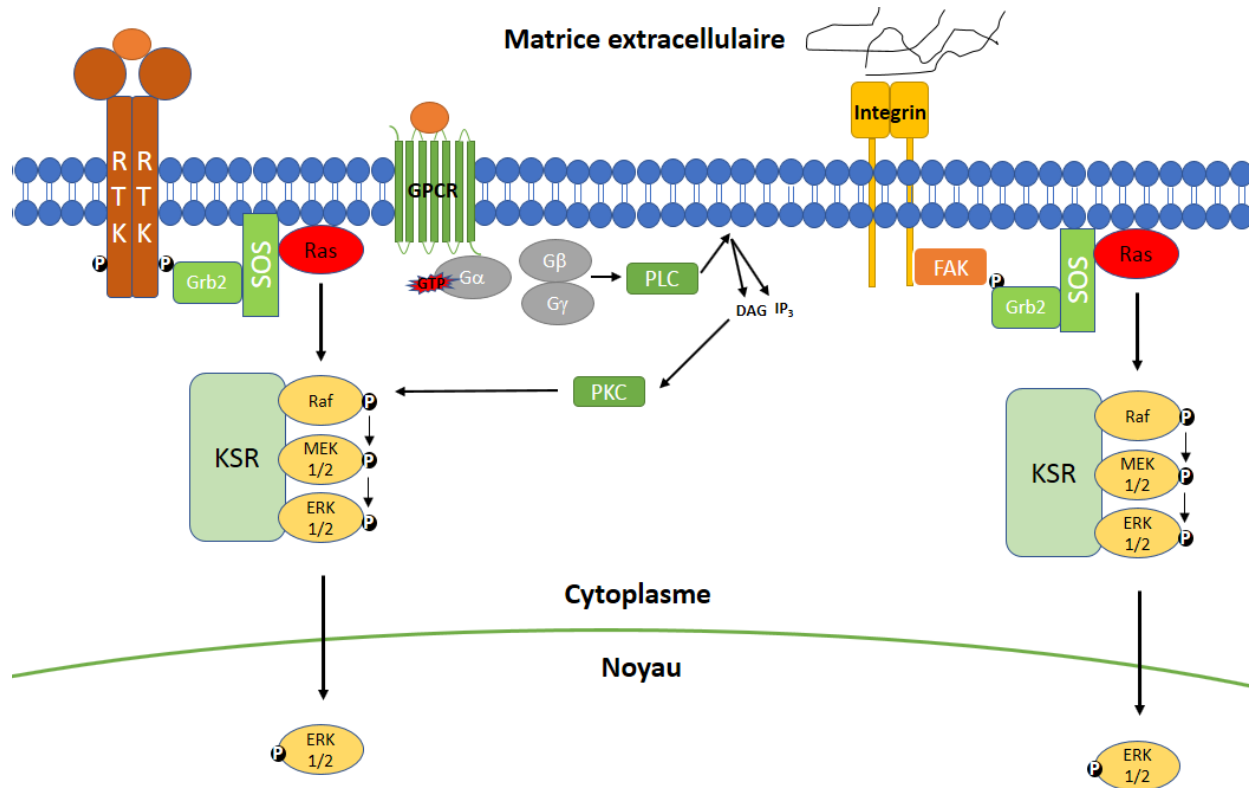


Figure 1-4 **Résumé des principaux modes d'activation de la voie MAPK**

1.2.3 Mécanismes d'inhibition de la voie

Pour que l'activation d'une voie de signalisation ait une pertinence biologique, celle-ci doit pouvoir être subséquemment désactivée en absence de stimuli afin de pouvoir y répondre à nouveau dans le futur. Ainsi, ces mécanismes sont critiques au contrôle temporel de la signalisation et permettent même dans une certaine mesure de dicter la spécificité du signal. Par exemple, l'induction du gène précoce immédiat c-Fos ne nécessite qu'une activité MAP Kinase de courte durée, mais reste instable en l'absence d'une signalisation soutenue et ne possède que des rôles transcriptionnels limités. En présence d'une activité MAP Kinase forte et soutenue, c-Fos s'accumule et peut être phosphorylé sur son extrémité C-terminale par les membres des familles ERK et RSK, conduisant à sa stabilisation et à son accumulation

nucléaire. Cette accumulation mène à la formation du complexe AP-1 et à un rôle transcriptionnel beaucoup plus important (207).

1.2.3.1 Phosphatases de la voie MAP Kinase

Tout comme la phosphorylation de ses composantes entraîne l'activation de la voie MAP Kinase, la déphosphorylation de celles-ci conduit à un arrêt de la transmission du signal. Principalement deux grandes classes de phosphatases permettent la régulation de cette voie : les protéine-tyrosine phosphatases (PTP) et les protéine-sérine/thréonine phosphatases (PSP).

Protéine-tyrosine phosphatases (PTP)

Les PTP forment une superfamille de plus de 100 membres, classés en 4 sous-groupes en fonction de l'architecture de leur domaine enzymatique. Étant apte à déphosphoryler les résidus tyrosines, leurs actions sur la voie MAP Kinase s'exercent à plusieurs niveaux. À la membrane plasmique, les tyrosines phosphorylées dans la portion cytosolique des RTK sont des cibles de plusieurs membres de cette famille, dont TCPTP, PTP1B, PTPe et DEP-1 pour n'en nommer que quelques-uns (208-212). DEP-1 a par ailleurs aussi été démontré apte à déphosphoryler directement la tyrosine de la boucle d'activation de ERK1/2 (213). Cependant, toutes les phosphatases agissant au niveau des RTKs n'ont pas un rôle strictement d'inhibition de la voie. Il fut démontré en 2014 que la phosphatase PTPD1, surexprimée dans plusieurs types de cancer, potentialise l'activation du récepteur à l'EGF suivant sa stimulation (214). Un autre exemple bien documenté est celui de la phosphatase SHP-2. La déphosphorylation de la tyrosine 992 du récepteur à l'EGF par cette dernière bloque le recrutement d'un régulateur négatif de Ras, RasGAP, ce qui potentialise l'activation de la voie (215). Dans un mécanisme alternatif, SHP-2 a aussi comme substrats les membres de la famille Sprouty, dont la forme phosphorylée inhibe l'activité de la voie MAP Kinase (216).

Les MAPK phosphatases (MKP) sont des phosphatases à double spécificité (DUSP) de la grande famille des PTP capables de déphosphoryler les résidus phosphothréonines et phosphotyrosines présents dans la boucle d'activation des MAP Kinases. Onze membres de cette famille ont été identifiés et se déclinent en trois sous-classes dépendant de leur distribution subcellulaire et leur spécificité de substrat. Alors que les MKPs de type III agissent spécifiquement au niveau des MAP Kinases p38 et JNK, les types I et II agissent sur ERK1/2 au niveau du noyau et du cytoplasme, respectivement (217). L'activité de ces MKPs ne se limite pas seulement à la déphosphorylation de ERK1/2. Il a été démontré que la liaison de DUSP 5 et DUSP6 à ERK1/2 module sa localisation subcellulaire et, conséquemment, son activité vis-à-vis ses substrats (218). De manière intéressante, la phosphorylation de DUSP1 par ERK1/2 sur deux sérines à son extrémité C-terminale prévient sa dégradation subséquente, suggérant un mécanisme alternatif de rétro-inhibition de la voie MAP Kinase (219).

Protéine- sérine/thréonine phosphatases (PSP)

Les PSP forment une famille d'une trentaine de membres dont l'identification des premières composantes remonte aussi loin que celle des premières MAP Kinases dans les années 1980, via des travaux notamment du groupe de Philip Cohen (voir la revue (220)). Bien que trois sous-groupes de PSP existent, les membres du groupe des phosphoprotéines phosphatases (PPP) ont le rôle le mieux documenté dans la régulation signalétique de la voie MAP Kinase, en particulier PP2A. Cette phosphatase est apte à déphosphoryler et inactiver plusieurs membres de la famille MAP Kinase, dont MEK1/2 et ERK1/2 (221-223). Ces études ont démontré que l'inhibition de PP2A par le simian virus 40 (SV40) et l'acide okadaïque provoque une activation forte et soutenue de la voie. Similairement, l'expression d'un mutant dominant-négatif de PP2A dans le cerveau de souris transgéniques induit une augmentation de la forme phosphorylée de MEK1/2 (224). Cependant, dépendamment du contexte cellulaire, un effet opposé de PP2A peut être observé sur la voie MAP Kinase. Des travaux chez la drosophile suggèrent ainsi que cette phosphatase peut potentialiser l'activation de la voie en aval de Ras, mais déphosphoryler deux résidus de Raf qui inhibent son activité catalytique via

la création d'un site d'ancrage 14-3-3 (225). Cet effet a aussi été observé dans un modèle cellulaire, où la déphosphorylation de Raf-1 ou B-Raf mène à l'activation de la voie (226, 227). Cependant, on reconnaît généralement que l'activité de PP2A inhibe l'activation de la voie MAP Kinase.

1.2.3.2 Boucles de rétro-inhibition

Afin d'exercer une réponse biologique adéquate et temporelle, l'activation de la voie conduit à plusieurs mécanismes de rétro inhibition à court et à long terme. Ces boucles sont dépendantes de l'activité de ERK1/2, et se déclinent en deux types de réponse : la phosphorylation d'effecteurs de la voie MAP Kinase, dont l'effet est presque instantané, et l'expression de régulateurs négatifs de la voie, qui prend forme à plus long terme. Un résumé de ces boucles est présenté à la figure 1-5.

Boucles de rétro-inhibition par phosphorylation d'effecteurs de la voie

L'activité de ERK1/2 permet la phosphorylation et l'inhibition des composantes de la voie à presque tous les niveaux (228). À la membrane, ERK1/2 peut phosphoryler notamment la portion juxtamembranaire cytoplasmique du récepteurs EGFR sur la thréonine 669, ce qui perturbe sa capacité de dimérisation et son activité subséquente (229, 230). Ceci se traduit aussi par une diminution de la phosphorylation des tyrosines dans la portion cytosolique des récepteurs tyrosine-kinase indispensable à leur activité (231). La phosphorylation de sites similaires par ERK1/2 a aussi été observé pour les récepteurs ERBB3 et FGFR1, suggérant que ce mécanisme est bien conservé et potentiellement présent pour d'autres récepteurs (232, 233). Le rôle de ERK1/2 pour tempérer l'activité de ces récepteurs ne se limite pas qu'à la phosphorylation de ceux-ci. Effectivement, une étude rapporte que ERK1/2 phosphoryle et active la phosphatase Cdc25c, dont l'un des substrats est la tyrosine 1068 du récepteur à l'EGF (234). D'autres études suggèrent que la phosphorylation de la protéine d'échafaudage FRS2

par ERK1/2 limite sa capacité à associer GRB2 au RTK phosphorylé, bloquant ainsi la transmission du signal. Ce mécanisme a été observé à la fois pour la liaison à l'EGFR et à FGFR1 dans deux études distinctes (230, 235).

Les acteurs en aval des RTK sont aussi sujets à la rétro inhibition de la voie. Plusieurs sites de phosphorylation par ERK1/2 ont ainsi été identifiés dans la queue C-terminale du facteur d'échange de nucléotides guanyliques SOS (236). Ainsi, la phosphorylation de plusieurs sérines au sein du domaine riche en prolines (PR) de SOS diminue sa capacité à lier GRB2 ainsi que la petite GTPase Ras. Il est à noter que le changement de conformation causé par ces phosphorylations ne semble pas diminuer l'activité GEF de SOS vis-à-vis Ras. De manière intéressante, il a été démontré que la MAPKAPK RSK est aussi apte à phosphoryler et diminuer l'activité de SOS mais sur des sites différents de ERK1/2, ajoutant une strate supplémentaire de régulation négative à cette voie (237, 238). Ce mécanisme est plutôt dépendant de la création d'un site de liaison à 14-3-3 par phosphorylation de SOS par RSK, séquestrant cette composante de la voie.

L'activation de ERK1/2 a aussi un impact sur les modules MAP Kinases de sa propre cascade. B-Raf et C-Raf ont ainsi été identifiés comme des cibles de ERK1/2, mais l'impact sur son activité dépend en grande partie des résidus phosphorylés. D'une part, la phosphorylation des sérines 289, 296 et 301 par ERK1/2 semble potentialiser une activation soutenue de C-Raf (239). D'autres sites aux rôles similaires furent par la suite identifiés chez A-Raf et C-Raf (240-242). Curieusement, à l'exception des T401, S750 et T753, ces sites ne semblent pas phosphorylés pour l'isoforme B-Raf, du moins par ERK1/2, et dans plusieurs cas ne présentent pas le motif consensus minimal de ERK1/2 S/T-P présent dans les deux autres isoformes (243). À l'opposé, la phosphorylation par ERK1/2 de la thréonine 401 dans la région charnière de Raf semble perturber la formation du dimère Raf-Raf (244). D'autres sites à l'action similaires ont été identifiés pour B-Raf, et s'appliquent aussi à A-Raf et C-Raf où ils sont conservés (244, 245). Finalement, la phosphorylation de S151 de C-Raf par ERK1/2 inhibe son interaction avec Ras, ce qui bloque ou inhibe la transmission du signal (244).

Trois sites de phosphorylation par ERK1/2 ont été identifiés simultanément chez MEK1/2 en 1994 par les groupes de Jacques Pouyssegur et Daniel R. Marshak (246, 247). Bien qu'il ait été rapporté que la phosphorylation de ces trois résidus (T286, T292 et T386) diminue l'activité kinase de MEK1/2, la phosphorylation des thréonines 292 et 386 en particulier empêche de plus la liaison de MEK à ERK ainsi qu'à la protéine adaptatrice Grb10 (248-250). Paradoxalement, la phosphorylation de la T386 de MEK est indispensable pour sa translocation au noyau. Effectivement, un mutant triple-alanine inactif de la séquence signal de translocation nucléaire (NTS) TPT, dont la T386 fait partie, démontre l'incapacité de MEK1/2 à transloquer efficacement au noyau (250). Il n'a cependant jamais été démontré de manière robuste qu'aucune autre kinase ne pouvait être responsable de la phosphorylation de la T386. Un motif similaire est décrit chez ERK1/2, sous la forme SPS, et il a été suggéré que la phosphorylation de ce motif soit effectué par CK2 (251).

D'autres composantes de la cascade Ras-MAP Kinase peuvent aussi tempérer le signal suivant une phosphorylation par ERK1/2. Un exemple bien caractérisé est celui de kinase suppressor of Ras (KSR), identifiée à la fois chez le nématode et la mouche en 1995 (252, 253). Cette protéine d'échafaudage lie MEK1/2 à l'état quiescent, mais converge à la membrane et regroupe les trois membres de la cascade MAP Kinase suivant une stimulation de la voie (254-256). Plusieurs sites de phosphorylation par ERK1/2 furent identifiés au sein de KSR1 et semblent, d'une part, causer une diminution de l'affinité de KSR1 pour B-Raf ou, d'autre part, relocaliser KSR1 de la membrane au cytoplasme. La phosphorylation de la sérine 443 de KSR1 par ERK1/2 présente un effet rétro-inhibiteur particulièrement puissant, puisque la mutation de ce résidu seul suffit à induire une activation forte et prolongée de ERK1/2 (257).

Boucles de rétro-inhibition par régulation de l'expression génique

Contrairement à la phosphorylation d'effecteurs de la voie MAP Kinase, dont l'effet permet une rétroaction rapide, l'expression de régulateurs négatifs de la voie est un mode de contrôle qui est lent à s'établir et module les niveaux d'activation de la voie sur le long terme. L'expression de certaines des phosphatases traitées précédemment, dont les DUSP1, 2, 4, 5 et 6, est notamment modulée en réponse à l'activité MAP Kinase, inactivant ERK1/2 et formant ainsi une boucle de rétro-inhibition (217). Le cas de DUSP6 est particulièrement bien documenté, son expression dépendant de l'interaction directe d'ERK1/2 avec le facteur de transcription ETS1 (258, 259).

L'activation de ERK1/2 entraîne aussi l'expression de protéines de la famille Sprouty (Spry) (260). Cette famille composée de quatre membres inhibe l'activation de la voie MAP Kinase à plusieurs niveaux (228). Parmi les mécanismes suggérés, lorsque phosphorylés sur les tyrosines 53 et 55, Spry1 et Spry2 compétitionnent pour un site de liaison aux RTKs avec la protéine adaptatrice Grb2, inhibant le recrutement de SOS et l'activation subséquente de la voie (261). D'autres groupes suggèrent de plus que ces protéines peuvent interagir directement avec Raf, bloquant son activité catalytique et bloquant la transmission du signal à la voie (262, 263).

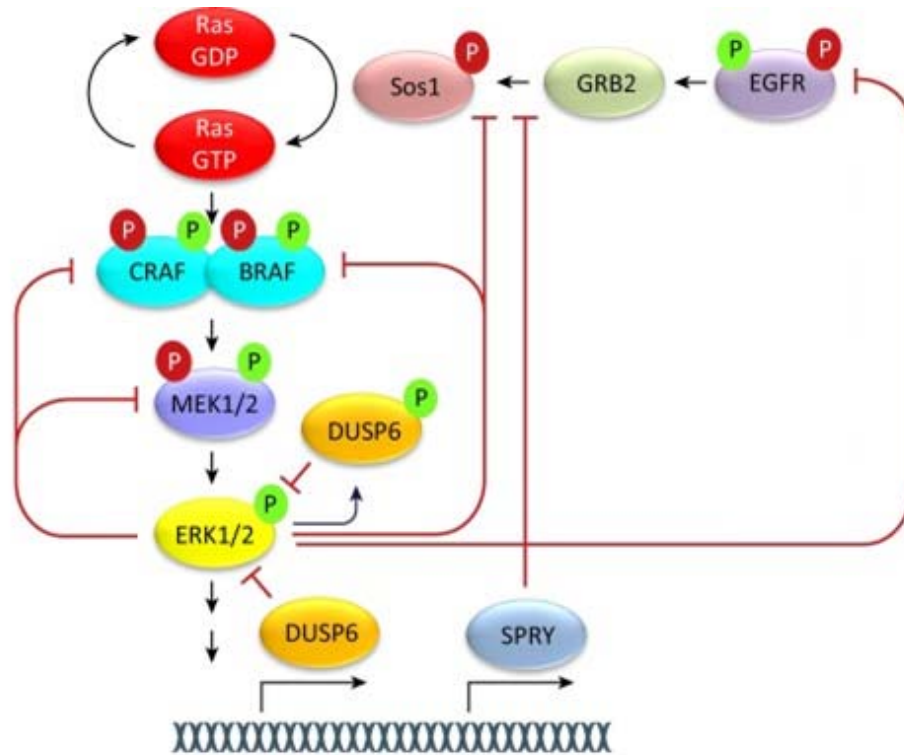


Figure 1-5 **Résumé de plusieurs des boucles de rétro-inhibition de la voie MAP Kinase**
 Adapté de Ryan, M et al. (2015) (264)

1.3 Substrats de la voie Ras-MAP Kinase

1.3.1 Substrats de Raf

Les substrats les mieux documentés des kinases de la famille Raf sont sans aucun doute les MAPKK MEK1/2. Les trois isoformes de Raf (A-Raf, B-Raf et C-Raf) peuvent phosphoryler MEK1/2 en réponse à une activation de la voie, conduisant à la transmission du signal via la cascade des MAP Kinases. Les rôles liés à la phosphorylation de ces kinases sont complexes et multiples, et conséquemment seront vus en détail lorsque les substrats et fonctions de ERK1/2 seront abordés dans les prochaines sections.

De manière générale, bien que quelques autres substrats de C-Raf aient été suggérés et décrits, MEK1/2 restent les deux seuls substrats globalement reconnus et bien validés. Dans plusieurs cas, la preuve d'une phosphorylation par C-Raf présentée n'exclue pas l'effet d'une kinase en aval ou se base exclusivement sur des essais kinase *in vitro*. Parmi ces exemples de substrats alternatifs, il a notamment été proposé que C-Raf s'associe et phosphoryle plusieurs isoformes de l'adénylate cyclase (265, 266). Dans les cellules musculaires lisses du tractus respiratoire, cette phosphorylation cause une hypersensibilisation de l'adénylate cyclase afin de compenser un mécanisme d'inhibition dû à une stimulation prolongée des récepteurs aux protéines G (267, 268). Le rôle de cette phosphorylation dans un contexte de signalisation cellulaire reste cependant peu étudié, et le site de phosphorylation exact n'a pas été identifié à ce jour. Basé sur des travaux *in vitro*, un autre substrat suggéré pour C-Raf est la thréonine 206 de la troponine T cardiaque à son extrémité C-terminale (269). La phosphorylation de ce même résidu par la protéine kinase C (PKC) avait été observée précédemment, et inhibe de manière importante les fonctions de la protéine, notamment dans le maintien de la tension des fibres musculaires cardiaques et de son activité ATPase (270). Similairement, la myosine phosphatase MYPT a aussi été suggérée être un substrat direct de C-Raf dont la phosphorylation abroge la fonction (271). Ces résultats n'ont cependant pas été validés par des études subséquentes.

1.3.2 Substrats de MEK1/2

À l'instar de Raf, MEK1/2 ne possèdent que deux substrats connus et bien caractérisés à ce jour : les kinases ERK1 et ERK2. Outre ses rôles présumés dans l'export nucléaire de certaines protéines, les fonctions de MEK1/2 décrites se limitent majoritairement à son rôle catalytique vis-à-vis ERK1/2 et aux substrats phosphorylés par ces kinases en aval. Quelques substrats potentiels ont tout de même été caractérisés mais n'ont pas été validés par des études subséquentes et en conséquence ne sont pas reconnus de manière définitive à ce jour.

Le premier de ces substrats potentiels à être décrit est la glycogène synthase kinase-3 (GSK3), dont le rôle consiste notamment à phosphoryler la beta-caténine afin de cibler la protéine pour dégradation par le protéasome (272). Les auteurs identifient la tyrosine 216 (279 chez l'isoforme alpha) comme site de phosphorylation pour les deux isoformes de GSK3 (GSK3 α et GSK3 β), et suggèrent que cette phosphorylation par MEK1 induit une accumulation de GSK3 au noyau. Cette étude a toutefois plusieurs limitations, dont l'utilisation d'un anticorps spécifique à la Y216 comme unique méthode pour démontrer l'existence de la phosphorylation de ce site. De plus, le groupe de Philip Cohen a démontré presque simultanément que GSK3 est capable d'autophosphorylation sur ce même site (273). Plusieurs groupes ont aussi observé qu'une stimulation oncogénique de la voie MAP Kinase est suffisante pour promouvoir une activation de la voie canonique Wnt/beta-caténine, notamment via un mécanisme dépendant de la phosphorylation de LRP6 par ERK1/2 (274-276). Il est donc possible que l'utilisation d'un inhibiteur ciblant MEK1/2 puisse avoir un impact sur l'activité ou la localisation de GSK3 de manière indirecte. Finalement, il a été observé que la translocation de GSK3 au noyau peut survenir en réponse à des signaux de différenciation et dans certaines phases du cycle cellulaire, des processus qui sont en grande partie modulés par la voie Ras-MAP Kinase (277, 278). Ensemble, ces évidences laissent planer un doute important quant à l'exactitude de l'hypothèse voulant que MEK1 phosphoryle GSK3.

Un second substrat de MEK1/2, STAT5, fut proposé quelques années subséquentes (279). La Y694 de STAT5 semble phosphorylée par MEK1 en essai kinase *in vitro* et est aussi détectée *in vivo* à l'aide d'un anticorps phospho-spécifique commercial dans deux modèles cellulaires différents. Les auteurs démontrent aussi que la protéine co-immunoprécipite avec la kinase et que la mutation du site de phosphorylation inhibe la capacité de STAT5 à lier l'ADN. Cette étude est beaucoup plus robuste que celle portant sur GSK3 et présente de multiples évidences que MEK1/2 possède effectivement des substrats alternatifs. Il serait intéressant de valider la reproductibilité de ces résultats, ainsi que de comparer la stœchiométrie de phosphorylation de STAT5 en comparaison au substrat naturel de MEK1/2, les MAP Kinases ERK1/2. Similairement, le facteur régulateur myogénique MyoD est un

autre substrat potentiel de MEK1/2 à être décrit en 2011 (280). Similairement à STAT5, cette étude rigoureuse démontre une activité kinase *in vitro* et *in vivo* de MEK1/2 vis-à-vis le facteur de transcription sur la Y156. L'utilisation d'une forme recombinante active de MEK1 produite en bactérie renforce l'hypothèse que cette phosphorylation n'est pas l'œuvre d'une autre kinase ou d'un effet indirect.

Un article du groupe de Chengkai Dai publié dans le journal Cell en 2015 rapporte que le facteur de transcription HSF1 est phosphorylé à la fois par MEK1/2 et ERK1/2 mais sur des sites différents et à l'impact opposé (281). Cette étude se base principalement sur l'utilisation d'un anticorps commercial spécifique à la S326 phosphorylée pour démontrer une activité de MEK vis-à-vis HSF1. En opposition aux autres études précédentes, les auteurs suggèrent pour la première fois une activité kinase de MEK1/2 sur une sérine. Effectivement, les deux sites connus et caractérisés sur ERK1/2 sont une tyrosine et une thréonine, alors que les substrats alternatifs de MEK1/2 proposés dans les autres études suggèrent toutes la phosphorylation d'un résidu tyrosine. De plus, des expériences subséquentes effectuées par un laboratoire indépendant indiquent que ce résidu serait aussi une cible des kinases de la famille p38, semant le doute quant à une réelle phosphorylation par MEK1/2 (282). Notre groupe de recherche a aussi tenté de valider cette phosphorylation de HSF1 par MEK, en vain. Les résultats de ces essais ainsi que la discussion portant sur la validation adéquate de nouveaux substrats de MEK1/2 sera traitée à la section 5.4.1.

Finalement, une récente étude identifie la protéine capable de lier l'ARN (RBP) TDP-43 comme nouvelle cible potentielle de MEK1/2 (283). Celle-ci est un membre de la famille hnRNP et possède de multiples fonctions dans la maturation ainsi que le transport de l'ARN, mais son rôle le mieux défini à ce jour est dans la régulation de l'épissage alternatif de près de 600 gènes (284). Les auteurs proposent que la phosphorylation de ce facteur par MEK1/2 survienne sur des résidus thréonine et tyrosine dont le motif est similaire à la séquence consensus reconnue chez ERK1/2, la boucle d'activation T-E-Y. La preuve de cette phosphorylation repose sur l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée des T153/Y155 de TDP-43 et l'utilisation judicieuse d'inhibiteurs afin de montrer que MEK1/2, et non ERK1/2, est responsable. Il est néanmoins important de préciser

qu'à l'exception de ERK1/2, aucun de ces substrats n'a été validé de manière rigoureuse par un tiers parti à ce jour.

1.3.3 Substrats de ERK1/2

La découverte des premiers substrats de ERK1/2 survient conjointement au clonage de ces kinases par le groupe de Mélanie H. Cobb. Deux protéines, MAP-2 et S6 kinase, sont phosphorylées en réponse à un traitement à l'insuline (4). Depuis, plus d'une centaine de substrats ont été caractérisés pour ces kinases et cette liste continue de s'allonger à ce jour. Les fonctions associées à la phosphorylation de ces effecteurs s'inscrivent dans un large spectre qui englobent la majorité des fonctions de la cellule. Un effort pour dénombrer et cataloguer ceux-ci a été effectué une première fois en 1995, puis mise à jour en 2006 (16, 17). Par ailleurs, depuis plus de 15 ans, des méthodes protéomiques à grande échelle ont été utilisées afin d'identifier de manière plus systématique les cibles moléculaires potentielles de ERK1/2 dans un contexte cellulaire donné (18, 285-288). En ce qui concerne ces cibles hypothétiques, une banque de donnée a été compilée par l'équipe de Nico Blüthgen et est depuis peu disponible pour consultation (19).

Facteurs de transcription

Une des plus grandes classes de substrats des MAP Kinases ERK1/2 est celle des facteurs de transcription. L'observation de la phosphorylation de certains d'entre eux remonte à presque aussi loin que l'identification des kinases elles-mêmes (289). Depuis, plusieurs dizaines se sont ajoutés à la longue liste de facteurs régulés par ces kinases.

Le facteur de transcription Elk1 est une des cibles de phosphorylation de ERK1/2 la mieux décrite (289, 290). Ce facteur appartient à la famille des ternary complex factor (TCF)

et est exprimé de manière constitutive dans la cellule, alors que son activation rapide dépend principalement de son état de phosphorylation plutôt que de son niveau d'expression. La phosphorylation de Elk1 par ERK1/2 dans son domaine d'activation C-terminal mène notamment à l'induction de gènes sous le contrôle d'éléments de réponse au sérum (289). Cette activation permet une réponse extrêmement rapide de l'ordre des quelques minutes à une stimulation au sérum afin d'induire l'expression de gènes immédiats-précoces (IEG) tels que c-Fos, EGR1 et c-Jun (291).

C-Fos et c-Jun sont par ailleurs aussi des substrats des MAP Kinases ERK1/2 (207, 292). Suite à son induction en réponse à une stimulation au sérum par Elk1, la phosphorylation de c-Fos sur la sérine 374 par ERK1/2 permet une stabilisation du facteur de transcription et la formation du complexe AP-1 de pair avec c-Jun. Ces protéines sont effectivement assez instables et sont dégradées rapidement en absence d'une stimulation soutenue de la voie MAP Kinase. Cette composante temporelle de la nécessité d'une activation soutenue de la voie MAP Kinase est ainsi l'un des mécanismes que possède la cellule pour déterminer si l'amplitude et la durée d'une stimulation sont suffisants pour transmettre le message à la cellule de proliférer (207). Les kinases de la famille RSK, dont l'activation dépend aussi d'une phosphorylation par ERK1/2, peuvent aussi phosphoryler c-Fos sur un site adjacent à celui identifié pour ERK1/2, la sérine 362, menant à une potentialisation du signal et à une stabilisation additionnelle de la protéine.

Notre groupe de recherche a notamment identifié et validé la phosphorylation de JunB par ERK1/2 (18). Cette protéine est homologue aux autres membres de la famille Jun, comprenant aussi c-Jun et JunD, qui peuvent toutes lier c-Fos et former le complexe AP-1 mais dont certaines fonctions diffèrent quant à leurs gènes cibles (293). JunB est cependant le membre le moins étudié des trois. Cette phosphorylation survient sur un résidu adjacent au domaine de liaison à l'ADN, la sérine 256, et augmente l'affinité de la protéine pour ses séquences d'ADN cibles lorsque dimérisée avec c-Fos pour former le complexe AP-1, notamment les éléments de réponse TPA et les éléments de réponse à l'AMPc. Il est intéressant de noter que ce résidu est conservé chez les deux autres membres de la famille Jun

et que la phosphorylation de celui-ci par ERK1/2 sur c-Jun et JunD est bien documentée (293-295).

Outre Elk1, de nombreux autres membres de la famille ETS ont aussi été documentés comme étant phosphorylés par ces kinases dans le passé. Dans une étude protéomique à grande échelle, S. Carlson et collègues ont identifié et validé le facteur ETV3 comme nouveau substrat de ERK1/2 sur près d'une dizaine de résidus (288). D'autres facteurs de la famille ETS dont ERM, ER81, ERF, ETS1/2 et YAN, pour n'en nommer que quelques-uns, sont phosphorylés par ERK1/2 à la fois *in vitro* et *in vivo* (296-300). Dans une majorité de cas, l'activité de la voie MAP Kinase induit une augmentation de l'expression des gènes cibles de ces facteurs de transcription, soit par augmentation de l'affinité à l'ADN de ceux-ci, par modification de leur localisation subcellulaire ou par recrutement de co-activateurs transcriptionnels (301-303).

La phosphorylation de certains de ces facteurs par ERK1/2 peut avoir des conséquences dans le développement du cancer. Plus récemment, le facteur de transcription de la famille ETS, ERG, a été identifié par un groupe de recherche comme substrat de ERK1/2 sur deux résidus distincts. Cette protéine n'est normalement pas exprimée dans les cellules épithéliales de la prostate, mais un réarrangement chromosomique induit l'expression d'une protéine de fusion TMPRSS2-ERG dans près de la moitié des cas de cancers de la prostate. Hormis son expression, l'activité de cette protéine nécessite l'activité de la voie MAP Kinase afin d'induire l'expression de ses gènes cibles notamment liés à la migration et à l'invasion. Les auteurs de ces études ont identifié ainsi dans un premier temps la sérine 215 comme site de phosphorylation par ERK1/2 de ERG (304). Ceci induit un changement de conformation qui permet ensuite la phosphorylation d'un second résidu par ERK1/2, la sérine 96, dont l'effet induit une dissociation des composantes du Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) et, finalement, l'expression de gènes cibles de ERG (305). Dans ce contexte, une activité soutenue de la voie MAP Kinase couplée à l'expression aberrante de ce facteur de transcription contribue dans ce modèle à la prolifération de ces cellules transformées.

L'activité de la voie de signalisation MAP Kinase vis-à-vis certains facteurs de transcription implique aussi cette voie dans beaucoup d'autres fonctions que la croissance et la prolifération. Ceci est notamment le cas pour la phosphorylation du suppresseur de tumeur p53 par ERK1/2 (306). Dans cette étude, le mécanisme proposé est la phosphorylation de la thréonine 55 suivant un traitement à la doxorubicine, ce qui induit l'activation de p53 dans un modèle cellulaire de cancer du sein. Ceci se traduit par une diminution de l'expression du facteur anti apoptotique Bcl-2 et à l'induction de l'apoptose. Un effet similaire a été observé dans un modèle de fibroblastes résistant au cisplatine, où le traitement au TNF α induit l'apoptose dans un mécanisme dépendant de l'activité de la voie MAP Kinase ainsi que de p53 (307). Ces travaux n'ont cependant pas été confirmés dans des études subséquentes.

Un autre exemple intéressant est la phosphorylation du facteur de transcription FOXO3a par ERK1/2 (308). Ce facteur est un suppresseur de tumeur dont l'activité régule positivement l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, dont Bim, et conséquemment son inhibition est associée à la progression tumorale (309). Les mécanismes de dégradation de cette protéine n'étaient pas connus auparavant. Dans une étude publiée en 2008, les auteurs identifient une ubiquitine-ligase responsable de sa dégradation, MDM2, et montrent que la phosphorylation de trois résidus du facteur augmente l'affinité de la protéine pour celle-ci menant à son ubiquitination subséquente et sa dégradation par le protéasome (308). Ce mécanisme s'ajoute ainsi à une imposante liste de fonctions de ERK1/2 liés à la progression tumorale.

Kinases et phosphatases

De nombreuses kinases faisant parties du groupe des MAPKAPK (MK) peuvent aussi être activées suivant une phosphorylation par ERK1/2. Parmi celles-ci, la phosphorylation des membres de la famille RSK est un exemple classique et bien documenté. RSK1 et RSK2

peuvent ainsi être phosphorylés par ERK1/2 sur la sérine 363 ainsi que la thréonine 573, cette dernière thréonine faisant partie de la boucle d'activation et mène à leur activation subséquente (310, 311). Ces kinases peuvent ensuite phosphoryler à leur tour une panoplie de substrats dont des facteurs de transcription tels que c-Fos et CREB, des kinases, des phosphatases, la protéine adaptatrice SOS1, ainsi que le substrat notoire des RSKs, la protéine ribosomale S6 (2, 312).

La phosphorylation de ces kinases par ERK1/2 élargit considérablement le spectre de fonctions lié à une activité MAP Kinase. Ceci permet notamment le contrôle de la traduction des protéines via la phosphorylation par RSK1/2 de la protéine ribosomale S6, de la kinase du facteur d'élongation 2 (eIF2K), ainsi que du facteur d'initiation de la traduction eIF4B (313-315). Dans un mécanisme faisant la promotion de la survie cellulaire, RSK1/2 ont aussi pour cible la protéine pro-apoptotique Bad, dont la phosphorylation de la sérine 112 induit la création d'un site de liaison à 14-3-3 menant à l'inactivation de la protéine. Similairement, RSK1/2 phosphoryle la kinase pro-apoptotique DAPK sur la sérine 289, menant à son inactivation et à la promotion de la survie cellulaire (316). Des mécanismes d'interaction avec d'autres voies de signalisation ont aussi été décrits pour RSK1/2, dont la phosphorylation de la protéine inhibitrice IκB (317). Ceci induit la dégradation de cette dernière et une activation de la voie Nf-κB. De plus, à la fois ERK1/2 et RSK1/2 peuvent aussi phosphoryler des composantes du complexe mTORC1 sur de multiples sites afin d'induire l'activation de cette voie, notamment l'inhibiteur TSC2 et Raptor (312, 318, 319).

Les MNKs et MSKs sont deux autres familles de kinases dont la phosphorylation par ERK1/2 permet l'activation, et qui étend la gamme de fonctions associée à la stimulation de cette voie de signalisation. Le rôle le mieux décrit à l'activité des MNKs est sans aucun doute le contrôle de la synthèse des protéines, via la phosphorylation des facteurs d'initiation du complexe eIF4F (2). MNK1/2 sont les principales kinases impliquées dans la phosphorylation de la sous-unité eIF4E de ce complexe, les deux autres membres étant eIF4A et eIF4G. MNK1/2 peuvent aussi se lier à eIF4G, mais la phosphorylation de cette dernière n'a jamais

été démontrée hors de tout doute (320, 321). Finalement, les kinases de la famille MSKs sont aussi activées en réponse à une stimulation de la voie MAP Kinase et leur activité possèdent des fonctions clés dans le remodelage de la chromatine (322). D'une part, MSK1/2 phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3, conduisant à une relaxation de la chromatine dans une zone locale où la transcription des gènes est ensuite accélérée (323). Un des mécanismes suggérés est la création d'un site de liaison à 14-3-3, empêchant la liaison du répresseur transcriptionnel HP1 (324). D'autre part, MSK1/2 phosphoryle aussi la protéine chromosomale HMGN1 et induit une diminution de son affinité pour la chromatine et une activation des gènes cibles à proximité (325).

Protéines du cytosquelette

Une autre classe bien documentée de substrats de ERK1/2 sont les protéines associées à la membrane et au cytosquelette. Les MAP Kinases contrôlent ainsi la morphologie cellulaire via la phosphorylation notamment de la paxilline, une protéine d'échafaudage se situant aux points d'adhésion focaux (326). Celle-ci sert de protéine adaptatrice pour une panoplie d'acteurs signalétiques à la membrane via ses domaines LIM, SH2 et SH3, dont les protéines tyrosine-kinase Fak et Src, qui relaient les signaux provenant notamment de la voie des intégrines (327). La phosphorylation de la paxilline par ERK1/2 sur la sérine 81 induit notamment une augmentation de la capacité de liaison à FAK, ce qui active cette dernière (326). Dans un modèle d'hépatocytes, ceci se traduit par une augmentation de l'adhésion de la cellule alors que l'inhibition pharmacologique de la voie MAP Kinase renverse ce phénotype (328).

La stathmine est un autre substrat classique de ERK1/2 impliqué dans le remodelage du cytosquelette, et plus spécifiquement dans la dépolymérisation des microtubules (329). La phosphorylation de cette protéine survient sur 4 résidus sérines sur la portion N-terminale et induit une diminution de l'affinité de celle-ci pour la tubuline (330). Un haut niveau de phosphorylation de la stathmine est nécessaire notamment lors de la mitose, où la création du

fuseau mitotique nécessite une diminution de l'activité de la protéine. Cette protéine est ensuite déphosphorylée afin d'empêcher le retour en mitose de la cellule jusqu'à ce que les conditions à la division soient à nouveau propice (331).

GTPases

Depuis peu, quelques GTPases ont aussi été décrites comme nouveaux substrats des MAP Kinases ERK1/2. Premièrement, le groupe de Zhixiang Wanga a identifié les GTPases de la famille Rho Rac1 et RhoA dans des études datant de 2013 et 2016, respectivement (332, 333). Dans un premier temps, la phosphorylation de Rac1 par ERK1/2 diminue son activité via, d'une part, une diminution de sa capacité d'interaction avec la phospholipase C et, d'autre part, en relocalisant la protéine au noyau où elle est isolée de la majorité de ses partenaires d'interaction. De manière inverse, la phosphorylation de RhoA par ERK1/2 induit une augmentation de son activité. Dans les deux cas, les auteurs indiquent que la liaison de ERK1/2 à ces protéines est possible grâce à l'existence d'un domaine D à l'extrémité C-terminale de celles-ci.

Il existe un troisième membre à cette famille, la GTPase Cdc42, dont le site correspondant à la sérine 88 chez RhoA est conservé. De plus, le site de phosphorylation identifié chez Rac1, la thréonine 108, n'est pas conservée pour RhoA mais l'est chez Cdc42. En conséquence, il serait pertinent d'évaluer si ces résidus peuvent aussi être phosphorylé par ERK1/2 et si une telle phosphorylation induit un effet similaire à ce qui a été observé pour les deux autres membres de cette famille.

Notre groupe a aussi identifié la GTPase TC21 ainsi que son homologue R-Ras comme substrats des MAP Kinases ERK1/2 (20). Ces deux protéines sont souvent surexprimées dans le cancer, et il a été démontré dans plusieurs modèles cellulaires que l'expression d'une forme constitutivement active de l'une d'elles est suffisante pour induire la transformation des

cellules (334-337). La phosphorylation d'une sérine dans le domaine C-terminal de ces protéines par ERK1/2 augmente le caractère oncogénique de ces GTPases, se traduisant notamment par une augmentation de la motilité cellulaire et de l'invasion. De plus, l'expression d'une forme phospho-mimétique de R-Ras ou TC21 pour le résidu cible dans un modèle de fibroblastes murin induit la formation de tumeurs suivant leur transplantation chez la souris, alors qu'une forme sauvage ou mutée en alanine ne provoque pas la formation de tumeurs (20). Un troisième membre de la famille R-Ras, M-Ras, existe mais ne possède pas le résidu phosphorylé chez les deux autres membres.

Régulateurs de l'épissage alternatif

Un groupe relativement nouveau de substrats de ERK1/2 sont les régulateurs de l'épissage alternatif. Effectivement, un nombre croissant d'effecteurs de ce processus ont été identifiés comme cibles de phosphorylation par les MAP Kinases. Le premier et seul substrat de cette catégorie à être mis en évidence dans la revue des substrats de ERK1/2 de Rony Seger est hnRNP K (338). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la phosphorylation de hnRNP K sur deux sérines permettent à la protéine de s'accumuler dans le cytoplasme et de réguler la traduction de certains ARNm possédant une séquence «élément de contrôle de la différenciation» (DICE) dans la région non-traduite en 3' (3' UTR). Malgré la fonction maintenant bien décrite de hnRNP K dans le contrôle de l'épissage, le rôle précis de cette phosphorylation par ERK1/2 sur ses fonctions d'épissage reste cependant encore inconnu.

L'année suivante, la phosphorylation de la protéine de liaison à l'ARN (RBP) Sam68 par ERK1/2 a été identifiée par le groupe de Harald König, et dont l'effet module l'épissage différentiel de l'exon v5 de la glycoprotéine CD44 (339). Des travaux subséquents sur cette cible suggèrent que la migration cellulaire d'une lignée de kératinocyte est modulée en réponse aux changements d'épissage causés par la phosphorylation de Sam68 par ERK1/2, suggérant que le rôle de la voie MAP Kinase dans la migration passe aussi par un mécanisme d'épissage alternatif (340). Outre CD44, il a aussi été démontré que la phosphorylation de

Sam68 cause un changement d'épissage faisant la promotion de l'isoforme oncogénique Cycline D1b du gène *CCND1* (341). De manière intéressante, un groupe a aussi suggéré que Sam68, encore une fois en réponse à une stimulation de la voie MAP Kinase, module les niveaux d'expression du facteur d'épissage et proto-oncogène SRSF1 via l'épissage alternatif d'une séquence menant à un NMD du transcrit primaire (342). Le mécanisme suggéré par ce groupe serait notamment important dans la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la progression tumorale. Considérant que Sam68 possède de nombreuses autres cibles ayant un rôle critique dans le cancer, notamment BCL-X, mTOR et S6K1, il devient pertinent d'évaluer la contribution de la voie MAP Kinase vis-à-vis l'épissage de ces transcrits primaires (343-345).

Un autre substrat de ERK1/2 impliqué dans l'épissage alternatif est le facteur d'épissage SPF45 (346). Cette étude propose que ERK1/2, mais aussi les MAP Kinases p38 et JNK, phosphorylent SPF45 mais sur des résidus alternatifs. À partir d'un essai d'épissage sur minigène, les auteurs démontrent que la phosphorylation du facteur d'épissage par ERK1/2 mène à une diminution de l'exclusion de l'exon 6 du récepteur de mort Fas. Dans une lignée cellulaire de carcinome ovarien, cette phosphorylation par ERK1/2 entraîne notamment une diminution de la prolifération et de l'adhésion cellulaire. Cette phosphorylation a été observée à la fois *in vivo* et *in vitro*.

Finalement, la protéine de liaison à l'ARN DAZAP1 a aussi été identifiée comme cible de phosphorylation par ERK1/2, menant à la dissociation de son partenaire DAZ (347). Le rôle fonctionnel de la phosphorylation de DAZAP1 sur l'épissage n'a cependant été étudié que huit ans plus tard, alors qu'il a été démontré que l'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération sont régulés et épissés par DAZAP1 (348). Ce groupe a aussi montré qu'une expression aberrante de DAZAP1 est suffisante pour induire des défauts importants dans la prolifération cellulaire.

Compte tenu de l'émergence de plusieurs facteurs d'épissages comme cibles de ERK1/2 ainsi que de l'importance croissante de ce processus dans la physiologie cellulaire, il devient critique de caractériser plus en détail le rôle des voies de signalisation dans le contrôle de l'épissage. Suite à l'identification de plusieurs autres cibles potentielles de cette catégorie dans notre étude phosphoprotéomique, nous avons décidé d'identifier de manière systématique d'autres effecteurs de l'épissage alternatif dont la fonction est régulée par ces kinases. Les efforts de notre groupe pour identifier, valider et comprendre la fonction de ces cibles sont présentés au chapitre 2.

Protéines de maturation de l'ARN

Outre les facteurs d'épissage, un autre nouveau substrat d'intérêt de ERK1/2 impliqué dans la maturation de l'ARN est l'endonucléase Dicer. Cette enzyme permet le clivage d'ARNs double brins ou pre-microARN afin de générer des fragments d'ARN de la classe des petits ARNs interférants (siRNA) et des microARNs, respectivement. Cette étape initie le processus d'interférence par ARN, où les produits générés par Dicer seront utilisés comme guides par le complexe multiprotéique « RNA-induced silencing complex » (RISC) afin de cliver et induire la dégradation d'un ARNm cible. Dans une étude publiée en 2014, la phosphorylation de Dicer sur les sérines 1705 et 1833 par ERK1/2 est nécessaire et suffisante pour induire la localisation nucléaire de l'enzyme et inhiber sa capacité à cliver de petits ARNs chez *C. elegans* (349). Bien que cette découverte ait été effectuée dans le cadre de la transition oocyte-à-embryon de cet organisme, les auteurs démontrent que celle-ci est conservée dans l'évolution jusqu'à l'homme et que ses effets sur la translocation nucléaire de Dicer s'y appliquent de la même manière.

L'implication de la voie MAP Kinase dans la régulation de ce processus avait déjà été mise en évidence par un autre groupe quelques années auparavant, qui ont identifié TRBP, une protéine régulatrice de Dicer, comme cible de ERK1/2 (350). En opposition à l'étude sur Dicer, celle-ci n'a pas permis l'identification de résidus de phosphorylation au sein de cette protéine, mais démontre pour la première fois un lien direct entre l'activité de la voie MAP

Kinase et la machinerie responsable de la production des microARNs. Similairement aux facteurs impliqués dans l'épissage alternatif, il ne fait aucun doute que les voies de signalisation en amont régulent ce processus en fonction du contexte cellulaire et ces découvertes ne semblent être que la pointe de l'iceberg.

1.4 Fonctions biologiques des MAP Kinase ERK1/2

1.4.1 Rôles dans l'expression des gènes

La base de la physiologie cellulaire repose sur sa capacité à reconnaître des stimuli extracellulaires et à moduler la réponse de manière adéquate, notamment sous forme de changements dans l'expression des gènes. L'activité de la voie MAP Kinase est un paradigme de cette capacité et de nombreux mécanismes de contrôles à ce processus sont aujourd'hui bien caractérisés (1).

1.4.1.1 Régulation des facteurs de transcription

De pair avec sa fonction dans le contrôle de la prolifération, la régulation de l'expression et de l'activité des facteurs de transcription fait partie des premiers mécanismes décrits pour les MAP Kinases (1). ERK1/2 est d'une part capable de phosphoryler certains facteurs de transcription afin d'induire leur activité nucléaire. Un exemple classique est la phosphorylation de Elk-1, qui conduit ce dernier à exprimer des gènes immédiats-précoces (IEG) tels que c-Jun et c-Fos (289). Un autre cas bien caractérisé est la phosphorylation de c-Fos, causant sa stabilisation et la formation du complexe AP-1 en partenariat avec c-Jun (351). De nombreux facteurs de transcription sont ainsi des substrats de ERK1/2 et peuvent voir leur activité transcriptionnelle modulée suivant leur phosphorylation, notamment les cibles décrites à la section précédente et y compris mais non limité à c-Myc, Sp1, STAT3, FOXM1c et ETS1/2 (16, 299, 352-355). Les MAP Kinases ERK1/2 peuvent aussi induire une activité

transcriptionnelle via la liaison directe de certains facteurs de transcription et permettre leur recrutement aux promoteurs de gènes cibles (356). Il a aussi été observé que ERK1/2 peuvent se lier directement à l'ADN via la reconnaissance d'une séquence spécifique G/GAAAG/C et agir à titre de répresseur transcriptionnel (357). De manière intéressante, l'équipe de Mélanie Cobb a démontré que la phosphorylation de ERK1/2 sur un résidu à proximité de sa boucle d'activation, la T188 (ERK2), module l'interaction avec cette séquence d'ADN et inhibe son activité kinase (358).

De manière plus indirecte, ERK1/2 phosphoryle aussi plusieurs activateurs co-transcriptionnels afin de moduler la transcription de gènes. Un exemple classique est la phosphorylation de CREB binding protein (CPB), ce qui induit l'expression de gènes cibles du facteur de transcription CREB (359). Similairement, les activateurs co-transcriptionnels AIB1, PBP et SRC1 ont aussi été identifiés comme substrats de ERK1/2 (360-362). Les kinases activées en aval de la voie peuvent aussi contribuer au rôle des MAP Kinases dans la régulation des gènes. Par exemple, certains membres de la famille RSK sont aptes à phosphoryler les facteurs de transcription SRF, ER81, C/EBP β et c-Fos afin de moduler leur activité (363-366). MSK1 possède quant à lui les facteurs ATF-1 et CREB comme substrats connus (367).

Il a été démontré depuis de nombreuses années que l'un des substrats de ERK1/2 est la sérine 5 du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (368). La fonction précise de cette phosphorylation reste toutefois encore inconnue à ce jour. Le groupe de Danny Reinberg a cependant suggéré un rôle important pour cette phosphorylation dans les cellules souches embryonnaires murines (369). Les MAP Kinases ERK1/2 peuvent effectivement accéder aux gènes cibles du Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) et, suivant phosphorylation de la sérine 5 du CTD de l'ARN polymérase II, induire un état « amorcé » de la polymérase au promoteur de gènes cibles liées au développement. L'inhibition de l'activité MAP Kinase dans ce modèle cellulaire supprime cet état amorcé et déplace l'équilibre vers l'expression de gènes liés à l'auto-renouvellement.

1.4.1.2 Rôles dans la traduction

Le rôle clé que joue la voie MAP Kinase dans le processus de traduction est en grande partie tributaire des MAPKAPKs des familles MNK et RSK activées suivant une phosphorylation par ERK1/2. Premièrement, MNK1 et MNK2 phosphorylent la sérine 209 de leur substrat le mieux caractérisé à ce jour, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (370). Le rôle exact de cette phosphorylation est cependant contesté. Une étude a démontré que la délétion des gènes MNK1/2 chez la souris ne présente pas de phénotype particulier, notamment au niveau de la vitesse de traduction des gènes (371). De plus, la mutation de ce résidu ne semble pas avoir un impact sur la fonction de eIF4E (372). Cependant, il a été rapporté que cette phosphorylation serait essentielle à l'export nucléaire de certains transcrits d'ARNm, dont celui de la cycline D et de HDM2 (373, 374). Ces résultats sont contestés puisque, à l'opposé, deux groupes ont suggéré que la phosphorylation de la sérine 209 diminuent l'affinité de eIF4E pour le transcrit primaire d'ARNm (375, 376).

L'autre famille de MAPKAPK ayant un rôle important dans le processus de traduction est la famille des RSK. RSK1 et RSK2 peuvent ainsi phosphoryler eIF4B sur la sérine 422, menant à une augmentation de son affinité pour eIF3 lors de l'initiation de la traduction (313). Ces kinases phosphorylent aussi la protéine ribosomale S6 (rpS6) de la sous-unité ribosomale 40S, modification post-traductionnelle qui favorise son recrutement à la coiffe en 5' du transcrit primaire (377). Un groupe a aussi rapporté que RSK1 peut phosphoryler la kinase du facteur d'élongation 2 (eIF2K) et facilite l'élongation de la traduction (314).

Cependant, le rôle le plus important d'une activité MAPK/RSK concerne l'induction de la signalisation mTORC1, essentielle à plusieurs étapes de la traduction. Premièrement, mTORC1 permet l'inhibition des protéines de la famille 4E-BP (378, 379). Les trois membres de cette famille sont des répresseurs traductionnels qui, à l'état quiescent, bloquent la formation du complexe macromoléculaire eIF4F à l'extrémité 5' du transcrit primaire

d'ARNm (380). La formation de ce complexe est dépendante de la liaison de eIF4G à eIF4E, qui compétitionne aussi avec les répresseurs 4E-BP (381). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 sur les thréonines 37 et 46 inhibe sa capacité de liaison à eIF4E et permet la formation du complexe d'initiation de la transcription (378). Outre sa fonction via les membres de la famille 4E-BP, mTORC1 joue aussi un rôle critique dans la régulation de la traduction via l'activation de la kinase S6K, qui peut d'une part phosphoryler rpS6 ainsi que eIF4B. Même si des études de perte de fonction suggèrent que la phosphorylation de rpS6 n'est pas absolument essentielle à l'initiation de la traduction de manière globale, un sous-ensemble d'ARNm contenant un tract d'oligo poly-pyrimidines en 5' (5' TOP) semble en bénéficier suivant l'activité de S6K (382-384). Quant à eIF4B, il a été rapporté que sa phosphorylation par S6K permet d'accélérer le déroulement de l'ARN par eIF4A et, en conséquence, l'initiation de la traduction (313, 385).

Un autre mode de contrôle de mTORC1 par la voie MAP Kinase repose sur l'inactivation des suppresseurs de tumeur TSC1 et TSC2. Ceux-ci sont en effet des régulateurs négatifs du complexe mTORC1, et la mutation de l'un ou l'autre de ces effecteurs mène à une prolifération cellulaire aberrante (386). Le groupe de Pier Pandolfini a cependant démontré que ERK1/2 phosphoryle TSC2 sur deux résidus, ce qui induit sa dissociation à TSC1 et lève l'inhibition de mTORC1 (318). De manière similaire, RSK1 est aussi capable d'inhiber TSC2 via la phosphorylation de deux autres résidus à la surface de la protéine (319).

1.4.1.3 Régulation post-transcriptionnelle

Outre la modulation de la transcription des gènes et de leur traduction, l'activité MAP Kinase influence le sort de l'ARNm de plusieurs manières. Un récent exemple est la phosphorylation par ERK1/2 de RAM, une protéine adaptatrice de l'enzyme RNA guanine-7 méthyltransférase (RNMT) responsable d'apposer la coiffe à l'extrémité 5' du transcrit primaire chez certains gènes impliqués dans l'auto-renouvellement (387, 388). Dans cette étude, la phosphorylation de RAM conduit à l'ubiquitination et à la dégradation de cette

dernière. Cette perte de l'activité de RAM induit la déstabilisation du transcrit primaire de gènes liés à l'auto-renouvellement et, ultimement, un changement de l'équilibre entre l'expression de ces gènes et ceux liés à la différenciation neuronale. Similairement, un groupe suggère l'implication de la voie MAP Kinase dans le processus de polyadénylation du transcrit primaire de la MMP-9, ce qui permet de le stabiliser (389).

Épissage alternatif

Suite à la transcription des gènes, le transcrit primaire d'ARNm subit plusieurs étapes de maturation dont l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5', l'ajout d'une séquence de polyadénylation en 3', la méthylation, pseudouridylation et thiolation de certains de ses nucléotides ainsi que l'excision des introns par épissage. La maturation de l'ARNm est essentielle à son transport du noyau vers le cytoplasme et permet l'élimination de séquences aberrantes via la dégradation de l'ARNm par le mécanisme de dégradation non-sens (NMD) (390, 391). L'épissage est le processus permettant l'excision de certaines séquences (introns) du transcrit d'ARNm et la ligation des exons. Alors que certaines séquences introniques sont systématiquement éliminées de l'ARN pré-messager, ce que l'on appelle l'épissage constitutif, une grande majorité des gènes sont épissés de manière alternative et permettent la génération de plusieurs transcrits à partir d'une même séquence. Ces séquences alternatives permettent la génération d'une vaste gamme d'isoformes dont l'expression varie en fonction du contexte cellulaire. On estime que près de 95% des gènes subissent un épissage alternatif chez l'homme (392).

Ce processus est effectué par un complexe macromoléculaire nommé le spliceosome, formé de cinq principales ribonucléoprotéines (snRNP) ainsi que de nombreuses protéines régulatrices (393). Celui-ci s'assemble à la surface du transcrit d'ARN pré-messager suivant la reconnaissance d'une séquence spécifique en amont de l'intron par la snRNP U1 (394). La séquence en aval de l'intron est quant à elle reconnue par la snRNP U2. Un trimère composé des trois ribonucléoprotéines U4, U5 et U6 vient ensuite se lier à U1 et U4 afin de former le

complexe B. La maturation du complexe se poursuit par l'éjection de U1 et U4, résultant en une forme nommée le complexe C qui est catalytiquement active. Le spliceosome procède ensuite à deux étapes de transestérification de part et d'autre de l'intron, la première permettant la coupure du transcrite d'ARN et la formation d'une boucle rapprochant les deux sites qui seront ligués, puis une seconde qui clive le deuxième site et ligue les deux extrémités des exons. L'étape finale consiste au relargage du spliceosome ainsi que de l'intron du transcrite d'ARNm. Un résumé du processus d'épissage est présenté à la figure 1-6.

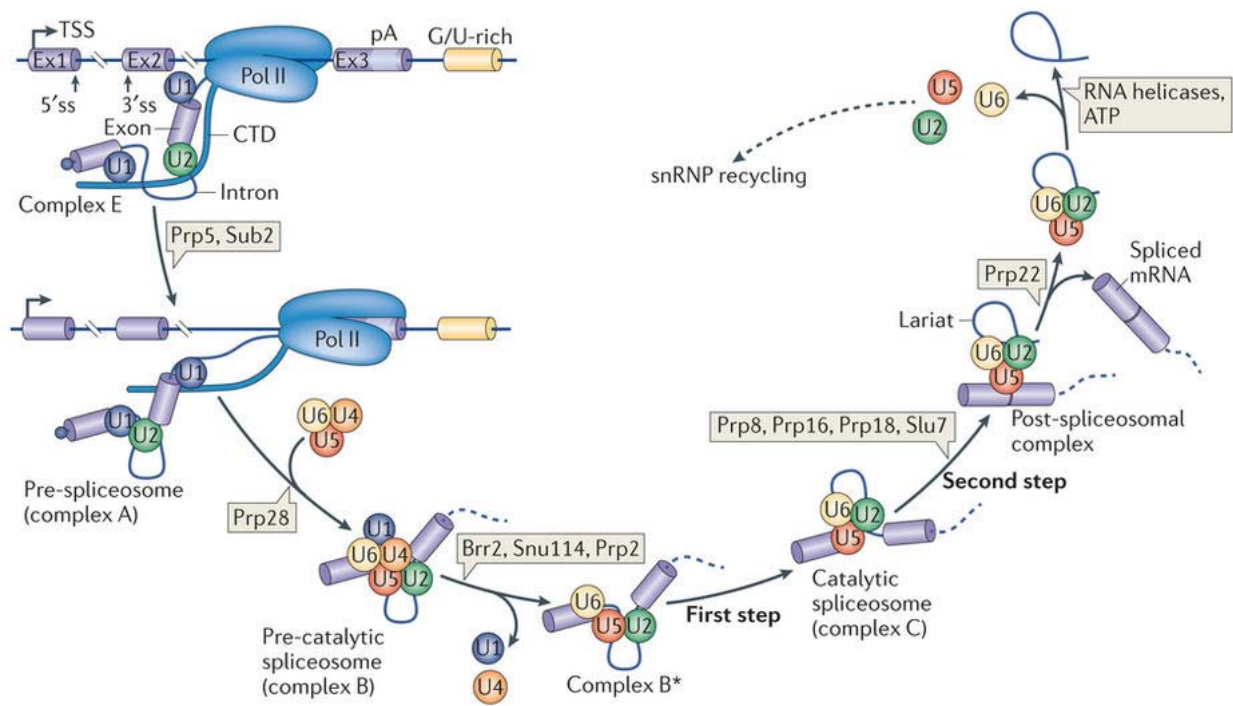


Figure 1-6 **Assemblage du spliceosome et excision de l'intron**

Adapté de Matera, A et al. (2014) (395)

De nombreuses protéines régulatrices sont aussi impliquées dans le processus d'épissage, tant pour permettre l'assemblage et la fonction normale du spliceosome que pour moduler la spécificité de celui-ci vis-à-vis une séquence donnée (Revue dans (396) et résumé à

la figure 1-7). Parmi celles-ci se retrouvent des hélicases de la famille DExD/H-box dont la fonction consiste notamment au réarrangement de la structure d'ARN et à l'appariement correct du spliceosome au transcrit tout au long du processus d'épissage (396-398). Il existe aussi plusieurs classes de protéines capables de lier l'ARN (RBP) qui régulent ce processus, que l'on regroupe sous le nom de facteurs d'épissage. Ces protéines reconnaissent de courtes séquences près des sites d'excision qui augmentent ou diminuent l'affinité du spliceosome pour un intron donné. Historiquement, deux grandes familles sont principalement impliquées dans ce processus; les protéines SR, caractérisées par un domaine de liaison à l'ARN riche en sérines et en arginines, et les ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNP) (399, 400). La liste complète des facteurs d'épissage dépasse largement le spectre de ces deux classes et continue de s'allonger encore à ce jour. Parmi ces autres facteurs d'épissage existent notamment les membres des familles RBFOX et MBNL, Sam68, NOVA, Quaking et les familles de kinases SRPK et CLK. On estime que plus de 170 RBP sont potentiellement impliquées dans la régulation de l'épissage via la reconnaissance de plus d'une centaine de séquences consensus d'ARN différentes (401, 402). Plusieurs facteurs d'épissages peuvent ainsi reconnaître une multitude de séquences au sein d'un même transcrit primaire d'ARNm, et la somme des interactions dicte le profil d'épissage qui sera observé. Une approche bio-informatique élégante et systématique pour identifier comment ces éléments s'intègrent afin de prédire un résultat d'épissage donné a notamment été énoncée par le groupe de Yoseph Barash sous forme de « code de l'épissage » (401, 403).

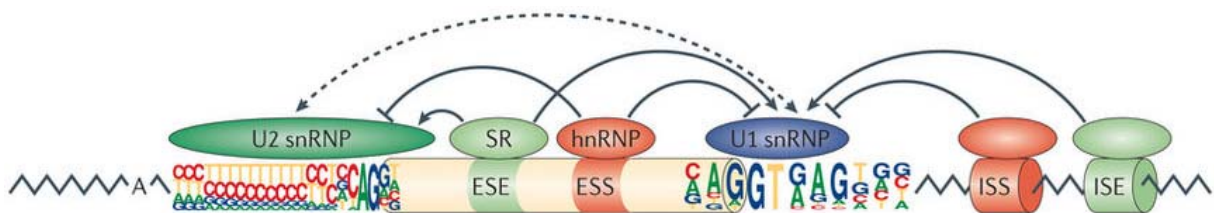


Figure 1-7 **Sélection du site d'épissage en fonction d'éléments de régulation**

Adapté de Matera, A et al. (2014)

La surexpression, l'inhibition ou la mutation de certains facteurs d'épissage a été observé dans de nombreuses maladies, dont le cancer (404-409). Effectivement, la somme des interactions à l'ARN provenant de différents facteurs d'épissage permet la génération d'un vaste spectre de profils d'épissage qui varie en fonction des différents types cellulaires ainsi qu'en réponse aux stimuli extracellulaires. Considérant que certaines isoformes issus du même gène possèdent des fonctions opposées, il n'est pas surprenant qu'un profil d'épissage aberrant entraîne de graves conséquences biologiques. Un exemple classique est l'épissage du produit du gène *BCL2L1*, où l'isoforme long Bcl-xL occupe une fonction cellulaire anti-apoptotique alors que l'isoforme court Bcl-xS induit l'apoptose (410). Une modulation dans la balance de ces deux isoformes est ainsi observée dans plusieurs types de cancers, où la forme anti-apoptotique se trouve exprimée de manière prédominante (411-413). Le cas de Bcl-X est complexe puisque plusieurs facteurs d'épissages sont impliqués dans cette balance, incluant mais non limité à Sam68, hnRNP A1, SRSF9 et hnRNP K (343, 414, 415).

L'importance de l'épissage alternatif dans le cancer n'est plus à démontrer, il a même été proposé qu'une régulation aberrante de ce processus soit intégré aux caractéristiques du cancer telles que décrites par Douglas Hanahan et Robert Weinberg (416-418). Un point d'intérêt devient ainsi la régulation des facteurs d'épissage en amont de ces changements. Par exemple, plusieurs études ont démontré que le facteur d'épissage SRSF1 semble être surexprimé dans plusieurs types de cancers et que de nombreux transcrits d'ARNm sont affectés par son activité (419-421). Similairement, Tra2- β 1 et SRSF3 sont deux autres facteurs dont l'expression est élevée dans le cancer (422-424). La régulation de ces facteurs dépasse cependant le simple niveau de leur expression, et des modifications post-traductionnelles peuvent influencer leur activité au même titre que ce qui est observé dans la majorité des voies de signalisation. Par exemple, la phosphorylation du domaine SR de SRSF1 par la kinase SRPK1, surexprimée dans certains cancers colorectaux, promeut l'inclusion de l'exon 3b dans le transcrit primaire de Rac1, générant une plus grande proportion de l'isoforme constitutivement active Rac1b (425, 426). Outre leur activité, la localisation intracellulaire de certains facteurs d'épissage est altérée suivant la phosphorylation de leur domaine SR par des kinases de la famille CLK ou SRPK (427, 428).

Contrôle de l'épissage alternatif par la voie MAP Kinase

À l'instar de tous les autres processus biologiques, le contrôle de l'épissage par ces facteurs dépend aussi de l'apport d'une signalisation intracellulaire. Considérant que plusieurs voies de signalisation, notamment celle des MAP Kinases, sont fortement activées dans le cancer, il va de soi que l'épissage alternatif risque d'être modulé de manière similaire par la signalisation en amont. Conséquemment, la compréhension du rôle des voies de signalisation dans le processus d'épissage alternatif a une importance capitale.

Plusieurs substrats directs des kinases ERK1/2 ayant un rôle dans le processus d'épissage ont été identifiés au cours des années. Ceux-ci ont par ailleurs été traités à la section 1.3.3, de pair avec les fonctions associées. De manière plus indirecte, l'induction de la voie MAP Kinase impacte la phosphorylation de protéines SR via activation de la voie PI3K/Akt. Akt possède en effet plusieurs substrats liés à l'épissage alternatif dont hnRNP L, SRSF1, SRSF5 et SRSF7 (429-432). Ces modifications post-traductionnelles causent notamment l'épissage différentiel de la caspase 9 et de la kinase PKC β II. L'équipe de Xiang-Dong Fu a aussi élucidé un rôle plus large d'Akt, et par extension d'une activation de la voie MAP Kinase, dans le contrôle de l'épissage via la phosphorylation de SRPK1 (433). Akt induit l'autophosphorylation de SRPK1 suivant une stimulation à l'EGF, ce qui mène à la translocation nucléaire de SRPK1 et d'une phosphorylation accrue du domaine SR de nombreux facteurs d'épissage. Le mécanisme exact, indépendant de son activité kinase, selon lequel Akt stimule SRPK2 à s'autophosphoryler reste cependant inconnu. Un autre groupe a décrit une phosphorylation directe de la T492 de SRPK2 par Akt sur un autre résidu non conforme au motif accepté de phosphorylation, hypothèse qui a par la suite été rejetée et donc la kinase reste encore à ce jour inconnue (434). Par ailleurs, ce résidu n'est pas plus conforme au motif de phosphorylation de ERK1/2. Bien que les changements exacts de patrons d'épissage causés par ce mécanisme ne sont pas caractérisés en profondeur à ce jour, la

surexpression de SRPK1 et l'activation d'Akt ont été observées dans plusieurs types de cancer (432, 435-437).

1.4.2 Contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire

Le rôle de ERK1/2 dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire est la fonction la plus ancienne et la mieux documentée de ces kinases (438). De manière générale, un cycle de division cellulaire se compose de quatre grandes étapes. La première est la phase G1, où la cellule accroît sa taille et prépare les constituants nécessaires à la duplication de son ADN. Il est important de noter que l'intégrité de l'ADN est critique à toutes les étapes du cycle cellulaire, et qu'un blocage du cycle peut survenir si un dommage à celui-ci est détecté. Ensuite vient la phase S, où la duplication de l'ADN survient, suivi de la phase G2 où les conditions nécessaires à la division sont vérifiées. Parmi ces conditions se retrouvent la taille adéquate de la cellule, la présence de suffisamment de nutriments extracellulaires ainsi qu'une forte signalisation intracellulaire pro-proliférative. La division de la cellule et la ségrégation égale du matériel génomique survient lors de la dernière phase, la mitose, qui elle-même est subdivisée en de multiples phases (439).

L'évolution vers chaque étape est soumise à une stricte régulation sous forme de points de contrôle, où l'activité de certaines composantes précises de la famille des cyclin-dépendent kinases (CDKs) ainsi que de leur sous-unité régulatrice cycline est indispensable à la progression. Une couche additionnelle de régulation existe sous forme d'inhibiteurs de CDKs qui empêchent ces dernières de se lier à leur partenaire cycline et en conséquence de phosphoryler leurs cibles moléculaires. De surcroît, l'activité des CDKs est aussi tributaire de leur niveau de phosphorylation bloquant leur activité catalytique ainsi que de la présence de phosphatases de la famille Cdc25 afin de déphosphoryler et activer les CDKs aux points de contrôle. Lors d'un dommage à l'ADN, un des mécanismes cellulaires permettant l'arrêt du cycle cellulaire correspond à la phosphorylation des phosphatases Cdc25 par les kinases

Chk1/2, entraînant son ubiquitination par le complexe SCF^{β-trcp} et sa dégradation subséquente par le protéasome (440). Le mécanisme le plus important dans l'arrêt du cycle cellulaire suivant un dommage à l'ADN est cependant médié par le facteur de transcription et suppresseur de tumeur p53, dont l'activité permet notamment l'expression de l'inhibiteur de CDK p21. En absence de stress cellulaire, Mdm2 s'associe à p53 et limite son activité transcriptionnelle via la liaison à son extrémité N-terminale (441). Mdm2 possède aussi une activité ubiquitine ligase vis-à-vis p53, ciblant cette dernière pour dégradation par le protéasome (442). Cependant, la présence d'un stress cellulaire cause une stabilisation et une accumulation de p53, qui induit en retour l'expression de p21 ainsi qu'une inhibition de l'expression de Cdc25c et cycline B (443, 444).

Cyclines et CDKs

Les cyclines sont des sous-unités régulatrices des kinases CDK. Elles sont spécifiques à chacune d'elles et confèrent la spécificité de substrat et de fonction aux CDKs. Près d'une trentaine de protéines contenant un domaine cycline existent et 21 CDKs ont été découvertes, mais dans plusieurs cas on ne retrouve encore aujourd'hui que peu de littérature concernant leurs fonctions (445). Les principales CDKs ayant un rôle bien caractérisé dans l'une ou l'autre des phases du cycle cellulaire sont CDK1, CDK2, CDK4 et CDK6. Le rôle de CDK3 est encore nébuleux à ce jour, mais quelques articles suggèrent que le complexe CDK3/Cycline C serait impliqué dans la sortie de la phase G0 dans un mécanisme dépendant de Rb (446). De plus, il a été observé que la phosphorylation de c-Jun par le complexe CDK3/cycline C aurait un rôle dans la transformation cellulaire (447). Plusieurs articles s'intéressent ainsi aujourd'hui au rôle oncogénique de ces deux partenaires. Plusieurs CDKs ont aussi des rôles qui ne sont pas reliés directement au contrôle du cycle cellulaire. Par exemple, CDK7, de pair avec l'unité régulatrice cycline H, agit de manière indirecte en phosphorylant d'autres CDKs impliquées dans le cycle cellulaire (448). De plus, l'un de ses premiers rôles décrit concerne la régulation de la transcription via la phosphorylation de la

queue C-terminale de l'ARN polymérase II. Cette fonction est dépendante de son association au complexe général transcriptionnel TFIIH (449).

La régulation transcriptionnelle est un thème récurrent pour un bon nombre de ces kinases. Outre CDK7, CDK8 et CDK9 peuvent aussi phosphoryler la sérine 5 de l'ARN polymérase II, mais à différentes étapes du processus de transcription (450, 451). Curieusement, différentes cyclines sont impliquées pour chacune d'entre-elles malgré une spécificité vis-à-vis le même résidu du même substrat. Conséquemment, ces CDKs ont des rôles dans l'initiation de la transcription de l'ARN, ainsi que dans la cinétique d'élongation du transcrit. Une autre CDK, CDK10, n'a qu'un seul rôle connu dans la phosphorylation du facteur de transcription ETS2, ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (452).

CDK12 et son paralogue CDK13 sont deux kinases qui phosphorylent la sérine 2 de la queue C-terminale de l'ARN polymérase II (453). Les premières études sur CDK12 suggèrent cependant un rôle important dans l'épissage alternatif. Effectivement, le facteur d'épissage SRSF1 a été identifié comme second substrat de phosphorylation par cette kinase (454). De plus, CDK12 possède un domaine riche en arginine et en sérine (RS) caractéristique aux facteurs d'épissage. La fonction de CDK12 dans l'épissage a cependant été négligée pendant de nombreuses années au profit de ses rôles dans la contrôle de la transcription, dans la maintenance de la stabilité génomique ainsi que dans le cancer (455-457). Une récente étude a cependant démontré que CDK12 régule l'épissage de DNAJB6, un activateur de la réponse au dommage à l'ADN (458). Le mécanisme proposé pour CDK12 serait dépendant de l'épissage alternatif du dernier exon (ALE). La première cycline à être associée à CDK12 est la cycline L, mais des études subséquentes ont démontré que son réel partenaire impliqué dans la phosphorylation de la CTD de l'ARN polymérase est plutôt la cycline K.

Les cyclines et CDKs les mieux caractérisés sont sans aucun doute celles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, notamment les cyclines A, B, D et E, ainsi que les kinases

CDK2, CDK4 et CDK6. Le rôle de la voie MAP Kinase dans l'expression et l'activité de ces acteurs seront vus à la prochaine section.

Rôle de ERK1/2 et des cyclines/CDK dans le cycle cellulaire

Très tôt, plusieurs groupes ont démontré que l'activation de la voie ERK1/2 suivant un traitement aux facteurs de croissance induit la phosphorylation de ces kinases et la prolifération cellulaire (459). L'inhibition de l'activité MAP Kinase, soit par utilisation d'un ARN antisens ou par expression d'un mutant dominant négatif, limite considérablement la croissance des fibroblastes après traitement aux facteurs de croissance, suggérant un rôle clé de ces kinases dans le processus (460). La phosphorylation de c-Elk par ERK1/2 suivant son activation mène à l'expression de gènes immédiats-précoces, dont c-Jun et c-Fos (289). Ces deux composantes forment le facteur de transcription AP-1 et induit l'expression de la cycline D1 et de c-Myc (351, 461-463). Par ailleurs, la phosphorylation de c-Fos par ERK1/2 conduit aussi à une augmentation de son activité transcriptionnelle, permettant de renforcer le signal (464, 465). Similairement, la phosphorylation de c-Myc par ERK1/2 sur la sérine 62 stabilise cette protéine, et contribue à l'expression soutenue de la cycline D1 (466). La régulation de l'expression et de l'activité des cyclines ainsi que de leurs kinases partenaires, les CDKs, joue un rôle critique dans le contrôle de la prolifération.

L'expression de la cycline D1 est essentielle à la progression du cycle cellulaire en phase G1 jusqu'à la phase S (467). En absence de stimuli extracellulaire pro-prolifératifs, la cellule stagne en phase G1 et peut éventuellement sortir du cycle cellulaire de façon permanente, la phase G0 (468). La cycline D se lie et régule l'activité de CDK4 et CDK6, qui permettent la progression en phase S via la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB) lorsque les conditions propices à la réplication de l'ADN sont atteintes (469, 470). Ceci est facilité, d'une part, par l'activité du complexe CDK2-Cycline E qui phosphoryle p27^{Kip1}, un inhibiteur de la cycline D, et entraîne sa dégradation subséquente, et d'autre part par l'activité ERK1/2 qui induit l'accumulation de la cycline D (471). Ceci permet aussi

l'accumulation de la cycline A ainsi que l'expression de facteurs de transcription de la famille E2F nécessaires à l'entrée en phase S (472). La cycline D est ensuite rapidement dégradée au début de la phase S, sans quoi la réplication de l'ADN est bloquée (473, 474).

L'activité de ERK1/2 permet aussi d'augmenter la synthèse de pyrimidines en préparation à cette phase via phosphorylation de la carbamoyl phosphate synthetase, ce qui potentialise son activité catalytique (475). La prolifération étant un processus demandant au niveau de la synthèse protéique, ce principe est aussi vrai pour la synthèse ribosomale où la phosphorylation du facteur de transcription UBF par ERK1/2 induit une augmentation de l'expression de ses cibles (476). Ce rôle s'étend aussi à la traduction des protéines où plusieurs composantes activées en aval de la voie MAP Kinase, notamment p70S6K/mTOR ainsi que des kinases de la famille MNK, accélèrent l'activité du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (319, 371, 477).

Le rôle de la voie MAP Kinase dans le cycle cellulaire est aussi critique à la transition G2/S (478). La phosphorylation du facteur de transcription FOXM1c par ERK1/2 induit notamment l'expression de la cycline B, composante essentielle de pair à la kinase CDK1 lors de l'entrée en mitose pour la dégradation de l'enveloppe nucléaire (355, 479, 480). Il semble que l'activité de ERK1/2 soit requise pendant la transition G2/M pour le déroulement normal de la mitose. Effectivement, il a été observé que l'utilisation d'un mutant dominant négatif de MEK1/2 ou d'un inhibiteur pharmacologique pendant cette transition cause des retards entre autres dans l'entrée en mitose ainsi qu'entre la métaphase et l'anaphase (478, 481, 482). Cependant, ce rôle est controversé et d'autres études suggèrent que l'activité ERK1/2 n'est pas régulée à ce stade.

1.4.3 Différenciation cellulaire

Les MAP Kinases ERK1/2 sont parmi les plus importants régulateurs de la différenciation, et ce rôle est maintenant bien documenté depuis plusieurs années (483-487). Ce processus est particulièrement critique dans le développement embryonnaire, où une seule cellule totipotente est apte à générer toute la gamme de cellules spécialisées d'un organisme entier. Ce type de cellule souche embryonnaire est caractérisé par une forte expression des facteurs de transcriptions NANOG, Oct-4 et SOX2, ainsi qu'à un faible niveau de méthylation du génome (488). L'expression de ces facteurs est par ailleurs soutenue en partie grâce à leur propre activité, potentialisant une signalisation d'auto-renouvellement jusqu'à ce qu'un débalancement conduise à l'inhibition de leur expression (489). Lors de la différenciation des cellules en l'un des trois types cellulaires du feuillet embryonnaire, l'expression de ces facteurs de transcription diminue de façon concomitante à l'augmentation de l'expression de gènes liés à l'auto-renouvellement. De plus, une modulation épigénétique massive du génome survient, bloquant notamment l'expression de gènes spécifiques à d'autres types cellulaires (490). Ces changements sont dépendants de l'engagement de la cellule vers un destin cellulaire prédéterminé par un état « amorcé » de la cellule. Ce terme est utilisé pour distinguer les deux phases du développement embryonnaire, alors que la cellule se prépare à se transformer de manière irréversible, en opposition à l'état basal souche où les gènes d'auto-renouvellement sont exprimés aux plus hauts niveaux.

DNMT1, DNMT3a et DNMT3b dans la différenciation

DNMT3a et DNMT3b sont les deux seules enzymes capables de méthylation *de novo* dans l'organisme, inhibant de manière permanente l'expression de gènes par empreinte génomique via la méthylation d'ilots CpG à proximité de leur séquences promotrices. Cette empreinte génomique est conservée lors de la duplication du génome par l'activité de DNMT1, qui copie le patron de méthylation établi par les deux enzymes *de novo*. Il a d'ailleurs été démontré que la perte de DNMT1 dans les cellules ES mène à une perte massive de la méthylation du génome (491). Naturellement, la délétion de l'un de ces trois gènes mène à la mort embryonnaire (492). Une démonstration puissante de la corrélation entre le faible

niveau de méthylation du génome et du caractère « souche » des cellules est la génération d'une lignée de cellules souches embryonnaire murines génétiquement déficiente en DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (493). La lignée triple KO générée par le groupe de Masaki Okano est viable et conserve un état souche basal caractérisé par une forte expression des gènes d'auto-renouvellement (493). Dans ce contexte, l'expression de ces méthyltransférases est essentielle au processus de différenciation normal de la cellule.

Plusieurs groupes ont cependant démontré que l'expression de la forme catalytiquement active de DNMT3b est absente dans une majorité de lignées cellulaires somatiques. DNMT3b possède effectivement une trentaine d'isoformes différents dont la portion catalytique est exempte pour certains d'entre eux (494). Il semble que l'expression massive de cette enzyme lors de la différenciation est transitoire, et que la forme épissée est l'isoforme prédominant dans un contexte physiologique normal du reste des cellules. L'hypothèse veut ainsi que la majorité des événements de méthylation survenant dans un type cellulaire différencié soient effectués par DNMT1 dans le but de maintenir les patrons existants (495). Un groupe s'intéressant au rôle de l'isoforme DNMT3b3 dont la portion catalytique est excisée propose que malgré l'absence d'une fonction catalytique, l'enzyme inactive peut toutefois toujours lier l'ADN et moduler la méthylation du génome via interaction allostérique avec son partenaire DNMT3b possédant la portion catalytique de l'enzyme (496). Ceci est corroboré par deux autres études dans lesquelles l'expression des isoformes catalytiquement inactifs de DNMT3b induit des changements dans le patron de méthylation dans un mécanisme dépendant d'une liaison allostérique à DNMT3a (497, 498).

Rôle de la voie MAP Kinase dans la différenciation

Parmi les études s'intéressant spécifiquement au rôle de ERK1/2, la différenciation en mégacaryocyte de lignées cellulaires K562 et UT-7 suivant un traitement avec un agent mitogène s'accompagne d'une forte activation de ERK1/2, qui semble nécessaire au processus de différenciation (499-501). Il a de plus été démontré qu'une activation soutenue de ERK1/2

est essentielle à ce mécanisme, puisqu'une induction transitoire de la voie relaie plutôt des signaux prolifératifs à la cellule (502). Ce rôle s'est ensuite élargi à la différenciation d'autres types cellulaires, dont le contexte spécifique à chacun dicte la mesure dans laquelle une activité de ERK1/2 est nécessaire pour proliférer ou induire la différenciation (503-506). Par exemple, un groupe a démontré que la localisation intracellulaire de ERK1/2 est critique dans la balance entre la prolifération ou la différenciation des myoblastes. Une accumulation nucléaire de ERK1/2 phosphorylé favorise la prolifération et la progression du cycle cellulaire, alors qu'une forte présence de ERK1/2 activé dans le cytoplasme est liée à la différenciation des cellules progénitrices musculaires (507).

Des études provenant de notre laboratoire ainsi que celui d'Austin Smith ont mis en évidence l'importance de ces MAP Kinases dans le développement embryonnaire normal de l'organisme (508, 509). Effectivement, des cellules souches embryonnaires murines obtenues à partir d'animaux génétiquement déficients en ERK2 peuvent proliférer et se diviser adéquatement, mais leur capacité à se différencier est largement tributaire de l'activation de la voie via une stimulation par le Fgf4. Il a été démontré que l'activité de la voie MAP Kinase dans un tel système contribue notamment à freiner l'expression de gènes liés à l'auto-renouvellement, dont OCT4 et NANOG, et à induire les cellules dans un état « amorcé » pour la différenciation (510). Ce rôle de ERK1/2 est accentué depuis la découverte qu'il est possible de maintenir des cellules souches embryonnaires de type sauvage dans un état perpétuel d'auto-renouvellement sans traitement aux cytokines via l'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/2, bloquant le signal de différenciation, en combinaison avec un inhibiteur de GSK3 (511). L'expression d'ERK1/2 est effectivement indispensable à l'état de différenciation « amorcé » d'une cellule souche embryonnaire.

En opposition à ses rôles dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire, les mécanismes d'induction de la différenciation par ERK1/2 restent relativement mal compris à ce jour. Dans les cellules leucémiques K562, un mécanisme dépendant de la phosphorylation de RSK1 et de l'activité de la voie NF- κ B a été suggéré (512). Certains groupes ont identifiés

des régulateurs clés au processus, notamment des facteurs de transcription et des facteurs d'épissage, qui semblent agir de manière précoce dans la différenciation des cellules souches (513-515). Il reste cependant à déterminer comment l'induction de l'activité MAP Kinase, essentielle à la sortie de l'auto-renouvellement, est responsable de ces événements. Les efforts de notre groupe afin de comprendre ces mécanismes seront présentés au chapitre trois.

1.5 L'oncogène Ras et la voie MAP Kinase dans le cancer

1.5.1 Rôles de la voie Ras-MAP Kinase dans le cancer

Les trois gènes Ras chez l'homme (NRas, KRas, HRas) forment ensemble le groupe de proto-oncogènes le plus fréquemment impliqué dans le cancer. Des mutations activatrices sont retrouvées dans près du tiers de toutes les tumeurs, et jusqu'à 95% de certains types de cancers tel que KRas dans le cancer du pancréas (516, 517). Conséquemment, la famille Ras est étudiée de manière exhaustive depuis plusieurs décennies et est ciblée à grande échelle par des réseaux de recherche multidisciplinaires dont la « RAS Initiative » de la « National Institutes of Health » (NIH).

Les oncogènes HRas et KRas ont été identifiés dans les années 1960 à partir de deux virus causant le cancer chez le rat. Les deux chercheurs à l'origine de ces découvertes, Jennifer Harvey et Werner Kirsten, donnèrent respectivement les noms Harvey Rat Sarcoma virus (HRas) et Kirsten Rat Sarcoma virus (KRas) (518, 519). Les trois gènes humains de Ras furent découverts simultanément par plusieurs groupes en 1982 dans de multiples tissus cancéreux. Ces chercheurs identifièrent une forme constitutivement active du gène homologue au virus observé dans les années 1960 dont, contrairement à la forme non-mutée, l'expression induit la transformation cellulaire (520-524). Cette forme constitutivement active est la résultante d'une mutation du codon 12 du gène menant à la substitution d'une glycine pour

une valine, et encore aujourd'hui est l'une des mutations les plus couramment observées pour ce gène.

L'activation de Ras survient lorsque le GDP ancré à la petite GTPase est échangé pour un GTP, notamment suite à l'action d'un facteur d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) tel que Son of Sevenless (SOS). Plusieurs effecteurs en aval ont une forte affinité pour cette forme de Ras lié au GTP et peuvent lier cette dernière. Outre l'activation de Raf ainsi que de la voie MAP Kinase, qui a été discuté à la section 1.2.2, les kinases de la famille PI3K sont aussi des effecteurs de Ras bien caractérisés, menant à l'induction de la voie de signalisation PI3K/Akt impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire (525). Une fois activée, PI3K peut convertir le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). La liaison du messenger cellulaire PIP3 au domaine PH de la kinase Akt induit l'activation de cette dernière, qui phosphoryle à son tour de nombreux effecteurs tels que mTOR et Bad (526, 527).

Un autre groupe d'effecteurs bien caractérisés de Ras est la famille des GEFs associés aux GTPases Ras-Like (Ral) (528). Similairement aux GEFs de Ras, ces GEFs peuvent induire l'échange du GDP lié à Ral pour un GTP, ce qui conduit à son activation. De nombreux effecteurs en aval de Ral existent et jouent des rôles notamment dans le processus d'endocytose de la cellule, dans la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que dans l'induction d'autres voies de signalisation telles que NF- κ B (529-531).

Bien que Ras soit reconnu pour être impliqué dans de multiples voies de signalisation, l'induction de la voie MAP Kinase classique demeure un élément crucial au développement de multiples cancers, notamment via la dérégulation de la prolifération, de l'apoptose et du cycle cellulaire. Ainsi, d'autres composantes de la voie Ras-MAP Kinase sont aussi impliquées dans la tumorigénèse, notamment des mutations activatrices de B-Raf et la surexpression de récepteurs tyrosine-kinase en amont de la voie (532).

EGFR overexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinomas (>50%)
ERBB2 overexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Breast (30%)
RAS mutation	<ul style="list-style-type: none"> • Pancreas (90%) • Thyroid (55%) • Colon (40%) • Seminoma (45%) • Lung (30%) • AML (30%) • Liver (30%) • Myelodysplastic syndrome (40%) • Kidney (10%) • Bladder (10%)
BRAF mutation	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma (66%) • Colon (12%)

Tableau I. Dysfonctions de la voie MAP Kinase dans le cancer

Adapté de Dhillon et al. (532)

Il est intéressant de remarquer que malgré la prévalence de mutations affectant B-Raf et Ras dans plusieurs cas de cancers, des mutations activatrices de MEK1/2 ou ERK1/2 sont plutôt rares. Dans le cas du cancer colorectal (CRC), près de 40% des tumeurs possèdent une mutation pour KRas et 12% pour B-Raf (533). À l'inverse, moins de 3% de tumeurs colorectales analysées possèdent une mutation activatrice de MEK1/2 et aucune mutation de ERK1/2 n'a été décrite à ce jour (534). Ceci est davantage complexifié par le fait que les mutations récurrentes de KRas et B-Raf sont mutuellement exclusives pour la vaste majorité des cas de CRC étudiés.

Des spécificités ont aussi été observées quant aux isoformes de ces protéines. Alors que NRas est muté dans près de 95% des cas de le mélanome de la peau, ce gène n'est

impliqué que dans moins de 5% des cas de CRC et aucune mutation de HRas n'a été décrite (535, 536). De manière générale, une mutation activatrice de HRas n'est observée que dans moins de 3% de tous les cancers, mais son importance n'en est pas moins diminuée dans le cas de cancers de la vessie et des carcinomes à cellules squameuses du cou et de la tête où des incidences de mutations pour HRas de 57% et 86% sont observées, respectivement (537-539). Curieusement, certains types de cancers que l'on classe dans la même catégorie n'ont pas les mêmes déterminants génétiques. Par exemple, le cancer du rectum démontre une prévalence d'une forme mutée de NRas dans 12% des cas, alors qu'il n'existe que dans 0.6% des cas répertoriés de cancer du côlon, malgré que ces deux maladies appartiennent à la grande classe des cancers colorectaux.

Ceci est vrai aussi pour les isoformes de Raf, où B-Raf est l'isoforme impliqué de façon majoritaire dans une majorité de cancers. À l'opposé, des mutations de C-Raf sont très rares et celles impliquant A-Raf au cancer sont virtuellement inexistantes (540). Les raisons derrière ces différences sont cependant plus cohérentes que celles concernant Ras. D'une part, des études ont démontré que la mutation unique de la V600 en acide glutamique dans B-Raf est suffisante pour induire une activation forte et persistante de la voie MAP Kinase, alors que la mutation d'un second résidu est nécessaire pour induire une activité similaire de A-Raf ou C-Raf (532). D'autre part, B-Raf est en mesure de phosphoryler et activer MEK1/2 de manière beaucoup plus puissante que ses homologues, en particulier en réponse à un stimuli oncogénique tel que l'expression d'une forme constitutivement active de Ras (541). En fait, C-Raf et A-Raf nécessitent l'apport d'une signalisation supplémentaire à celle de Ras, notamment via les tyrosine kinases de la famille Src, afin d'être complètement activées, alors que B-Raf peut agir rapidement dès qu'une activation de Ras en amont survient (542). De plus, des travaux ont démontré que B-Raf et C-Raf forment un hétérodimère dont l'activité est beaucoup plus importante que leurs homodimères ou via la forme monomérique. Ces études ont aussi révélé que la mutation activatrice de B-Raf permettait une forte trans activation de C-Raf mais pas l'opposé (543).

L'expression mutuellement exclusive d'une forme oncogénique de KRas ou de B-Raf dans le cancer colorectal suggère à la base que le mécanisme de tumorigenèse induit par la voie MAP Kinase via ces isoformes est redondant. La cellule tumorale ne posséderait donc pas un avantage sélectif à bénéficier d'une double mutation de ces deux gènes. Cependant, des observations quant à l'utilisation d'inhibiteurs de MEK1/2 indique que, contrairement à Raf, le pouvoir oncogénique de Ras agit sur un spectre de fonctions beaucoup plus large que la simple induction de la voie MAP Kinase (544). Effectivement, les cellules tumorales possédant une mutation B-Raf répondent de manière beaucoup prononcée à un traitement d'inhibiteurs de MEK1/2, alors que les cellules Ras-mutantes sont de manière générale plus résistantes. Ceci démontre une fois de plus l'importance de caractériser les interactions entre les différentes voies de signalisation.

1.5.2 Inhibiteurs de la voie MAP Kinase

Dû à son implication dans de multiples pathologies, dont le cancer, plusieurs inhibiteurs de la voie MAP Kinase ont été développés au cours des dernières années. La première molécule de cette catégorie à être approuvée pour utilisation dans le cancer est l'imatinib, commercialisé sous le nom Gleevec (545). Cette molécule inhibe de manière spécifique l'activité tyrosine-kinase de ABL, c-kit et PDGFR, empêchant notamment l'activation subséquente de la voie MAP Kinase mais aussi de voies alternatives telles que PI3K-Akt et JAK/STAT (546-549). L'immense succès commercial de cet inhibiteur, principalement lié à son utilisation chez les patients atteints de leucémie, galvanise le milieu de la recherche et permet le développement d'inhibiteurs de seconde génération tels que le gefitinib, l'erlotinib et le sunitinib spécifiques à plusieurs RTKs dont l'EGFR, le PDGFR et le VEGFR (550-553). D'autres molécules, dont le dasatinib, sont aussi spécifiques aux tyrosines kinases de la famille Src et agissent donc de surcroît par des voies alternatives à la signalisation MAP Kinase (554, 555).

Plusieurs inhibiteurs de Raf ont été développés depuis près d'une quinzaine d'années. Paradoxalement, en dépit d'une inhibition complète de l'activité kinase *in vitro*, ces molécules induisent la phosphorylation de MEK1/2 dans un modèle *in vivo* où B-Raf est de type sauvage (556). Le mécanisme exact expliquant la trans-activation de l'hétérodimère B-Raf/C-Raf lorsqu'un tel inhibiteur est utilisé est complexe et fait encore l'objet d'intenses recherches scientifiques, mais il a été observé que l'asymétrie des deux protomères fait en sorte que la liaison de la molécule au premier partenaire induit une activation allostérique du second (557). Une autre hypothèse concerne le blocage par liaison de ces inhibiteurs d'un site de phosphorylation inhibiteur à la surface de Raf, ce qui induit son activation paradoxale (558). Ces molécules sont cependant largement utilisées pour traiter les cancers possédant une mutation activatrice de B-Raf (B-Raf V600E/K). Une des raisons expliquant cette susceptibilité est que cette forme de B-Raf est pleinement active sous forme monomérique et n'est donc pas sensible aux mécanismes de trans-activation observés par le dimère B-Raf/C-Raf de type sauvage (559).

Contrairement aux autres inhibiteurs de la voie MAP Kinase, les inhibiteurs de MEK1/2 sont des inhibiteurs non-compétitifs de l'ATP. Ceux-ci sont donc hautement sélectifs et ont une grande efficacité *in vitro*, ce qui en fait des molécules intéressantes d'un point de vue clinique (560, 561). Parmi celles-ci, le CI-1040 (PD184352) est le premier inhibiteur de MEK1/2 à passer en essai clinique. Les efforts sur ce composé ont cependant cessé en phase II puisqu'une faible efficacité du traitement, de pair avec une faible biodisponibilité de la molécule, n'ont pas démontré d'effets significatifs chez les patients atteints de tumeurs au colon, au sein, au poumon et au pancréas (562). Le premier inhibiteur de MEK1/2 à être approuvé aux États-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) est le trametinib. Son utilisation est approuvée en 2013 pour le mélanome cutané métastatique possédant la mutation activatrice (V600E/K) de B-Raf (563, 564). Un second inhibiteur de MEK1/2, le Cobimetinib, a aussi été approuvé en 2015 pour utilisation dans les mélanomes où B-Raf possède la mutation activatrice. L'utilisation de ces molécules est contre-indiquée pour traiter les cas de cancers où une forme sauvage de B-Raf est exprimée, puisqu'une résistance au traitement et ultimement une réactivation de la voie MAP Kinase est observée (565). Effectivement,

l'inhibition complète de la voie MAP Kinase abolit une boucle de rétro inhibition où ERK1/2 phosphoryle B-Raf et C-Raf, diminuant leur affinité pour Ras ainsi que leur dimérisation. Cette boucle affecte aussi des composantes en amont de la voie tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase. À long terme, ceci mène à une réactivation importante du signal de la voie et même à l'induction du signal d'autres voies de signalisation, notamment la voie PI3K-Akt via les RTKs ou Ras (233, 525). Le mécanisme expliquant la susceptibilité des tumeurs B-Raf V600E/K à ces agents est liée à l'insensibilité des mécanismes de rétro inhibition médiés par ERK1/2 (566).

Quelques inhibiteurs de ERK1/2 sont présentement en essais cliniques (SCH900353, BVD523, GDC0994 et le CC-90003), mais aucun n'a été approuvé pour utilisation commerciale à ce jour (567). Considérant la similitude du domaine kinase de ERK1/2 à celui des kinases dépendantes des cyclines (CDK), l'inhibition spécifique de ces MAP Kinases est plus difficile à atteindre. Similairement aux autres inhibiteurs compétitifs de l'ATP de la voie, le précurseur du SCH900353, le SCH772984, induit presque systématiquement une résistance acquise des cellules tumorales à l'agent de moyen à long terme (568). La connaissance approfondie de ces mécanismes de rétro inhibition, d'interactions avec d'autres voies de signalisation ou de l'identification de nouveaux rôles liés à celles-ci est critique au développement de thérapies adéquates pour ces pathologies. L'utilisation conjointe de deux ou plusieurs inhibiteurs ciblant la voie à de multiples niveaux ou ciblant deux voies distinctes est d'ailleurs une avenue prometteuse dans le traitement de ces cancers (569-572).

1.5.3 Le cancer colorectal

1.5.2.1 Épidémiologie et bases génétiques de la maladie

Mondialement, le cancer colorectal (CRC) est le troisième cancer le plus diagnostiqué chez l'homme, après le cancer du poumon et de la prostate, et le deuxième chez la femme, derrière le cancer du sein (573). Au Canada, le taux de mortalité est le troisième en importance

parmi les cancers et emportera près de 10,000 personnes cette année seulement (574). Affectant principalement les individus âgés de 50 ans et plus, le développement de ce type de cancer est la résultante d'une accumulation de mutations génétiques à l'épithélium du rectum ou du colon, qui évolue graduellement en polypes adénomateux bénins, puis en carcinomes. Bien que certaines dispositions génétiques existent, notamment le syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale, l'incidence du cancer est sporadique et liée à l'âge, l'environnement et dans une certaine mesure à la préexistence de maladies inflammatoires chroniques (575).

Bert Vogelstein propose dès 1990 un modèle génétique en trois étapes de la progression du cancer colorectal qui encore aujourd'hui est considéré un prototype classique du développement de tumeurs solides (576). Ce modèle est illustré à la figure 1-8. La première étape est la mutation du suppresseur de tumeur Adenomatous Polyposis Coli (APC), suivi d'une mutation activatrice de l'oncogène KRas et finalement d'une lésion génétique entraînant la perte de fonction du suppresseur de tumeur p53. D'autres lésions génétiques affectant notamment la voie PI3K/Akt, c-Myc et Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC) surviennent également de manière récurrente. Dans environ 10% des cas, une mutation activatrice de B-Raf survient de manière mutuellement exclusive à celle affectant KRas.

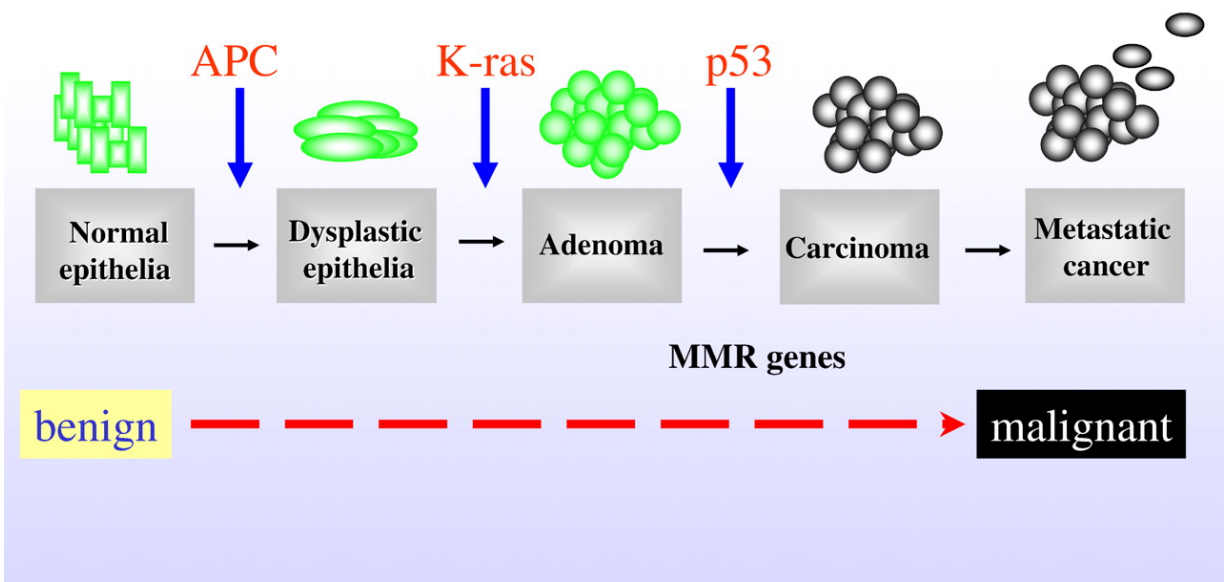


Figure 1-8 Le modèle en trois étapes du développement du cancer colorectal

Adapté de Smith, G et al. (577)

Outre le modèle génétique de son développement, certains traits moléculaires de la tumeur permettent de classer le cancer colorectal en quatre grandes catégories : le type à l'instabilité micro-satellitaire (MSI) immun, le type canonique, le type métabolique et le type mésenchymateux. Ces catégories tiennent compte de caractéristiques phénotypiques de la tumeur pendant son développement, tel qu'une perte de fonction des systèmes de réparation de l'ADN pour le type MSI, ou encore d'une activation marquée des voies Wnt/ β -caténine et myc pour le type canonique (578). Ces lésions créent un avantage sélectif pour la croissance tumorale ou pour le développement d'autres mutations.

1.5.2.2 La voie Wnt/beta-caténine

De pair avec la voie Ras-MAP Kinase, la signalisation Wnt/ β -caténine occupe un rôle crucial dans l'incidence du cancer colorectal. De cette voie, le suppresseur de tumeur APC est

en effet la protéine dont le gène est le plus fréquemment muté. Sa fonction consiste au contrôle des niveaux de beta-caténine cytoplasmique, en liant cette dernière et en recrutant les kinases responsables de la phosphorylation de son extrémité N-terminale. Effectivement, en absence de stimulation de cette voie de signalisation, un complexe multiprotéique formé de la caséine kinase 1, de GSK3, de l'axine et de l'APC lient la beta-caténine cytosolique et phosphoryle quatre résidus de son extrémité N-terminale (579). Cette séquence phosphorylée est reconnue par l'ubiquitine ligase TrCP1 (β -TrCP) qui ubiquitine la beta-caténine et marque cette dernière pour dégradation par le protéasome.

Origine

Les toutes premières études sur les composantes de cette voie ont lieu dans les années 1970 chez l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*, où une mutation chromosomique récessive induit des anomalies importantes dans le développement de l'organisme, notamment la perte de ses ailes (580). Le gène responsable de cet effet fut éventuellement nommé wingless (*wg*). En parallèle, dans les années 80, des chercheurs s'intéressent au gène *Int1*, originellement identifié à partir d'un virus oncogénique causant des tumeurs mammaires chez la souris (581). Le clonage et le séquençage de *Int1* permet aux scientifiques de remarquer qu'il s'agit de l'homologue du gène *wg* identifié chez la drosophile (582). On remarque alors que le produit de *Int-1*, auquel on s'intéresse d'abord pour son rôle de proto-oncogène, est sécrété et joue un rôle signalétique important aussi dans le développement normal des vertébrés (583). Le terme *Wnt*, un amalgame de *wg* et *Int1*, apparaît ainsi pour la première fois et servira de fondation pour cette famille qui compose aujourd'hui près de 20 membres (584, 585).

Similairement à *Wnt*, l'homologue de la beta-caténine humaine, Armadillo, fut identifié chez la drosophile dans les années 1980 sous forme d'un phénotype embryonnaire où le motif de segmentation des cellules postérieures est inversé en comparaison aux mouches normales (586, 587). Alors que la drosophile ne possède qu'un seul gène pour cette protéine,

on observe que le vertébré en possède trois : l'alpha, beta et gamma-caténine (588). Ces protéines s'associent aux jonctions cellule-cellule à la E-cadhérine et au squelette d'actine (589, 590). La gamma-caténine quant à elle se retrouve de manière prédominante dans la portion cytosolique des desmosomes. Quelques années plus tard, l'on remarque qu'une stimulation au ligand Wnt-1 stabilise un complexe formé de l'APC et de la beta-caténine, menant à sa stabilisation et son accumulation cellulaire, formant la base de la signalisation de cette nouvelle voie de signalisation (591, 592).

Activation et fonctions de la voie

L'activation typique de la voie s'effectue lorsqu'un ligand glycopeptidique de la famille Wnt s'associe à son récepteur membranaire Frizzled (Fzd), induisant son hétérodimérisation avec un récepteur de type « Low-density lipoprotein receptor Related Protein » (LRP). Ceci induit le recrutement de Disheveled (DSH) à l'interface du récepteur, qui à son tour recrute l'axine, ce qui libère les autres composantes du complexe de destruction de la beta-caténine et permet sa stabilisation ainsi que son accumulation cytosolique. La beta-caténine peut ensuite migrer au noyau et agir à titre de régulateur transcriptionnel, où sa liaison à des facteurs de transcription tels que ceux de la famille T-cell factor (TCF) et Lymphoid enhancer factor (LEF) induit la transcription de gènes cibles. La beta-caténine nucléaire peut aussi déplacer les inhibiteurs transcriptionnels de la famille Groucho/TLE afin d'activer la transcription de certains gènes (593). La voie canonique Wnt/ β -caténine a un rôle important dans le développement embryonnaire, la prolifération, la stabilité génomique, la différenciation et la spécification du destin cellulaire (594). Il est important de spécifier qu'un équilibre existe entre la portion libre cytosolique de beta-caténine et sa localisation aux jonctions adhérentes, où la liaison de la beta-caténine à la E-cadhérine et à l'alpha-caténine joue un rôle structural majeur au niveau du cytosquelette d'actine ainsi que dans la morphologie cellulaire (595). Le modèle d'activation de cette voie est résumé à la figure 1-9.

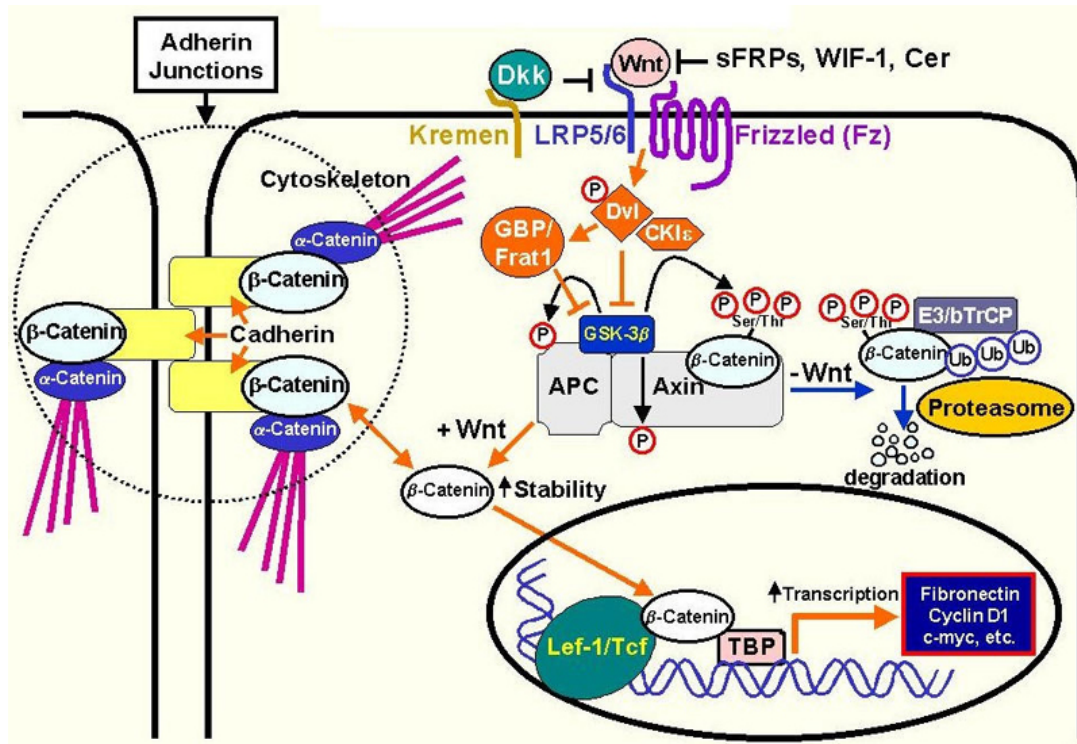


Figure 1-9 **Modèle d'activation de la voie Wnt/beta-caténine**

Adapté de Hoover B.A (2005) (596)

Des voies de signalisation Wnt indépendantes de l'activité de la beta-caténine existent, telles que la voie non-canonique de polarité planaire cellulaire (PCP) et la voie non-canonique Wnt/calcium. Ces voies sont beaucoup moins étudiées que la voie canonique, mais possèdent tout de même des rôles importants dans le développement, dans la polarité planaire cellulaire et dans le contrôle des niveaux intracellulaires de calcium (597, 598). Le mécanisme d'activation de ces voies de signalisation dépend de la liaison de DSH à certains récepteurs Fzd, qui diffèrent de ceux impliqués dans la voie canonique, et de l'activation via ses multiples domaines d'interactions avec des protéines signalétiques telles que DAAM1, la phosphodiesterase et la phospholipase C (599-601).

Dans le cancer colorectal, une mutation induisant une troncature de l'APC et sa perte de fonction est observé de manière fréquente (602). Le complexe de dégradation de la beta-

caténine est incapable de se former convenablement et une accumulation cytosolique constitutive de beta-caténine est observée. Outre l'APC, dans une faible proportion de cas, des mutations activatrices de beta-caténine peuvent aussi permettre sa stabilisation et une activité constitutive de la voie (592, 603).

La transcription de nombreux effecteurs survient suivant la stimulation de cette voie de signalisation et plusieurs ont des rôles clés dans la tumorigénèse. Parmi ceux-ci, l'oncogène c-Myc est l'une des premières cibles de la voie Wnt/ β -caténine à être caractérisée, son expression étant régulée par la liaison de Tcf-4 à son promoteur (604). D'autres rôles dans la prolifération, l'invasion et même l'immortalité cellulaire sont attribués à cette voie alors que la cycline D1, la métalloprotéase matricielle 7 et la télomérase, respectivement, sont identifiés comme cibles subséquentes (605-607). Un lien direct a aussi été observé entre l'activité de la voie Wnt canonique et le caractère « souche » d'une sous-population de cellules au sein de la tumeur (608). Effectivement, une augmentation de la signalisation Wnt/ β -caténine est corrélée à une augmentation des marqueurs de cellules souches et de manière générale à un pronostic défavorable (609, 610). Des observations similaires ont été faites dans de multiples autres cancers, notamment du poumon, du sein, des os, de l'estomac et du cerveau (611-616).

En marge de son rôle dans la voie canonique Wnt, la beta-caténine est aussi impliquée au niveau de la membrane dans l'adhésion cellules-cellules. La beta-caténine fait ainsi partie d'un complexe multiprotéique formant les jonctions adhérentes et s'associe au squelette d'actine de pair avec l'alpha-caténine et la E-cadhérine (617). Ce rôle est notamment perturbé dans le cancer, où la perte de fonction de l'une de ces composantes, le plus souvent la E-cadhérine, provoque une diminution de l'adhésion des cellules et une transformation du phénotype cellulaire épithélial vers une forme mésenchymateuse, mieux connue sous le nom de transition épithélio-mésenchymateuse. Cet état est la première étape d'une phase invasive de ces cellules transformées menant à la formation de métastases. Une fonction aberrante des facteurs de transcription de la famille Snail/Slug/Zeb, inhibiteurs de l'expression des cadhérines, accompagne souvent cet état et induit les cellules épithéliales vers un état dédifférencié (618-620).

Interaction entre les voies MAP Kinases et Wnt/ β -caténine

La tumorigénèse est accélérée de manière importante par la synergie qu'exerce certaines voies de signalisations via les interactions entre leurs membres. En surcroît du rôle de chacune de celles-ci individuellement, la compréhension de ces mécanismes d'interaction est essentielle afin de cibler efficacement les différentes avenues par lesquelles la résistance aux agents de chimiothérapie et la rechute vers la maladie survient. Par exemple, il a été démontré que la signalisation de la voie Wnt/beta-caténine régule l'expression de Yes-associated protein (YAP), une composante importante de la voie Hippo dont la surexpression est observée dans de nombreux cancers (621). Similairement, les voies de signalisations Wnt/ β -caténine et Ras/MAP Kinase sont deux voies cruciales impliquées dans le développement et la progression du cancer colorectal qui collaborent de multiples manières. Effectivement, plusieurs études basées sur des tissus de patients, d'animaux transgéniques ou chez la mouche suggèrent une résistance des tissus à la tumorigénèse induite par l'expression de K-Ras qui disparaît lorsqu'une mutation inactivatrice de l'APC est présente (622-626). Somme toute, l'inhibition combinée de ces deux voies semble être une avenue prometteuse dans le traitement du CRC (627, 628).

Plusieurs évidences supportent que la voie Wnt/beta-caténine active la voie Ras/MAP Kinase. Par exemple, un des gènes cibles de la voie canonique Wnt est le Transforming growth factor α (TGF α), qui est un ligand connu du récepteur à l'EGF et permet l'activation de la voie MAP Kinase (629). De plus, le récepteur au VEGF est aussi exprimé en réponse à l'activité nucléaire de la beta-caténine (630). Cette voie module aussi positivement l'expression et l'activité du récepteur à l'EGF de manière tant directe qu'indirecte (revue dans (631)). Plusieurs groupes ont aussi suggéré que GSK3 β , une composante du complexe de destruction de la beta-caténine, pouvait avoir un impact à plusieurs niveaux sur l'activité de la voie MAP Kinase, mais sans parvenir à un consensus si cet effet est positif ou négatif quant à la transmission globale du signal (632-634).

D'autre part, il a été démontré qu'une activation de la voie Ras-MAP Kinase était suffisante pour stabiliser la beta-caténine via phosphorylation de la sérine 552 par Akt (635, 636). Dans un modèle de cellules intestinales, la phosphorylation du récepteur LRP6 par ERK1/2 supporte l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (275). De plus, une équipe a révélé en 2012 que l'APC était un substrat de ERK1/2, qui phosphoryle ce dernier sur une dizaine de résidus de la queue C-terminale (637). La fonction exacte de cette phosphorylation dans le contexte d'une activation de la voie Wnt/beta-caténine n'a cependant pas été évaluée, les auteurs s'intéressant plutôt au rôle de l'APC dans la liaison de l'actine dans l'extension cellulaire. En dépit de résultats convaincants, cette étude reste peu citée à ce jour et n'a pas été reproduite par un autre groupe de recherche.

Alors que certains groupes proposent une synergie des deux voies, celle-ci est cependant disputée par certaines études qui proposent un rôle antagoniste des deux voies de signalisation vis-à-vis l'autre (638). Une activité forte et soutenue de la voie MAP Kinase, telle qu'induite par la mutation V600E de B-Raf, est suffisante pour inhiber la signalisation beta-caténine dans le mélanome de la peau (639). La présence mutuellement exclusive de mutations à H-Ras ou de la beta-caténine dans le cancer hépatique est une autre indication que ces voies agissent de manière redondantes dans certains contextes (640, 641). Le portrait de toutes les interactions entre ces deux voies de signalisation est cependant complexe et incomplet encore à ce jour (revue dans (642)).

1.6 Hypothèse de recherche et objectifs

Le rôle crucial que joue la voie MAP Kinase dans le développement normal ainsi que dans le cancer ne fait plus de doute aujourd'hui. Plus d'une centaine de substrats de ERK1/2 ont été identifiés et pourtant, de nombreux effecteurs de la voie continuent d'être caractérisés et impliquent les kinases de cette cascade à la régulation de nouveaux processus biologiques. Un portrait global des effecteurs directs de la voie n'a cependant pas été mis à jour depuis plus

d'une décennie, lorsque le groupe de Rony Seger a publié un compendium de plus d'une centaine de substrats de ERK1/2 (16). À l'ère des études protéomiques à grande échelle, un nombre considérable de potentielles nouvelles cibles ne sont pourtant observées que de manière qualitative et enfouies à travers la masse de données générées. L'importance de caractériser de manière robuste et individuelle les nouveaux effecteurs de la voie n'a pourtant d'égal que la capacité par des groupes indépendants de reproduire et valider ces données.

Outre les cibles déjà caractérisées, dans un effort pour identifier de manière systématique de nouveaux substrats de ERK1/2, notre groupe a effectué deux études phosphoprotéomiques à grande échelle (18). La première, publiée par notre groupe en 2013, fut effectuée dans la lignée cellulaire intestinale épithéliale de rat IEC-6, où l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 suivant une stimulation au sérum a permis d'identifier plus de 200 protéines candidates pour phosphorylation par ERK1/2. La seconde étude, non-publiée à ce jour, utilise des fibroblastes embryonnaires murin génétiquement déficients en ERK1/2 et soumise à une courte stimulation à l'EGF comme modèle afin d'identifier de nouveaux substrats de ERK1/2.

Bien que plusieurs substrats validés s'y retrouvent, conférant une robustesse à cette étude, une grande majorité des candidats potentiels identifiés par ces études ne sont pas connus à ce jour. De surcroît, plusieurs de ces protéines occupent des fonctions physiologiques critiques à la cellule ainsi que des rôles dont la relation à la voie de signalisation MAP Kinase sont peu documentés. Parmi ces effecteurs se retrouvent notamment plusieurs candidats possédant des rôles dans le contrôle de l'épissage alternatif. La protéine CDK12, qui possède à la fois des fonctions suggérées au niveau de la transcription et de l'épissage, a ainsi été identifiée comme candidat potentiel de phosphorylation par ERK1/2. Cette protéine pique l'attention pour plusieurs raisons. D'une part, une hausse de son expression est souvent observée dans le cancer, suggérant un rôle oncogénique en supplément de ses rôles physiologiques normaux. De plus, au sein de la famille des CDK, aucun membre n'a été identifié comme cible de phosphorylation par ERK1/2 à ce jour. Le premier objectif de cette

thèse consiste ainsi en la validation de nouvelles cibles de phosphorylation par ERK1/2 impliquées dans le processus d'épissage alternatif, et sera traité de manière approfondie au chapitre deux.

Dans les cellules souches embryonnaires murines (mESC), ces kinases jouent un rôle critique dans la sortie du programme d'auto-renouvellement et dans l'engagement vers une voie de différenciation. Bien que le réseau transcriptionnel gouvernant la pluripotence de ces cellules soit bien caractérisé, plusieurs autres processus moléculaires ayant des rôles clés dans la différenciation, tels que l'épissage alternatif, n'ont toujours pas été associés à une régulation par les voies de signalisation. Le contrôle de l'épissage par ERK1/2 est ainsi une hypothèse pouvant expliquer plusieurs événements précoces dans la sortie de l'auto-renouvellement et dans la différenciation. Nous avons ainsi analysé le transcriptome de deux clones de mESC génétiquement déficientes en ERK1/2 et réexprimant la kinase ERK1. Nous avons identifié 60 isoformes épissés de manière différentielle de façon consistante dans les deux clones, dont certains ont un rôle clé connu dans le processus de différenciation. Le deuxième objectif de cette thèse et thème du troisième chapitre consiste en la caractérisation de ces changements d'épissages en réponse à une stimulation de la voie MAP Kinase.

Une autre protéine candidate fort intéressante issue de l'étude phosphoprotéomique publiée en 2013 est la beta-caténine (18). De multiples interactions existent entre ces voies de signalisation et l'importance de les caractériser est exacerbée par l'implication conjointe de ces deux voies dans le cancer colorectal. Des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent cependant que la beta-caténine n'est pas une cible de ERK1/2 en essai de phosphorylation *in vitro*, contrairement à une majorité de candidats issus de ces études. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de MEK1/2 comme stratégie afin de mettre en évidence des cibles moléculaires de ERK1/2 repose sur le concept que MEK1/2 n'a que comme unique substrat les MAP Kinases ERK1/2. Considérant que l'existence de substrats alternatifs de MEK1/2 ont déjà été décrits, sans être confirmés ni infirmés, on ne peut pas exclure la possibilité que certaines de ces cibles puissent être phosphorylées par MEK1/2

plutôt que ERK1/2. En conséquence, nous avons évalué cette possibilité de manière robuste par essai kinase *in vitro* à l'aide de deux kinases MEK1 recombinantes actives, et observé dans les deux cas une forte phosphorylation de la beta-caténine par MEK. La caractérisation de la beta-caténine comme substrat potentiel de MEK1/2 est le dernier objectif de cette thèse, qui sera abordé au chapitre quatre.

Chapitre 2 Nouveaux substrats des MAP Kinases ERK1/2 impliqués dans l'épissage alternatif

2.1 Mise en contexte du projet

Afin d'identifier de manière systématique de nouveaux substrats de ERK1/2, notre groupe a effectué deux études phosphoprotéomiques à grande échelle. La première a été publiée par notre groupe en 2013 et fut effectuée dans la lignée cellulaire intestinale épithéliale de rat IEC-6, où l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 suivant une stimulation au sérum a permis d'identifier plus de 200 protéines phosphorylées de manière différentielle et candidates pour phosphorylation par ERK1/2 après application de critères de sélection. La seconde étude, non-publiée à ce jour, utilise un modèle de fibroblastes embryonnaires murin génétiquement déficients en ERK1/2, traité à l'EGF pour une période de 15 minutes afin d'identifier de nouveaux substrats de ERK1/2. Ces expériences ont été réalisées en grande partie par Christophe Frémin et Laure Voisin, en collaboration avec l'équipe du Dr. Pierre Thibault et la plateforme de protéomique de l'IRIC.

Bien que plusieurs substrats validés soient retrouvés dans ces études, la majorité des candidats potentiels identifiés ne sont pas connus à ce jour. Parmi ces effecteurs se retrouvent notamment des candidats possédant des rôles dans le contrôle de l'épissage alternatif tels que RNPS1, SRSF2 et CDK12. Nous souhaitons ainsi valider de manière systématique si certains de ces facteurs d'épissages, notamment ceux identifiés dans ces études mais aussi bien au-delà, sont des substrats *in vitro* des MAP Kinases ERK1/2. Une fois cette validation faite et que les substrats non-phosphorylés ont été discriminés, nous pourrons confirmer la phosphorylation par ERK1/2 *in vivo*, identifier les sites spécifiques de phosphorylation ainsi que l'impact de ceux-ci sur les fonctions de la protéine.

2.2 Matériel et méthodes

Plasmides

Le plasmide encodant le gène de rat de CDK12 a été donné généreusement par Ming-Ji Fann et décrit précédemment (454). Les plasmides pDONR223-SRPK1, pDONR223-SRPK2 et pDONR223-SRPK3 ont été donné généreusement par William Hahn et David Root (plasmides Addgene #23582, #23766, #23440). Les constructions pGEX-KG-SRPK1/2/3 ont été générées par le clonage de la séquence codant SRPK1/2/3 dans pGEX-KG en Sall-SacI. pGEX-RNPS1 a été donné généreusement par Vincent J Kidd, et a été décrit précédemment (643). Les plasmides encodant pEGFP-SRSF1, pEGFP-srm300 et tra2- β 1 proviennent de Adrian Krainer, Jeffrey Nickerson et Stefan Stamm, respectivement. Les plasmides pCDNA3-Flag-SRm160 et pCDNA3-SC35-cmyc-6his ont été donné généreusement par Phil Sharp et Kathleen Scotto, respectivement (plasmides Addgene #11305 et #44721).

Production de protéines recombinantes et essais kinase *in vitro*

Les protéines recombinantes possédant le tag GST des substrats candidats furent produites par induction à 50 mM d'IPTG dans E. coli pendant 18 heures à 25°C. Les cellules sont lysées à -80°C dans le tampon de lyse constitué de PBS 1X, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 1% triton ainsi que des inhibiteurs de protéases (Leupeptine, PMSF, pepstatine), puis soniquées pendant 3x 30 secondes. La purification des protéines recombinantes est effectuée sur billes glutathione-Sepharose (GE Healthcare) pendant 18 heures à 4°C, puis validée sur gel SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie.

Pour les essais kinase, de 5 à 10 μ g de protéines recombinantes ont été incubées dans le tampon kinase (20 mM Tris-HCl, pH. 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂) en présence d'ATP 50 μ M, 5 μ Ci [γ -³²P]ATP ainsi que 30 ng d'enzyme ERK1 recombinant actif (Millipore). La réaction a été effectuée sous agitation pendant 30 minutes à 30°C. Les produits

réactionnels ont été déposés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie et analysés par autoradiographie.

Cartographie phosphopeptidique bidimensionnelle

Le protocole de cartographie phosphopeptidique 2D a été décrit précédemment par le groupe de Tony Hunter (644). Un essai kinase est effectué tel que décrit précédemment, puis déposé sur gel SDS-PAGE. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF par transfert électrophorétique. La bande correspondant à la protéine d'intérêt est découpée puis soumise à digestion par 40 ug de trypsine TPCK pendant 18h à 37°C. Le produit est ensuite concentré par lyophilisation puis chargé sur une plaque de cellulose à couche mince. Une électrophorèse est effectuée à l'aide de l'appareil Hunter thin-layer peptide mapping system (HTLE-7000) à 1000V pendant 45 minutes. La plaque de cellulose est ensuite séchée, puis insérée dans une chambre de migration pour chromatographie sur couche mince dans la deuxième dimension pendant 12 heures. La plaque de cellulose est ensuite lue à l'appareil phosphoimager.

Spectrométrie de masse

Les expériences de spectrométries de masse ont été effectuées à la plateforme protéomique de l'IRIC par Eric Bonneil. Un essai kinase est réalisé tel que décrit ci-haut, en absence de [γ -³²P] ATP radioactif. L'échantillon à être analysé est déposé sur gel SDS-PAGE et coloré au bleu de Coomassie. La bande d'intérêt est découpée du gel puis digérée à la trypsine TPCK. Les échantillons sont ensuite analysés au spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) et analysés à l'aide du logiciel Scaffold (Proteome Software).

2.4 Résultats

2.4.1 RNPS1 est un substrat *in vitro* de ERK1/2

Le facteur d'épissage RNPS1 est l'un des candidats potentiels intéressants identifiés dans l'analyse phosphoprotéomique publiée par notre groupe en 2013 (18). Dans cette étude, suite à une stimulation au sérum de cellules IEC-6 en présence ou en absence de l'inhibiteur de MEK1/2 PD184352, on observe une augmentation du peptide phosphorylé de 2.6 fois après 15 minutes de stimulation, et 5.5 fois après 60 minutes en comparaison à la condition traitée à l'inhibiteur. Le peptide présente deux résidus phosphorylés : les sérines 155 et 157. Afin de valider cette observation, nous avons produit la protéine recombinante fusionnée à la GST en bactéries *E. coli* et purifiée celle-ci sur billes glutathione-Sépharose.

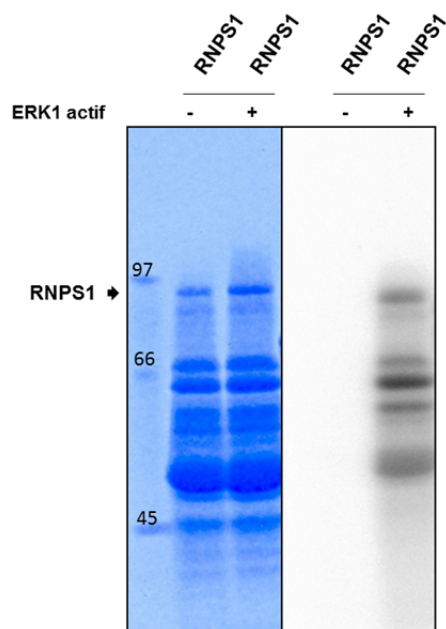


Figure 2-1 Phosphorylation *in vitro* de RNPS1 par ERK1/2

Essai kinase *in vitro* de la protéine du complexe exon-jonction (EJC) RNPS1 en présence de 50 μ M d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 recombinante active. La protéine recombinante est exposée par coloration du gel au bleu de Coomassie (gauche), et l'incorporation de radioactivité est détectée par autoradiographie (droite). Le marqueur de

poids moléculaire est exprimé en kilodalton (kDa). Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

Nous avons ensuite effectué un essai kinase *in vitro* en présence de la protéine recombinante RNPS1 ainsi que ERK1. La figure 2-1 montre l'apparition d'un signal de phosphorylation à la taille prédite pour la protéine fusionnée à la GST (64 kDa), ce qui suggère que RNPS1 serait effectivement phosphorylé par ERK1 recombinant actif.

Nous avons ensuite effectué un essai kinase *in vitro* non-radioactif afin d'analyser la phosphorylation de la protéine par spectrométrie de masse. Après phosphorylation *in vitro* du peptide par ERK1 recombinant actif, le mélange réactionnel fut déposé sur gel SDS-PAGE. La bande correspondant à la protéine recombinante est ensuite isolée du gel, digérée par la trypsine et soumise pour analyse en spectrométrie de masse. Cette analyse n'a cependant pas permis de valider la phosphorylation des sérines observées auparavant, ni d'observer de nouveaux résidus phosphorylés (Figure 2-2). La prochaine étape consiste ainsi à valider la perte du signal après mutagenèse dirigée des résidus S155 et S157.

```

MDLSGVKKKSLGKNNKKSSTRAPSPTRKDRSDEKSKDRSKDKGATKESSEKDRGRD
KTRKRRSASSGSSSTRSRSSSTSSSGSSTSTGSSSGSSSSASRRSGSSSTRSRSSSSSS
SGSPSPSRRRHDNRRRSRSKSKPPKRDEKERKRRSPSPKPTKVHIGRLTRNVTKDHIMEI
FSTYGKIKMIDMPVERMHPHLSKGYAYVEFENPDEAEKALKHMDGGQIDQEITATAVLA
PWPRPPRRFSPRRMLPPPMWRSPPRMRRRSRSPRRRSPVRRRSRSPGRRRHRSRSS
SNSSR

```

Figure 2-2 **Analyse protéomique de la phosphorylation *in vitro* de RNPS1 par ERK1/2**

La couverture de l'analyse MS est affichée en bleu, alors que les sérines identifiées dans l'étude phosphoprotéomique sont en rouge. Deux expériences indépendantes de spectrométrie de masse ont été réalisées.

2.4.2 SRPK2 est un substrat *in vitro* d'ERK1/2, mais pas SRPK1 et SRPK3.

Dans un effort pour identifier de manière plus systématique des régulateurs de l'épissage alternatif comme substrats de ERK1/2, nous nous sommes tournés vers les kinases des familles CLK et SRPK. Bien que les membres de ces familles n'aient pas été identifiés à priori dans nos analyses protéomiques à large échelle, celles-ci sont des candidats de choix en raison de la place centrale qu'elles occupent dans le contrôle de l'épissage via leur activité kinase. De plus, des articles ont déjà soulevé que la phosphorylation de ces acteurs, notamment à travers des voies de signalisations dépendantes d'une stimulation à l'EGF, est un mécanisme critique dans l'épissage alternatif (433).

Conséquemment, des constructions pGEX-KG encodant les ADNc des 4 membres de la famille CLK et des trois membres SRPK ont été générées. À l'instar de RNPS1, les protéines recombinantes fusionnées à la GST ont été produites en bactéries et purifiées en vue d'être soumises à un essai kinase *in vitro*. Il n'a cependant pas été possible de produire et purifier en quantité suffisante aucun des membres de la famille CLK. En revanche, les trois protéines recombinantes SRPK de taille complète ont été générées avec succès. La figure 2-3 montre ainsi les essais kinase *in vitro* des kinases SRPK1 et SRPK3 en présence d'ERK1 recombinant actif, qui suggère qu'aucune de ces deux kinases n'est phosphorylée par ERK1. L'essai fut aussi effectué sur SRPK2 WT à la figure 2-4 (A), où un signal de phosphorylation est détecté en absence de ERK1. Ceci suggère que SRPK2 WT produite en cellules procaryotes est catalytiquement active et capable d'autophosphorylation. En conséquence, un mutant KD (K110A) de SRPK2 fut généré afin d'analyser la phosphorylation par ERK1 sans interférence de son autophosphorylation (figure 2-4 (B)). En absence de ERK1, la totalité de l'activité catalytique de SRPK2 KD est effectivement abolie, mais un fort signal est détecté lorsque SRPK2 KD est incubé en présence de ERK1 actif, suggérant que SRPK2 est un substrat *in vitro* de ERK1/2.

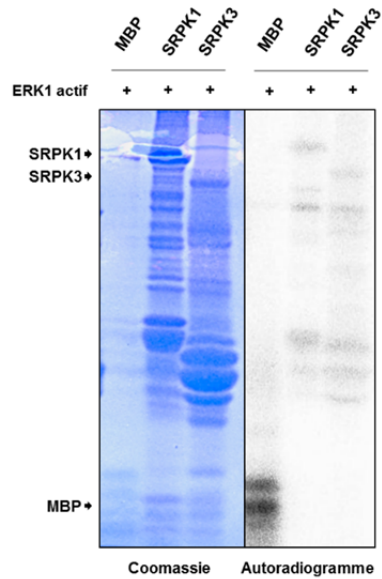


Figure 2-3 **Phosphorylation *in vitro* de SRPK1 et SRPK3 par ERK1/2**

Essai kinase *in vitro* de SRPK1 et SRPK3 en présence de 50 μ M d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 recombinante active. La protéine MBP a été utilisée comme contrôle positif afin de valider l'activité de l'enzyme ERK1. Cette expérience a été effectuée à deux reprises.

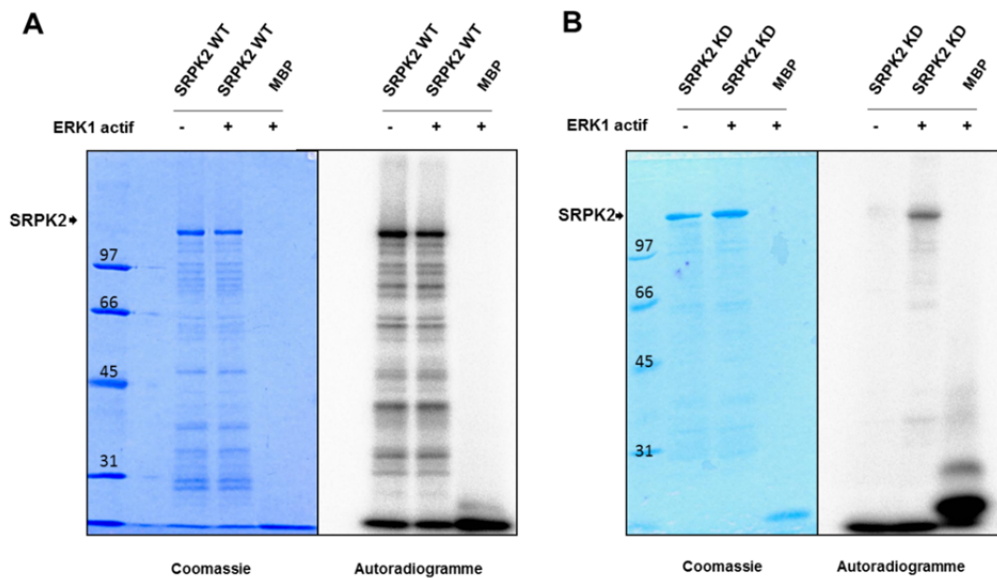


Figure 2-4 **Phosphorylation *in vitro* de SRPK2 par ERK1/2**

Essai kinase *in vitro* de SRPK2 WT (A) et SRPK2 KD (B) par ERK1/2 en présence de 50 μ M d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 recombinante active. La protéine MBP a été utilisée

comme contrôle positif afin de valider l'activité de l'enzyme ERK1. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

SRPK2 possède cinq sites S/T-P, motif minimal consensus de phosphorylation par ERK1/2. De ces cinq sites, aucun ne correspond au plein motif consensus qui inclue une proline en position -2. Des expériences supplémentaires de mutagenèse dirigée ou de spectrométrie de masse seront requises afin d'identifier le site de cette phosphorylation *in vitro*. De plus, similairement à RNPS1, des constructions eucaryotes de ces protéines serviront à démontrer que ces sites de phosphorylation existent *in vivo* chez la cellule en réponse à une stimulation de la voie MAP Kinase.

2.4.3 ERK1/2 phosphoryle CDK12 sur plusieurs résidus

Nous avons retrouvé la kinase CDK12 dans les deux études phosphoprotéomiques (18). D'une part, dans l'étude basée sur les fibroblastes murin déficients en ERK1/2, la phosphorylation de la sérine 1079 est de 4,66 fois supérieure suivant stimulation au sérum dans les cellules de type sauvage en comparaison à la condition DKO. Ce site a aussi été observé dans la seconde étude protéomique, mais ne bouge pas de manière significative en réaction à un traitement à l'inhibiteur de MEK1/2 PD184352. La sérine 1079 est conservée chez l'homme, et sa phosphorylation a été observée dans plus d'une cinquantaine d'études protéomiques dans la banque de donnée Phosphosite. Nous avons ainsi décidé de tester la phosphorylation de CDK12 par essai kinase *in vitro*.

Nous avons cloné l'ADNc du gène de rat de CDK12 dans le vecteur d'expression procaryote pGEX-KG. Étant donné la taille importante de la protéine, la production de la protéine recombinante complète fut impossible à réaliser. Conséquemment, nous avons fragmenté le gène en 4 parties de taille similaire et clonées ces dernières de manière indépendante dans le vecteur d'expression (Figure 2-5).

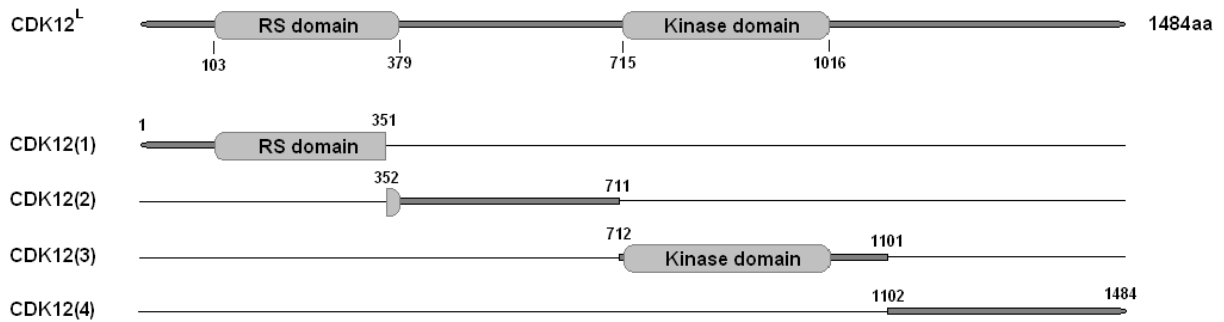


Figure 2-5 **Constructions de CDK12 par expression en bactérie**

Quatre constructions possédant l'un des quatre fragments de CDK12 ont été générées dans le vecteur d'expression procaryote pGEX-KG. Les fragments 1 et 3 du gène possèdent les domaines RS et kinase, respectivement.

Les protéines recombinantes codant pour chaque fragment de CDK12 ont été produites en bactérie, purifiées et validées par gel SDS-PAGE. Nous avons ensuite performé des essais kinase *in vitro* en utilisant ces protéines recombinantes et l'enzyme ERK1 active (figure 2-6). La taille de chaque protéine recombinante couplé à la GST est estimée entre 60 et 66 kDa. La production du premier fragment a été particulièrement difficile à réaliser, ne présentant qu'une faible bande à environ 65 kDa.

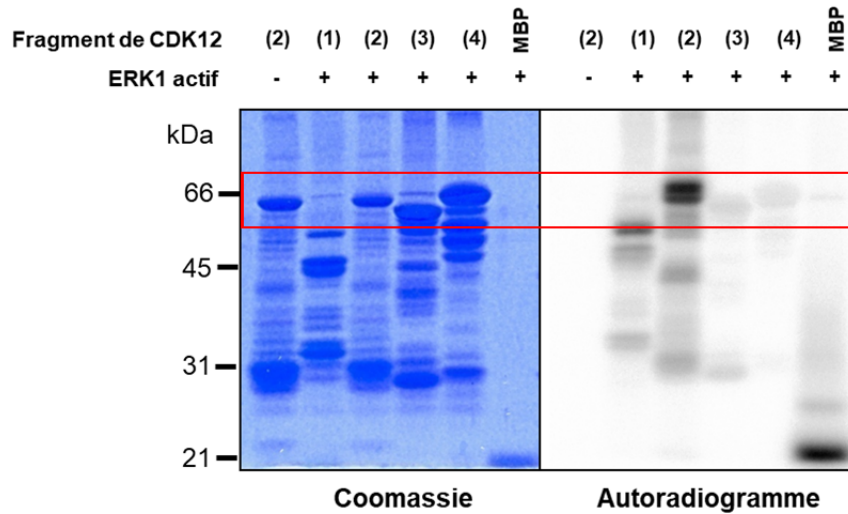


Figure 2-6 **Phosphorylation *in vitro* des mutants de CDK12**

Essai kinase *in vitro* des fragments de CDK12 par ERK1/2 en présence de 50 μ M d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 active. Les quatre fragments produits sont mis en évidence à l'intérieur du cadre rouge. La protéine MBP a été utilisée comme contrôle positif afin de valider l'activité de l'enzyme ERK1. Cette expérience a été effectuée à plus de trois reprises.

La serine 1079 identifiée dans l'analyse phosphoprotéomique est présente dans la portion C-terminale du 3^{ème} fragment de CDK12, mais ne présente pas une phosphorylation significative. Une bande de phosphorylation a cependant été observée au niveau du second fragment codant la région couvrant les acides aminés 352 à 711, CDK12(2). Ce résultat concernant le second fragment de CDK12 fut validé dans plus d'une dizaine d'expériences indépendantes.

Afin de déterminer le site exact de phosphorylation par ERK1/2, nous avons effectué un essai kinase *in vitro* non-radioactif afin d'analyser la protéine par spectrométrie de masse (Figure 2-7). Bien que la taille de ce fragment soit faible, 13 sites correspondent au motif minimal de phosphorylation par ERK1/2, soit une sérine ou une thréonine suivi d'une proline.

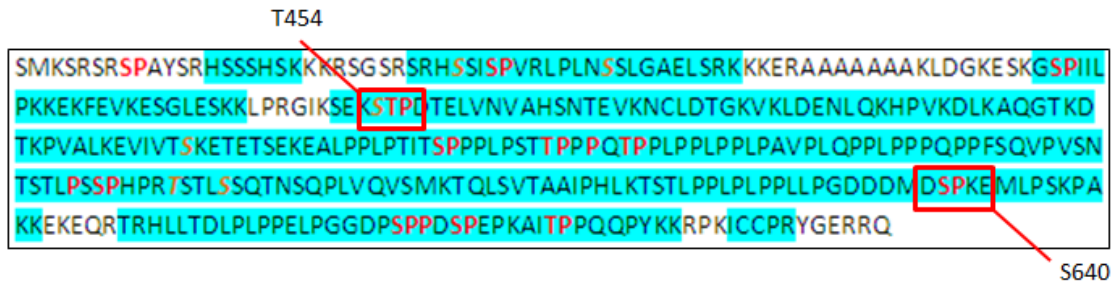


Figure 2-7 **Analyse protéomique de la phosphorylation de CDK12(2) par ERK1/2 *in vitro***

Séquence de CDK12(2) suite à l'analyse par spectrométrie de masse. La couverture de la séquence par analyse MS de deux expériences indépendantes est surlignée en bleu. Les sites correspondant au motif minimal consensus de phosphorylation par ERK1/2 sont en rouge. Les deux sites de phosphorylation identifiés par cette analyse sont mis en évidence par un encadré rouge. Cette expérience a été effectuée à deux reprises.

L'analyse en spectrométrie de masse de l'essai kinase suggère que deux sites sont phosphorylés par ERK1/2 : la T454 et la S640. Il est à noter qu'aucun de ces deux sites ne possède une proline en position -2, motif préférentiel de phosphorylation par ERK1/2. Il est toutefois nécessaire de valider la perte de phosphorylation par mutagenèse dirigée en essai kinase *in vitro*. Des mutants alanine de chacun des 13 résidus possédant le motif minimal consensus de phosphorylation par ERK1/2 furent ainsi générés dans le vecteur d'expression procaryote de la protéine recombinante. Le double mutant des sites identifiés par l'analyse protéomique a aussi été produit. La figure 2-8 présente le résultat de l'essai kinase sur les protéines recombinantes de CDK12(2) WT ou mutantes. Sans surprise, une majorité des sites mutés ne présentent pas de diminution importante de la phosphorylation par ERK1. Cependant, le double mutant des sites identifiés en spectrométrie de masse est toujours phosphorylé, suggérant que d'autres résidus sont responsables de la phosphorylation par ERK1.

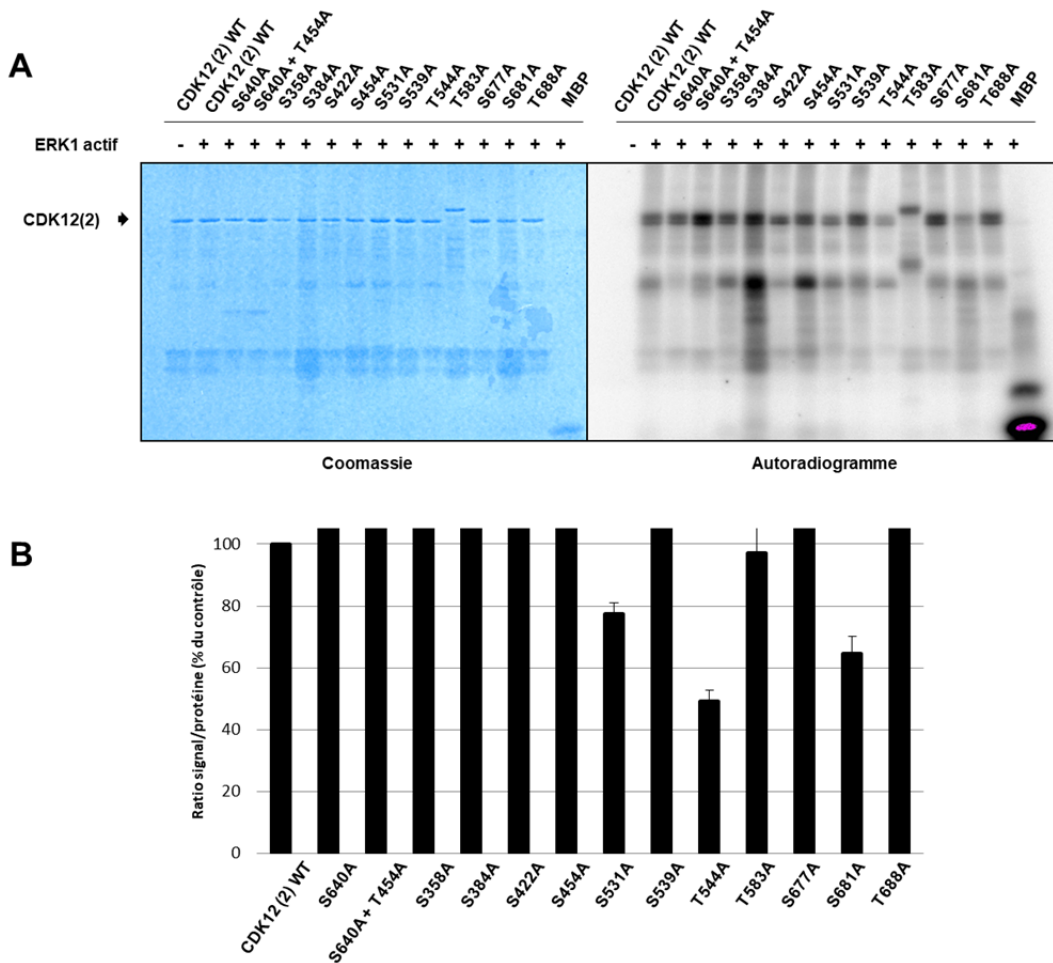


Figure 2-8 **Phosphorylation *in vitro* des mutants de CDK12**

(A) Essai kinase *in vitro* de CDK12(2) WT ou mutants par ERK1/2. (B) Quantification de l'intensité de phosphorylation tel que mesuré sur l'autoradiogramme. Les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

Cette expérience a toutefois permis d'identifier plusieurs mutants dont la phosphorylation est diminuée de manière importante. Notamment, la mutation de la thréonine 544 et de la sérine 681 suggèrent une baisse de près de 50% et 40% du signal, respectivement. Il est intéressant de noter que ces sites de phosphorylation possèdent tous les deux une proline en position -2, contrairement aux résidus identifiés par spectrométrie de masse. Le double mutant des sites S681 et T544 fut généré par mutagenèse dirigée, mais ne semble pas abroger

le signal de phosphorylation complètement. Effectivement, la figure 2-9 présente les résultats de mutation successive des sites potentiels de phosphorylation par ERK1/2, jusqu'à la mutation de dix des 13 sites existants. Le double mutant S681A/T544A démontre une phosphorylation similaire au simple mutant S681A, suggérant que d'autres sites de phosphorylation peuvent contribuer au signal observé *in vitro*. De surcroît, la mutation successive de sites potentiels (en commençant par ceux possédant le motif préférentiel P-X-S/T-P) suggère que de multiples résidus sont responsables du signal de phosphorylation observé. Ces résultats illustrent les limites d'une approche *in vitro* pour identifier précisément des sites de phosphorylation.

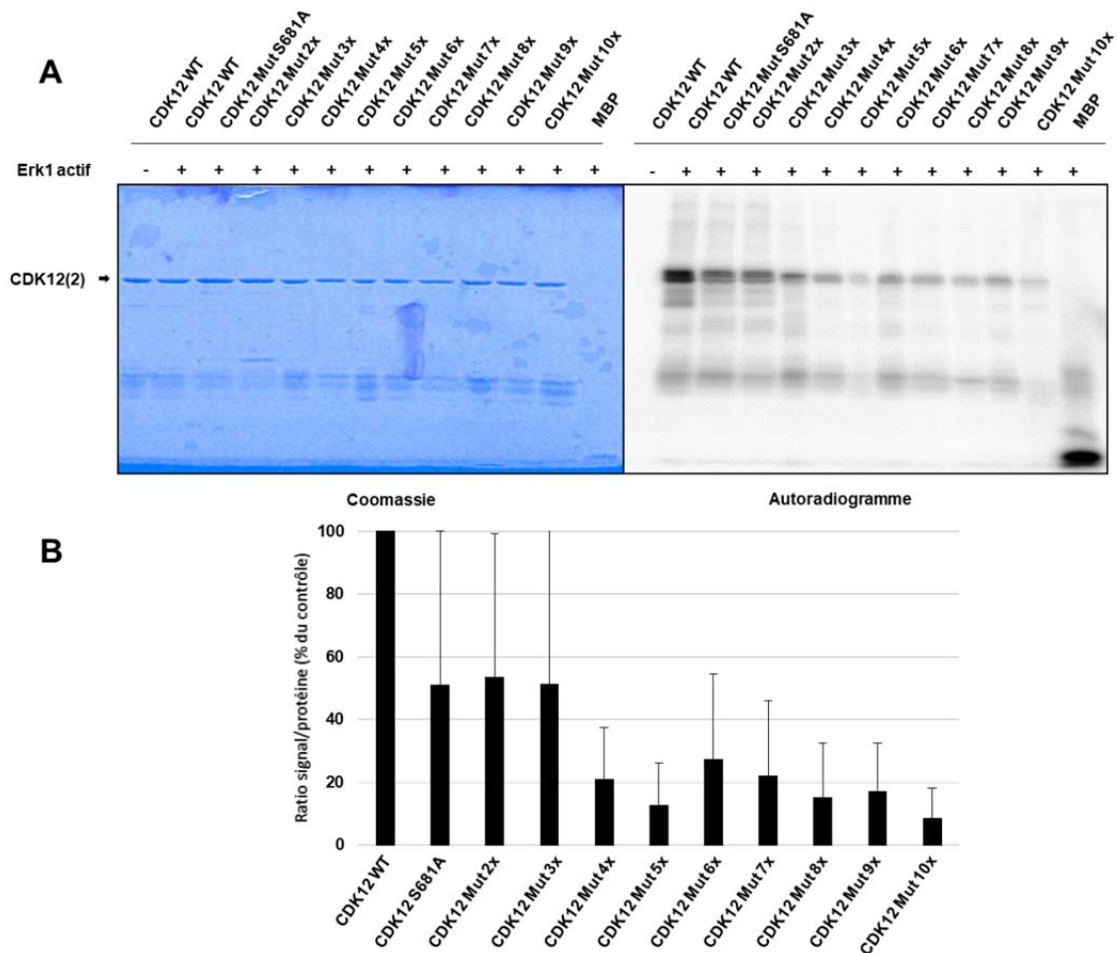


Figure 2-9 **Phosphorylation *in vitro* de mutants successifs de CDK12**

(A) Essai kinase *in vitro* de CDK12(2) WT ou mutants générés de manière additionnels par ERK1/2. (B) Quantification de l'intensité de phosphorylation tel

que mesuré sur l'autoradiogramme. Les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

Cette hypothèse a aussi été confirmée par la génération d'une carte phosphopeptidique 2D. Dans cette expérience, un essai kinase a été effectué à partir de la protéine recombinante CDK12(2) WT et soumis à l'analyse par cartographie bidimensionnelle telle que développée par Tony Hunter et permettant de discriminer les peptides tryptiques phosphorylés. Quatre peptides tryptiques semblent ainsi ressortir de cette analyse, dont un particulièrement important (figure 2-10). Il est possible que la forme irrégulière du signal provienne d'une digestion incomplète ou encore de la phosphorylation de multiples résidus au sein du même peptide.

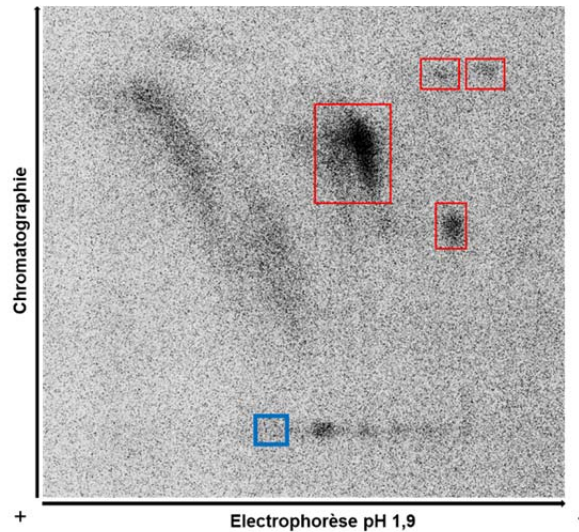


Figure 2-10 **Carte phosphopeptidique 2D de la phosphorylation de CDK12(2)**

Un essai kinase *in vitro* de CDK12(2) WT a été effectué puis digéré par la trypsine. Les fragments tryptiques ont été soumis à cartographie phosphopeptidique en deux dimensions puis détecté par autoradiographie. L'encadré bleu illustre le point de dépôt de l'échantillon, alors que les encadrés rouges correspondent aux peptides phosphorylés.

2.4.4 Autres substrats potentiels de ERK1/2 invalidés par essai kinase *in vitro*

Parmi les facteurs d'épissages dont une phosphorylation a été observée par analyse phosphoprotéomique à grande échelle, on retrouve en plus les protéines tra2- β 1, SRSF1, SRSF2, SRm160 et SRm300. De ces dernières, les protéines recombinantes fusionnées à la GST tra2- β 1, SRSF1 et SRSF2 peuvent être produites. L'une des limitations à la production de protéines en cellules procaryotes est en fait la taille des protéines elles-mêmes, où il devient difficile de produire des protéines dépassant 100kDa de manière générale. Il n'est donc pas surprenant que les facteurs d'épissage SRm160 et SRm300, dont les tailles sont respectivement de 160kDa et 300kDa, soient impossibles à produire pleine longueur. Similairement à CDK12, des constructions encodant des fragments de ces protéines furent générés mais n'ont toutefois pas permis la production et la purification de protéines recombinantes de manière robuste.

Les résultats concernant la phosphorylation potentielle des facteurs d'épissage tra2- β 1 (A), SRSF1 (B) et SRSF2 (C) par ERK1/2 sont présentés à la figure 2-11. Il ne semble ainsi qu'aucun de ces facteurs d'épissage ne soient des substrats de ERK1/2 *in vitro*.

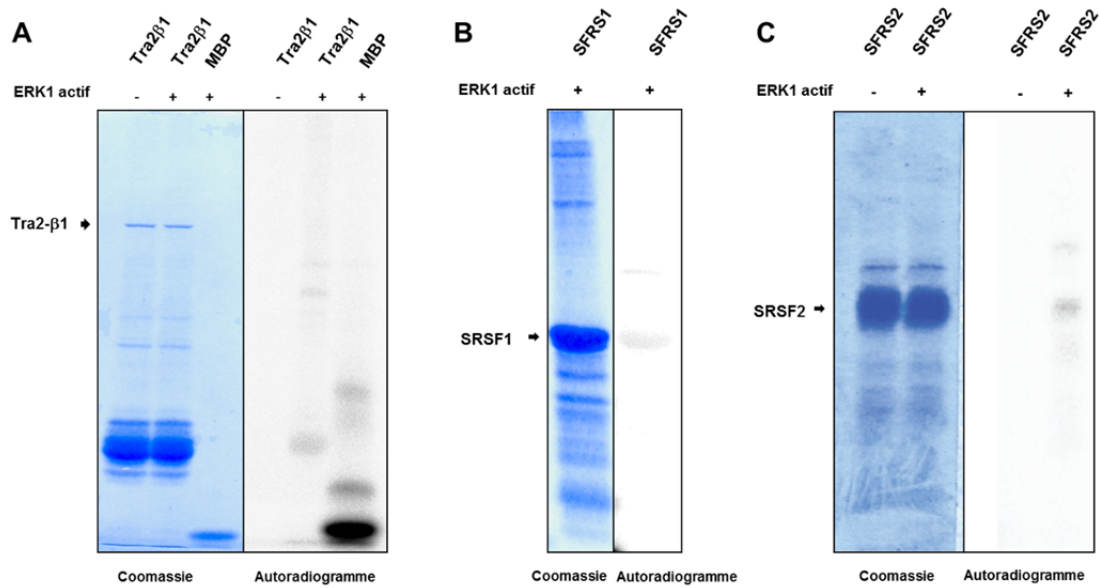


Figure 2-11 **Essai kinase *in vitro* d'autres facteurs d'épissage**

Essai kinase *in vitro* de tra2-β1 (A), SRSF1 (B) et SRSF2 (C) par ERK1/2 en présence de 50 μM d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 recombinante active. Ces expériences ont été effectuées à au moins deux reprises.

2.5 Discussion

La discussion de ce chapitre portera sur l'analyse des données présentées à la section précédente ainsi qu'à la signification qu'incombe la découverte de nouveaux substrats potentiels de ERK1/2 dans la régulation de l'épissage alternatif. Bien que quelques études aient décrit de nouveaux substrats de manière sporadique, aucune étude systématique n'a été réalisée en vue d'établir un portrait global de la contribution de la signalisation Ras-MAP Kinase à ce processus. La seconde partie s'intéresse spécifiquement à la kinase CDK12 comme substrat de ERK1/2, kinase qui possède plusieurs rôles cellulaires variés et dont l'importance dans le cancer ne prend que de l'ampleur au fil des années. De nombreuses limitations ont cependant affecté l'issue de nos efforts pour caractériser ces substrats et seront discutés dans la dernière partie.

2.5.1 Phosphorylation de plusieurs facteurs d'épissage par ERK1/2

Dans cette étude, nous avons identifié plusieurs nouveaux substrats *in vitro* de ERK1/2 ayant des rôles connus dans l'épissage alternatif. Ces résultats ont été générés par essai kinase *in vitro*, qui est une technique robuste afin de valider ou infirmer qu'un substrat puisse être phosphorylé par une kinase. La production bactérienne du substrat, de pair avec l'utilisation d'enzymes purifiées commerciales, élimine la possibilité qu'une kinase externe intervienne dans la réaction de phosphorylation. Bien que des effets hors-cibles soient toujours théoriquement possibles, l'essai kinase *in vitro* est une méthode particulièrement puissante pour identifier des substrats de manière systématique ainsi que les sites de phosphorylation associés.

Nous avons identifié la protéine RNPS1 comme substrat potentiel de ERK1/2 dans l'analyse phosphoprotéomique publiée par notre groupe en 2013, et observé une phosphorylation de la protéine recombinante complète par ERK1 *in vitro*. Cette protéine est extrêmement riche en sérines et, selon la banque de donnée Phosphosite, hautement phosphorylée. Plusieurs séquences au motif consensus minimal de ERK1/2 existent ainsi, notamment les sérines 27, 155, 157, 251 et 266 qui ont été observées chacune dans plus d'une quinzaine d'études phosphoprotéomiques différentes. Néanmoins, une seule étude publiée porte sur la modification post-traductionnelle de RNPS1 par une voie de signalisation (645). Selon cette dernière, la caséine kinase II phosphoryle la sérine 53 de RNPS1 et stimule l'épissage *in vitro* du gène de la beta-globine en présence de SRSF1, ainsi que l'épissage *in vivo* de la construction rapporteur TN24. Les auteurs indiquent que la phosphorylation de la sérine 53 n'affecte pas la localisation nucléaire de la protéine. Le rôle de cette phosphorylation dans la capacité d'export de l'ARNm après le dépôt du complexe exon-jonction, de la dégradation d'ARNm induite par mutation non-sens ou l'épissage de transcrits cibles connus n'a pas été validée à ce jour. Un point intéressant que ces auteurs soulèvent est que la phosphorylation de la S53 par CKII semble promouvoir la phosphorylation *in vivo* de RNPS1 par d'autres kinases. Effectivement, une dizaine de peptides tryptiques phosphorylés a été

détectée par chromatographie bidimensionnelle sur couche-mince, et ce signal est réduit de manière générale lorsque la sérine 53 est mutée en alanine.

Un aspect intéressant d'une potentielle phosphorylation de RNPS1 par ERK1/2 est la possibilité d'un nouveau mode d'autorégulation quant à l'expression de ERK1/2. Effectivement, le groupe de Marc Therrien a identifié les composantes du complexe d'exon-jonction, dont RNPS1 est un facteur auxiliaire, comme régulateur de l'épissage et de l'expression de MAPK chez la drosophile (160). Dans cette étude, la déplétion de RNPS1 suggère qu'une modulation de l'épissage du transcrit primaire de *MAPK* survient, suivi de sa dégradation subséquente. RNPS1, dont l'activité est connue pour être régulée par la phosphorylation de certains résidus, semble avoir un impact sur les niveaux d'expression de MAPK lorsque déplété, de pair avec les autres composantes de l'EJC (645). Bien qu'une hypothèse intéressante expliquant pourquoi les niveaux de MAPK sont si stables dans un contexte cellulaire donné pourrait être la régulation de l'activité de RNPS1 par MAPK, aucun groupe n'a observé à ce jour une modulation des niveaux de celles-ci en réponse à leur propre activité, suggérant qu'une phosphorylation de RNPS1 par ERK1/2 est sans effet sur leur niveau d'expression.

Néanmoins, il importe de continuer la validation de la phosphorylation de RNPS1 par ERK1/2 et d'identifier les résidus impliqués. L'analyse en spectrométrie de masse que nous avons effectuée sur la protéine phosphorylée *in vitro* couvre la région des sérines 153 et 155 identifiés originellement, mais n'a pas confirmée la phosphorylation. À ce stade, la mutation de ces résidus, ainsi que ceux dont le motif correspond à la séquence consensus minimale de ERK1/2, est l'étape clé nous permettant de passer à la caractérisation *in vivo*. Ceci nous permettra de valider par des méthodes protéomiques et biochimiques l'existence d'une phosphorylation de RNPS1 par ERK1/2 au sein de la cellule et, conjointement, d'analyser l'impact d'une mutation de ce(s) résidu(s) sur la fonction de la protéine.

Une autre cible intéressante que nous avons validé *in vitro* est la kinase SRPK2. Similairement à RNPS1, plusieurs études protéomiques ont observé la phosphorylation de sérines et thréonines mais peu ont caractérisé le mécanisme ou la kinase en amont. Un groupe a observé la phosphorylation de la T492 par Akt, mais cette conclusion a ensuite été rejetée puisque le motif de phosphorylation ne concorde pas avec celui généralement reconnu pour Akt (433, 434). Le groupe de Xiang-Dong Fu a aussi suggéré que Akt puisse induire l'autophosphorylation de SRPK1 par un mécanisme allostérique, modulant ainsi son activité ainsi que sa localisation (433). Nous avons aussi observé que SRPK2 est aussi capable d'autophosphorylation, tel que démontré par l'utilisation de la kinase WT produite en bactérie. Nous remarquons que le signal de phosphorylation de la forme WT n'augmente pas lorsqu'on incube cette kinase en présence de ERK1, en opposition à l'augmentation de phosphorylation observée lors de l'utilisation d'une forme KD de SRPK2. Pour expliquer cette différence, deux hypothèses peuvent être émises. Une première hypothèse moins plausible est que le résidu de phosphorylation soit le même chez les deux kinases, qui compétitionnent pour le site de phosphorylation et ainsi ne présentent pas une action additive de leurs activités combinées. Plusieurs substrats connus de SRPK2 ont cependant des motifs largement différents de ceux de ERK1/2, donc les possibilités qu'une même séquence soit la cible de ces deux kinases est faible. Une seconde hypothèse implique la phosphorylation d'un site distinct par ERK1 sur SRPK2 qui induit une diminution de son activité catalytique. Conséquemment, la hausse du niveau de phosphorylation induit par ERK1/2 serait compensée par la baisse d'autophosphorylation de SRPK2.

Sans égard à ce mécanisme, nous avons tout de même démontré la phosphorylation de SRPK2 par ERK1/2 sur au moins l'un des cinq sites dont la séquence est conforme au motif minimal S/T-P. Nous savons aussi que les kinases SRPK1 et SRPK2 ne semblent pas phosphorylées par ERK1/2, ce qui n'est pas étonnant lorsqu'on compare les séquences de ces trois kinases qui ne partagent qu'un unique site TP conservé chez SRPK1 et SRPK2. Il importe donc à cette étape de poursuivre la validation de ce substrat par mutagenèse dirigée et spectrométrie de masse afin d'identifier un ou plusieurs résidus responsables de cette phosphorylation. Similairement à RNPS1, l'identification de ce site est indispensable à la

génération d'outils permettant la caractérisation *in vivo* de cette phosphorylation. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'activité kinase ainsi que la localisation cellulaire de SRPK2 WT et mutants pour les sites identifiés.

2.5.2 CDK12 est un nouveau substrat de ERK1/2

Parmi les substrats potentiels liés à l'épissage issus de nos analyses phosphoprotéomiques se trouve la kinase CDK12. La sérine 1079 est phosphorylée en réponse à un traitement à l'EGF dans la condition contrôle, mais ne l'est pas de manière importante dans la condition ERK1/2 DKO. Nous avons ainsi validé la phosphorylation de l'un des segments de CDK12 englobant la section entre le domaine kinase et le domaine RS. Nos efforts suggèrent que plusieurs sites de phosphorylation sont responsables du signal observé en essai kinase, notamment la sérine 681 et la thréonine 544 de la séquence de rat (respectivement la S685 et la T548 chez l'homme, la séquence étant bien conservée autour de ces sites). Contrairement à la sérine 1079, qui ne possède que le motif minimal de phosphorylation S/T-P, les deux sites que nous avons identifiés contiennent une proline en position -2, caractéristique d'une majorité des substrats de ERK1/2. Curieusement, alors que la sérine 681 est trouvée phosphorylée dans 74 études protéomiques distinctes, notamment certaines où une activation de la voie MAP Kinase est impliquée, la phosphorylation de la thréonine 544 n'a été observée par aucun groupe (646-648).

Dans l'optique où cette phosphorylation est aussi validée *in vivo*, nous pouvons examiner l'impact possible de cette phosphorylation sur la fonction de cette kinase. L'un des premiers rôles imputés à CDK12 concerne ses rôles dans le contrôle de l'épissage alternatif. Effectivement, CDK12 phosphoryle le facteur d'épissage SRSF1 et, via son association à la cycline L, module l'épissage d'un rapporteur minigène E1a (454, 649). L'association de CDK12 avec la cycline L a cependant été contestée par d'autres groupes qui s'intéressent plus spécifiquement à la fonction de la kinase dans la phosphorylation de la CTD de l'ARN

polymérase II (455). Ces auteurs proposent que CDK12 s'associe avec la cycline K, ce qui a été validé par d'autres équipes et est généralement accepté de nos jours (456, 650, 651). De manière intéressante, il a aussi été démontré que cette cycline est un substrat de ERK1/2 (338). Une étude récente illustre néanmoins un mécanisme par lequel CDK12 régule un type particulier d'épissage du dernier exon alternatif (ALE) des transcrits des gènes ATM et DNAJB6, deux composantes impliquées dans la réponse au dommage à l'ADN (458). Celle-ci suggère ainsi que CDK12 possède tout de même certaines fonctions liées à l'épissage alternatif, fonction qui n'a été que peu exploré pendant de nombreuses années au profit de son rôle dans la transcription (652, 653).

L'expression de CDK12 ainsi que de sa cycline partenaire, la cycline K, est particulièrement élevée dans les cellules souches embryonnaires (650). L'inhibition de leur expression dans ce modèle induit une baisse d'expression des marqueurs d'auto-renouvellement et provoque la différenciation de ces cellules, suggérant un rôle important de cette kinase dans le processus d'auto-renouvellement. De surcroît, la délétion du gène de CDK12 induit la mort dans un modèle murin tôt suivant l'implantation de l'embryon (654). Considérant que l'expression et l'activité de ERK1/2 est critique au processus de différenciation, il serait intéressant de voir dans quelle mesure une phosphorylation potentielle de CDK12 par ERK1/2 affecte la balance de l'expression des gènes d'auto-renouvellement et de gènes liés à la différenciation.

De nombreuses études suggèrent aussi une importance grandissante de CDK12 plusieurs types de cancers (revu dans (457)). Il existe ainsi une littérature conflictuelle relative à l'expression de CDK12 dans le cancer et à son rôle. D'une part, la surexpression de CDK12 est observée dans plusieurs types de tumeurs, notamment le cancer ovarien et du sein (655, 656). De plus, un criblage basé sur la létalité synthétique en réponse aux inhibiteurs de PARP1/2 suggère que la perte de CDK12 confère une sensibilité particulière à ces inhibiteurs, en faisant une cible attrayante dans le cancer ovarien (657). De plus, sachant que l'activité de CDK12 contribue au caractère souche dans le développement embryonnaire, certains auteurs

se questionnent quant à la possibilité que CDK12 contribue à un état dédifférencié de la cellule cancéreuse et accélère la progression tumorale (658).

Mais en dépit d'une amplification du gène dans certains cas, la plupart des mutations répertoriées récurrentes dans le cancer incombent une perte de la fonction catalytique de l'enzyme. Ceci se traduit notamment par une diminution de l'expression de gènes liés à la réparation du dommage à l'ADN tels que ATM, ATR et FANCI (659). Une analyse du catalogue des mutations somatiques dans le cancer (COSMIC) ne révèle cependant aucune mutation observée de la sérine 681, le site principal d'intérêt identifié par nos expériences. D'importants défauts dans le processus de recombinaison homologue sont ainsi observés dans certaines tumeurs en réponse à une perte de fonction de CDK12 (660). Dans ce contexte, CDK12 agit plutôt à titre de suppresseur de tumeur.

Indépendamment du rôle exact que peut jouer CDK12 dans le processus de tumorigénèse, tous conviendront pour dire que les multiples fonctions émergentes de cette protéine sont importantes à la physiologie normale de la cellule. Sachant que la voie MAP Kinase est fréquemment activée dans le cancer, il sera important de vérifier si une phosphorylation de CDK12 module certaines de ses fonctions connues. Ainsi, l'expression *in vivo* d'une construction dont la sérine 681 est mutée nous permettra de définir le rôle de cette phosphorylation dans la fonction de CDK12. Nous pourrons ainsi regarder d'une part l'activité kinase de CDK12 vis-à-vis ses deux substrats connus, SRSF1 et la CTD de l'ARN polymérase II, ainsi que la capacité d'épissage soit par l'utilisation d'un minigène rapporteur ou par l'études des isoformes de ATM/DNAJB6 décrits dans la littérature. L'expression de gènes liés à la réparation du dommage à l'ADN pourra aussi être analysée par PCR en temps réel.

2.5.3 Limitations des études de la phosphorylation de CDK12 par ERK1/2

La validation *in vivo* du site de phosphorylation identifié, principalement la sérine 681 à ce stade, est été compliquée par de nombreuses limitations techniques. Jusqu'à tout récemment, les anticorps spécifiques à cette protéine étaient largement inefficaces pour la détection de la protéine endogène, qui fait près de 200 kDa. En absence d'une bande claire et reproductible en immunobuvardage, le déplacement de la bande sur gel dû à une phosphorylation est impossible à déceler même via l'utilisation de réactifs spécialisés dans ce type d'expérience (phos-tag). Plusieurs constructions CDK12 fusionnées à un tag ont été générées afin de palier à ce problème, notamment les séquences HA, Flag et Myc, mais avec un succès parfois mitigé. CDK12-Flag présente le signal le plus convaincant de tous les essais et nos efforts se concentreront sur l'utilisation de cet outil. L'avènement d'anticorps de bonne qualité permettra notamment d'immunoprécipiter la protéine endogène et de l'analyser par spectrométrie de masse.

Les expériences *in vitro* ont aussi leurs limitations. On ne peut pas exclure que le repliement normal de la protéine complète empêche la phosphorylation d'un résidu qui se retrouve exposé chez la protéine tronquée. Nous avons notamment tenté, en vain, de produire la protéine complète par traduction *in vitro* dans un système de lysats de réticulocyte de lapin. Une option non testée à ce jour est la production de la protéine en cellules d'insectes ou par surexpression dans des cellules HEK293T.

Chapitre 3 : Contrôle de la différenciation cellulaire des cellules souches embryonnaires par ERK1/2

Les MAP Kinases ERK1/2 jouent un rôle clé dans le processus de différenciation des cellules souches embryonnaires murines (mES)(486, 502, 506). Cependant, les mécanismes selon lesquels ERK1/2 induit la sortie de l'auto-renouvellement et engage la cellule vers un destin cellulaire ne sont pas entièrement compris. De surcroît, plusieurs processus moléculaires ayant des rôles clés dans la différenciation, tels que l'épissage alternatif, n'ont toujours pas été associés à une régulation en aval par les voies de signalisation. Ainsi, afin d'élucider le rôle de ERK1/2 dans l'induction de la différenciation des cellules souches, nous avons généré un modèle de cellules souches embryonnaires murines dont les gènes ERK1 et ERK2 sont délétés. Tel que résumé à la figure 3-1, une femelle porteuse d'une mutation ERK1^{-/-} homozygote et possédant un allèle conditionnel ERK2^{lox2/lox2} homozygote a été croisé à un animal male hétérozygote pour les deux gènes. Ceci permet de générer notamment un embryon ERK1^{-/-} homozygote et ERK2^{d/lox2} hétérozygote. Le dernier allèle du gène ERK2 est ensuite excisé par expression de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Sox2*.

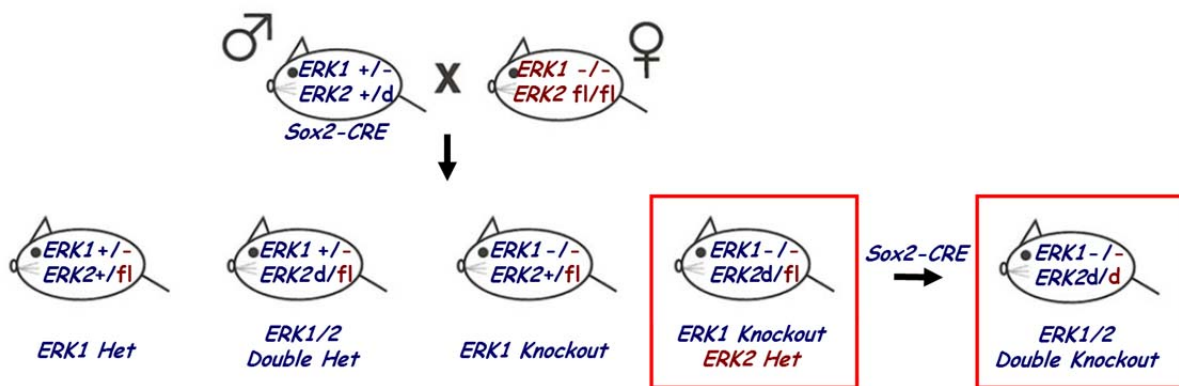


Figure 3-1 Schéma du croisement des souris menant à la génération de cellules souches embryonnaires murines ERK1/2 DKO

Ces expériences ont été effectuées par Marc Saba-El-Leil, et ont permis l'isolation de trois populations clonales de cellules ES ERK1/2 DKO. Bien que l'absence totale d'ERK1/2 induise la mort embryonnaire très tôt dans le développement, les cellules souches isolées sont viables et prolifèrent en présence d'une couche de fibroblastes nourricière. De manière intéressante, l'expression de ERK1 ou ERK2 dans ce modèle suivant électroporation induit la différenciation de ces cellules le long des trois couches germinales du feuillet embryonnaire.

Ce modèle génétiquement pur nous a permis d'investiguer les étapes précoces de la différenciation induite par l'expression et l'activité des MAP Kinases ERK1/2. Pour ce faire, deux populations de clones (89 et 99) ont été électroporées d'un vecteur vide ou d'un vecteur pCAGGS exprimant ERK1. L'ARN des cellules fut isolé après 48h pour chacune des conditions, et le séquençage de l'ARN à haut-débit (RNA-seq) fut effectué sur ces échantillons à la plateforme génomique de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC) par Marc Saba-El-Leil. Les résultats portant sur la caractérisation de la différenciation cellulaire ainsi que l'expression des gènes impliqués dans ce processus font encore l'objet d'une étude de notre laboratoire. Ma contribution à ce projet consiste en l'analyse et la caractérisation des différences d'expression des événements d'épissages observés lors de l'analyse transcriptomique. Plus précisément, les travaux présentés dans ce chapitre focaliseront sur le rôle de l'expression d'ERK1 dans l'épissage alternatif de gènes impliqués dans la différenciation.

3.1 Approche méthodologique

Matériel et méthodes

Culture cellulaire et traitements

Les cellules NIH3T3, MCF-7, HCT116 et C2C12 ont été obtenues de American Tissue Culture Collection et cultivées à 37°C dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM)

contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS) ainsi que d'antibiotiques. Les cellules ES ont été isolées de blastocystes issus du croisement de souris C57Bl/6 males Sox2-CRE ERK1^{+/-} ERK2^{+/-} et femelles ERK1^{-/-} ERK2^{lox2/lox2} au jour 3,5 (Voir figure 3-1 pour le détail du croisement). Les cellules ES furent ensemencées sur une couche de MEFs nourricières en présence de sérum et de LIF. Après l'obtention de colonies, le génotype des différents clones fut effectué par PCR. L'inhibiteur de MEK1/2 PD184352 est un cadeau généreux de Pfizer, et est utilisé à une concentration finale de 5 uM.

Séquençage de l'ARN à haut-débit

L'ARN a été isolé des cellules ES en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen). La qualité des échantillons a été validée par analyse au Bioanalyzer RNA Nano chip (Agilent) à la plateforme de génomique de l'IRIC. Les bibliothèques de transcriptome ont été générées à partir de 4ug d'ARN en utilisant le kit TruSeq RNA Sample Prep (Illumina) selon le protocole du fabricant. Le séquençage à haut-débit de l'ARN a été effectué à la plateforme génomique de l'IRIC sur l'instrument Illumina HiSeq2000.

Validation par PCR et RT-PCR

L'ARN a été isolé des cellules ES en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen). La reverse transcription a été effectuée dans un volume de 100 ul à l'aide du kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) et en utilisant des amorces poly-dT. Les PCR ont été effectuées via le kit TAQ polymérase (Feldan) à partir de 2 ul d'ARNc et 1ul d'amorces flanquant la région d'intérêt. Le produit de PCR est déposé sur gel d'agarose 0.6% en présence de bromure d'éthidium.

Validation par électrophorèse capillaire

L'ARN a été isolé des cellules ES en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen). La RT-PCR a été effectuée à la plateforme RNomique de l'université de Sherbrooke à partir d'amorces spécifiques à chaque transcrite d'intérêt. L'abondance et la taille des amplicons a été mesurée par électrophorèse capillaire à partir d'une station de lecture Caliper de cette plateforme. L'abondance relative est exprimée en valeur « percent spliced-in » (PSI), qui correspond au pourcentage de la concentration du long amplicon sur la somme des amplicons longs et courts.

Plasmides, production de protéines recombinantes et essai kinase *in vitro*

Le plasmide pLX304-MBNL2 provient de la banque de plasmides d'Harvard Medical School (HsCD00413900). La construction pGEX-KG-MBNL2 a été générée par le clonage de la séquence codant MBNL2 dans pGEX-KG en EcoRI-XhoI. Les protéines recombinantes GST-MBNL2 furent produites par induction à 50 mM d'IPTG dans *E. coli* pendant 18 heures à 25°C. Les cellules sont lysées à -80°C dans le tampon de lyse constitué de PBS 1X, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% triton ainsi que des inhibiteurs de protéases (Leupeptine, PMSF, pepstatine), puis soniquées pendant 3x 30 secondes. La purification des protéines recombinantes est effectuée sur billes glutathione-Sepharose (GE Healthcare) pendant 18 heures à 4°C, puis validée sur gel SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie.

Pour les essais kinase, 10 ug de GST-MBNL2 a été incubé dans le tampon kinase (20 mM Tris-HCl, pH. 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂) en présence d'ATP 50 uM, 5 µCi [γ -³²P]ATP ainsi que 30 ng d'enzyme ERK1 recombinant actif (Millipore). La réaction a été effectuée sous agitation pendant 30 minutes à 30°C. Les produits réactionnels ont été déposés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie et analysés par autoradiographie.

3.2 Résultats

3.2.1 Analyse de séquençage à haut-débit de cellules ERK1/2 DKO / +ERK1

Afin d'élucider les évènements précoces de la différenciation causées par l'expression de ERK1 dans notre modèle de cellules ES, les données de séquençage à haut débit ont été analysées et compilées afin de générer deux listes. La première dévoile la différence d'expression des gènes entre la condition ERK1/2 DKO et la condition où ERK1 est exprimée. La seconde, générée grâce à l'aide du Dr Benoit Chabot ainsi que Phillipe Thibault, bio-informaticien de la plateforme RNomique de l'Université de Sherbrooke, compare plutôt les différences d'expression d'isoformes issus de mêmes gènes entre les deux conditions.

Le tableau II présente un résumé des 60 isoformes exprimés de manière différentielle entre la condition ERK1/2 DKO et la condition +ERK1, où un plasmide encodant le gène de ERK1 est exprimé. Ces expériences ont été effectuées par Marc Saba-El-Leil à partir de deux clones de cellules ES ERK1/2 DKO distincts, le clone 89 et le clone 99. Les valeurs sont exprimées en Percent Spliced Index (PSI), qui représente le pourcentage d'expression d'un isoforme long donné par rapport à la somme des deux isoformes. Pour chacun des transcrits analysés, un Delta PSI positif suggère ainsi une augmentation de la proportion de l'isoforme long lorsque ERK1 est exprimé, alors qu'un Delta PSI négatif témoigne plutôt d'une augmentation de l'isoforme court. Les gènes sont classés en fonction du facteur de confiance en transcrits par millions (TPM), qui tient compte de la qualité du transcrit via le nombre de lectures ainsi que l'écart type à la moyenne.

Gène	Delta PSI 89	PSI DKO 89	PSI ERK1 89	Delta PSI 99	PSI DKO 99	PSI ERK1 99	Nom
Rps24	-18.1	56.1	38.0	-10.9	57.5	46.5	ribosomal protein S24
Dnmt3b	11.5	73.3	84.8	11.0	68.5	79.5	DNA methyltransferase 3B
Morf4I2	-22.9	91.9	68.9	-30.9	95.2	64.3	
Eif4a2	10.5	16.1	26.6	13.1	13.7	26.9	eukaryotic translation initiation factor 4A2
Csnk1a1	15.6	35.2	50.8	13.8	34.4	48.3	casein kinase 1, alpha 1
Nap14	21.8	14.3	36.1	13.9	17.1	31.0	nucleosome assembly protein 1-like 4
Trp53inp1	-11.2	54.0	42.8	-11.7	55.2	43.5	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1
Bag6	-10.7	49.3	38.6	-11.8	50.9	39.2	BCL2-associated athanogene 6
Morf4I2	-22.6	29.9	7.2	-44.5	51.3	6.8	
Morf4I2	-19.8	27.5	7.7	-40.8	45.8	5.0	
Ctnnd1	-12.0	57.1	45.1	-10.0	58.2	48.1	catenin (cadherin associated protein), delta 1
1110038B12Rik	10.9	50.4	61.3	10.7	45.9	56.6	RIKEN cDNA 1110038B12 gene
Picalm	28.5	24.4	52.9	22.4	25.2	47.5	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
Csnk1d	16.3	24.4	40.6	17.6	25.4	43.0	casein kinase 1, delta
Tfdp1	12.5	13.9	26.4	12.4	9.9	22.3	transcription factor Dp 1
Qk	-22.6	44.0	21.4	-13.7	34.8	21.2	quaking
Usp1	17.8	40.3	58.1	10.9	38.2	49.1	ubiquitin specific peptidase 1
Nf2	13.9	73.1	87.0	12.3	80.1	92.4	neurofibromatosis 2
Fbx19	11.0	56.8	67.7	12.9	55.7	68.6	F-box and leucine-rich repeat protein 19
Dag1	-29.7	60.5	30.7	-22.6	58.6	36.0	dystroglycan 1
Pdpf	11.4	73.2	84.6	11.4	67.6	79.1	
Prrc2b	-14.7	51.2	36.6	-14.6	54.1	39.5	proline-rich coiled-coil 2B
Trmt1	-26.5	89.9	63.4	-12.2	42.6	30.4	tRNA methyltransferase 1
Pnpla6	15.2	29.9	45.1	10.3	33.7	44.0	patatin-like phospholipase domain containing 6
Trmt1	42.7	20.9	63.5	23.9	39.4	63.3	tRNA methyltransferase 1
Grk6	-14.3	75.5	61.3	-19.7	82.0	62.3	G protein-coupled receptor kinase 6
Lsm14b	-27.8	91.2	63.4	-23.0	91.4	68.4	LSM14 homolog B (SCD6, S. cerevisiae)
Fam114a2	14.9	71.1	86.0	18.0	69.7	87.7	family with sequence similarity 114, member A2
Wiz	19.8	53.7	73.5	13.1	62.0	75.1	widely-interspaced zinc finger motifs
Eml4	-29.5	74.1	44.6	-23.7	69.6	45.9	echinoderm microtubule associated protein like 4
Wnk1	14.6	56.0	70.6	27.9	41.9	69.9	WNK lysine deficient protein kinase 1
Oard1	-29.7	72.8	43.1	-10.2	53.1	43.0	O-acyl-ADP-ribose deacylase 1
Ap1g1	-16.3	45.1	28.8	-23.2	56.9	33.7	adaptor protein complex AP-1, gamma 1 subunit
Slu7	-17.6	49.9	32.3	-13.8	53.7	39.9	SLU7 splicing factor homolog (S. cerevisiae)
Wiz	10.2	70.4	80.6	14.2	69.1	83.3	widely-interspaced zinc finger motifs
Pnpla6	-20.7	53.4	32.7	-16.0	52.4	36.4	patatin-like phospholipase domain containing 6
Neur14	-21.9	78.3	56.4	-15.2	74.7	59.5	neuronalized homolog 4 (Drosophila)
Psmg3	10.7	55.9	66.6	21.7	52.5	74.1	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 3
Anapc11	-11.7	77.3	65.7	-17.2	71.8	54.5	anaphase promoting complex subunit 11
Reps1	14.7	53.5	68.2	18.7	50.4	69.0	RalBP1 associated Eps domain containing protein
Thoc2	-10.7	31.9	21.2	-10.9	31.4	20.5	THO complex 2
Ndel1	22.2	28.0	50.3	12.3	37.0	49.3	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)
Dgkd	-10.8	90.3	79.5	-14.6	94.4	79.8	diacylglycerol kinase, delta
Laptm5	-21.6	36.5	14.9	-17.6	36.5	18.9	lysosomal-associated protein transmembrane 5
Prkar1a	14.1	27.1	41.2	32.3	19.9	52.2	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha
Rsrc2	-24.9	87.6	62.7	-11.7	85.5	73.8	arginine/serine-rich coiled-coil 2
1110057K04Rik	-19.9	48.3	28.4	-11.7	38.6	26.9	RIKEN cDNA 1110057K04 gene
Stxbp2	15.9	5.7	21.6	12.2	7.6	19.8	syntaxin binding protein 2
Eif4enif1	17.4	17.7	35.1	23.1	11.5	34.7	eukaryotic translation initiation factor 4E nuclear import factor 1
Tjap1	-37.7	98.5	60.8	-23.3	67.8	44.5	tight junction associated protein 1
Abl2	12.3	50.7	63.0	20.7	51.4	72.1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene 2
Sh3bp5l	12.8	20.8	33.6	19.2	6.8	26.0	SH3 binding domain protein 5 like
Pja1	11.7	30.7	42.4	17.1	25.9	43.0	
Zfp692	22.2	48.7	70.8	21.3	53.2	74.5	zinc finger protein 692
Trim26	-22.0	77.7	55.8	-13.2	80.0	66.8	tripartite motif-containing 26
Brpf1	11.8	27.1	38.9	15.9	34.0	49.9	bromodomain and PHD finger containing, 1
Exoc1	14.1	35.0	49.1	24.9	13.9	38.8	exocyst complex component 1
Zfp740	-11.3	81.7	70.4	-12.4	83.2	70.8	zinc finger protein 740
Tsc2	25.0	32.1	57.1	16.4	45.7	62.1	tuberous sclerosis 2
Fgfr1op2	-12.8	62.4	49.6	-14.9	68.0	53.1	FGFR1 oncogene partner 2

Tableau II. Liste des 60 isoformes épissés de manière différentielle en fonction de l'activité ERK1.

Tableau résumant la liste des 60 isoformes épissés de manière différentielle après expression de ERK1 pour les deux clones (89 et 99) de cellules ES ERK1/2 DKO. Le PSI correspond au pourcentage d'expression de l'isoforme long par rapport à la somme des deux isoformes analysés pour chaque gène. La colonne delta correspond à la différence de PSI entre la forme DKO et celle exprimant ERK1.

Cette liste de 60 gènes a été générée à partir de l'analyse préliminaire de plus de treize mille évènements d'épissage distincts. Plusieurs critères ont été appliqués afin de cerner les évènements les plus significatifs. Premièrement, seulement 3506 évènements du nombre total suggèrent une augmentation ou une diminution du Delta PSI de même nature chez les deux clones. De ce chiffre, 436 évènements d'épissage varient de plus de 10% PSI entre les deux conditions, et finalement une liste finale de 60 évènements est générée après application du critère de confiance TPM, mesure de qualité qui prend en compte le nombre de lectures ainsi que l'écart type à la moyenne. Ainsi, pour chaque gène illustré au tableau II, celui-ci est épissé de manière différentielle de plus de 10% lorsque ERK1 est exprimé et ce de manière similaire pour les deux clones.

Le type d'évènement d'épissage ainsi que l'exon/intron exclu a été analysé pour chacun de ces candidats. L'épissage de plusieurs de ces gènes, notamment Morf412 et USP1, correspond notamment à l'excision d'une séquence dans la région non-traduite en 5' ou en 3' (Tableau II). Ainsi, ces évènements sont moins potentiellement intéressants que ceux présentant des isoformes de protéines distinctes. De surcroit, certains de ces évènements concernent l'épissage d'aussi peu que 3 paires de bases dans certains cas, formant une protéine dont un seul acide aminé est manquant. Ces cibles, de pair avec les isoformes dont aucune fonction connue n'a été décrite à ce jour, n'ont pas été priorisées dans nos analyses. Quelques évènements d'épissage de cette liste suggèrent cependant des isoformes dont la fonction est potentiellement altérée et parfois même bien décrite de la littérature.

3.2.2 DNMT3b

Un premier candidat de notre analyse est l'épissage du transcrit de DNMT3b. L'expression du gène augmente de près de 6 fois lorsque ERK1 est exprimé dans le modèle de cellules ES ERK1/2 DKO, et la proportion de l'isoforme long sur la somme des deux passe d'environ 70% à plus de 80% (Tableau III). Concrètement, ceci se traduit par une hausse importante de l'expression de l'isoforme long. L'épissage du transcrit de ce gène s'applique à une cassette de 189 paires de bases couvrant les exons 22 et 23 codant la portion catalytique de l'enzyme.

Expression totale du gène DNMT3b											
Clone 89					Clone 99						
Log ERK1	DKO TPM	ERK1 TPM	E.T. relatif		Log ERK1	DKO TPM	ERK1 TPM	E.T. relatif			
2.6	108.53	648.3	12.8		2.4	97.89	506.3	6.5			
Épissage alternatif de DNMT3b											
Clone 89					Clone 99						
Delta PSI	PSI DKO	PSI ERK1	E.T.	Score TPM	Delta PSI	PSI DKO	PSI ERK1	E.T.	Score TPM	Type	Taille
+ 11.5	73.3	84.8	0.7	513.4	+ 11.0	68.5	79.5	1.7	404.2	Cassette multi-exon	189 PBs

Tableau III. DNMT3b dans l'analyse du séquençage d'ARN à haut-débit.

Expression de l'ARNm de DNMT3b dans les conditions DKO et après expression de ERK1 pour les deux clones (89 et 99) de cellules ES ERK1/2 DKO. L'expression du gène est calculée en transcrits par million (TPM), E.T est l'écart type à la moyenne.

À partir de l'ARNm isolé des deux conditions dans le clone 99, nous avons généré une banque d'ADNc et effectué une PCR à partir d'oligonucléotides flanquant la région où l'épissage survient. Considérant que les séquences épissées pour plusieurs des événements d'épissages auxquels nous nous intéressons sont courtes, il a été impossible d'élaborer une expérience de PCR quantitative en temps réel permettant de comparer avec précision l'expression distincte des différents isoformes. En conséquence, la validation des données transcriptomiques quant à ces isoformes par PCR est plus qualitative que quantitative.

Néanmoins, bien que les résultats de cette expérience varient de manière importante entre les différents essais, nous avons tout de même observé une augmentation constante bien que non significative dans l'expression de l'isoforme long lorsque ERK1 est exprimé dans ce modèle (figure 3-2).

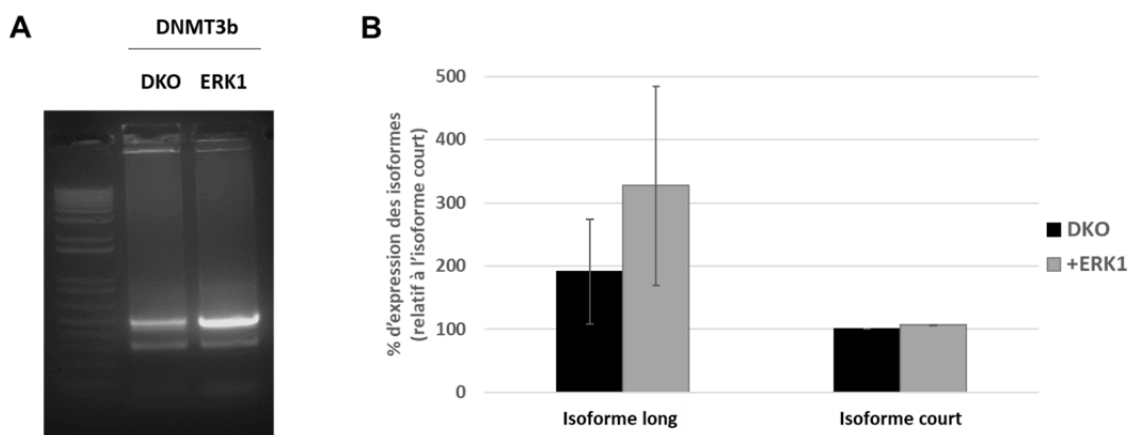


Figure 3-2 **Validation par PCR des isoformes court et long de DNMT3b**

Une banque d'ADNc a été générée à partir de l'ARNm isolé de cellules ES ERK1/2 DKO (clone 99) par RT-PCR. (A) Une PCR a été effectuée à partir de l'ADNc ainsi qu'une paire d'amorces englobant la portion épissée du transcrite et déposée sur gel d'agarose. (B) Quantification des isoformes de trois expériences indépendantes.

Nous nous sommes ensuite questionnés sur l'expression des isoformes de DNMT3b dans d'autres lignées cellulaires ainsi que la possibilité qu'une activité de la voie MAP Kinase puisse induire les changements d'isoformes observées dans la lignée ES ERK1/2 DKO. Nous avons ainsi exprimé une forme mutante constitutivement active de HA-MEK1(S218D/S222D) (HA-MEKDD) dans plusieurs lignées murines et humaines et traitées ces dernières avec soit le DMSO ou un inhibiteur spécifique de MEK, le PD184352 (figure 3-3). Dans cette expérience, nous observons que l'isoforme prédominant dans une majorité de lignées cellulaires différenciées est l'isoforme court ne possédant pas d'activité catalytique, DNMT3b3. Ceci va de pair avec la littérature qui suggère qu'après une forte activité de DNMT3b lors du processus de différenciation, la majorité des événements de méthylation prenant place dans les

cellules somatiques est liée à la conservation des patrons de méthylation déjà existants par l'enzyme DNMT1 (661, 662). L'activité de ERK1/2 ne semble pas ainsi induire une diminution de l'épissage de ces exons dans ces conditions, où la forme catalytiquement inactive est dominante.

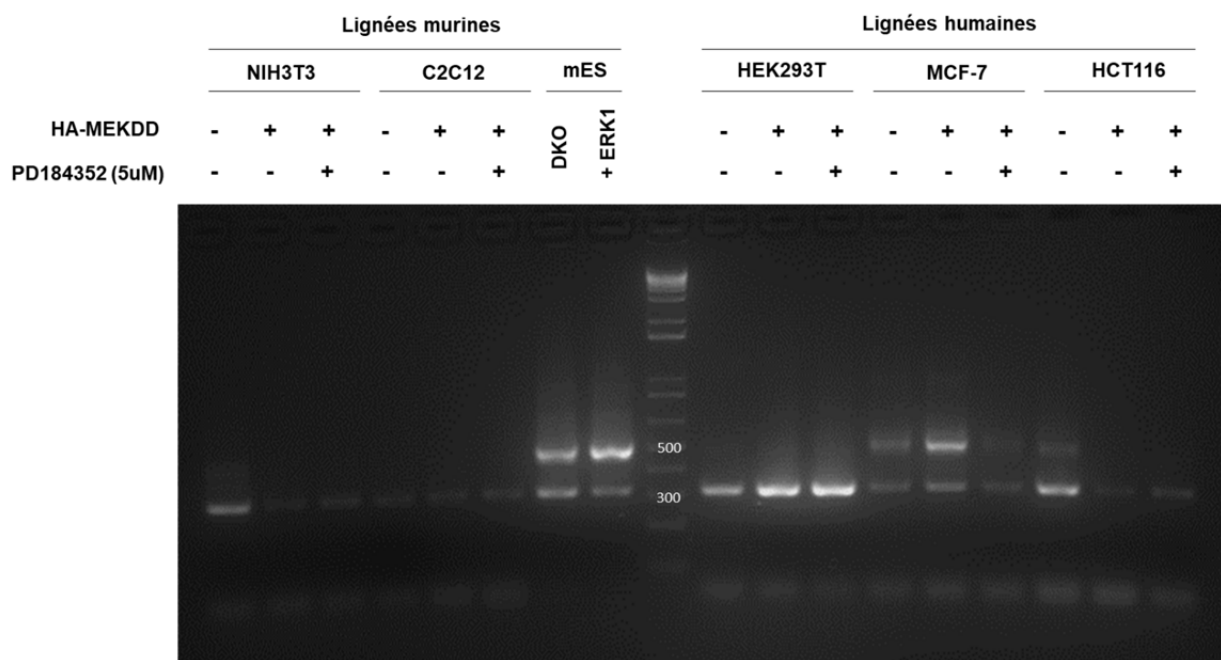


Figure 3-3 **Expression des isoformes longs et courts de DNMT3b dans plusieurs lignées cellulaires**

Une banque d'ADNc a été générée à partir de l'ARNm isolé de plusieurs lignées cellulaires exprimant ou un plasmide contrôle ou le plasmide HA-MEK1 DD et traité à 5uM PD184352, ou les cellules ES ERK1/2 DKO (clone 99) par RT-PCR. Une PCR a ensuite été effectuée à partir de l'ADNc ainsi qu'une paire d'amorces englobant la portion épissée du transcrite de DNMT3b et son produit a été déposé sur gel d'agarose. Cette expérience a été effectuée à deux reprises.

L'isoforme long de DNMT3b a cependant été détecté dans la lignée de cancer du sein humaine MCF-7. Une activation de la voie MAP Kinase dans cette lignée induit de plus une augmentation faible de la forme courte mais surtout une augmentation importante de la forme longue, qui est bloquée par l'utilisation d'un inhibiteur de MEK1. L'effet d'une activité de la

voie MAP Kinase dans cette lignée est ainsi similaire à celui provoqué par l'expression de ERK1 dans un modèle de cellules souches.

4.2.3 CTNND1

Un autre gène intéressant issu de cette analyse est la delta-caténine, aussi connue sous le nom de p120-caténine. Effectivement, l'expression de ce gène n'est pas modulée en réponse à l'expression de ERK1, mais on observe une augmentation significative de l'épissage d'un exon de 18 paires de bases (Tableau IV). L'analyse de cet exon révèle que ce dernier couvre en fait la portion codant pour le signal de localisation nucléaire (NLS) de la protéine.

Expression totale du gène CTNND1											
Clone 89					Clone 99						
Log ERK1	DKO TPM	ERK1 TPM	E.T. relatif		Log ERK1	DKO TPM	ERK1 TPM	E.T. relatif			
-0.2	140.51	119.7	3.0		-0.3	138.71	110.6	5.0			
Épissage alternatif de CTNND1											
Clone 89					Clone 99						
Delta PSI	PSI DKO	PSI ERK1	E.T.	Score TPM	Delta PSI	PSI DKO	PSI ERK1	E.T.	Score TPM	Type	Taille
-12.0	57.1	45.1	3.9	123.7	-10.0	58.1	48.1	5.3	117.0	Cassette-exon + retention intron	18 PBs

Tableau IV. CTNND1 dans l'analyse du séquençage d'ARN à haut-débit.

Expression de l'ARNm de CTNND1 dans les conditions DKO et après expression de ERK1 pour les deux clones (89 et 99) de cellules ES ERK1/2 DKO. L'expression du gène est calculée en transcrits par million (TPM), E.T est l'écart type à la moyenne.

Similairement à DNMT3b, la modulation de l'épissage causée par l'expression de ERK1 dans les cellules ES ERK1/2 DKO a été validée par PCR en utilisant des amorces couvrant la région épissée provenant d'une banque d'ADNc générée à partir du clone 99. Puisque la séquence épissée est trop courte pour pouvoir clairement distinguer les deux isoformes sur gel d'agarose, deux paires d'amorces ont été utilisées afin d'amplifier l'isoforme long seulement ou la somme des deux (Figure 3-4). Nous avons ainsi pu valider par RT-PCR

les résultats observés dans l'analyse transcriptomique à la fois pour la delta-caténine et DNMT3b.

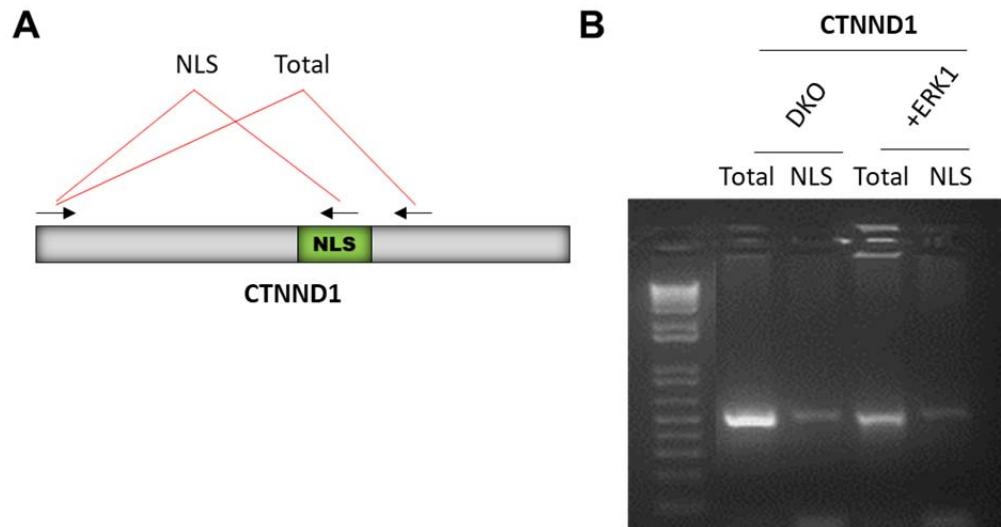


Figure 3-4 **Validation par PCR des isoformes court et long de CTNND1**

Une banque d'ADNc a été générée à partir de l'ARNm isolé de cellules ES ERK1/2 DKO (clone 99) par RT-PCR. (A) Représentation des deux paires d'amorces utilisées pour discriminer les isoformes de CTNND1. (B) Une PCR a été effectuée à partir de l'ADNc ainsi qu'une paire d'amorces englobant la portion épissée du transcrite et déposée sur gel d'agarose. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

À partir de l'ARNm isolé des clones 89 et 99, près de la moitié des changements d'épissage issu de notre analyse RNAseq ont aussi été validés lorsque possible par électrophorèse microcapillaire quantitative. Effectivement, bien que cette méthode de détection soit plus sensible et quantitative que la PCR traditionnelle, certains des changements d'épissage de notre liste de gènes concernent des séquences de quelques acides nucléiques seulement, rendant leur détection inadéquate. Nous avons donc testé 40 des 60 évènements d'épissages correspondant à ceux possédant une séquence épissée suffisamment longue pour être discriminée. Pour plus de la moitié de ceux-ci, les résultats issus de l'analyse RNAseq ont pu être validés par cette méthode (Figure 3-5). Les variations d'expression des isoformes de CTNND1 ont ainsi notamment été validé par cette méthode.

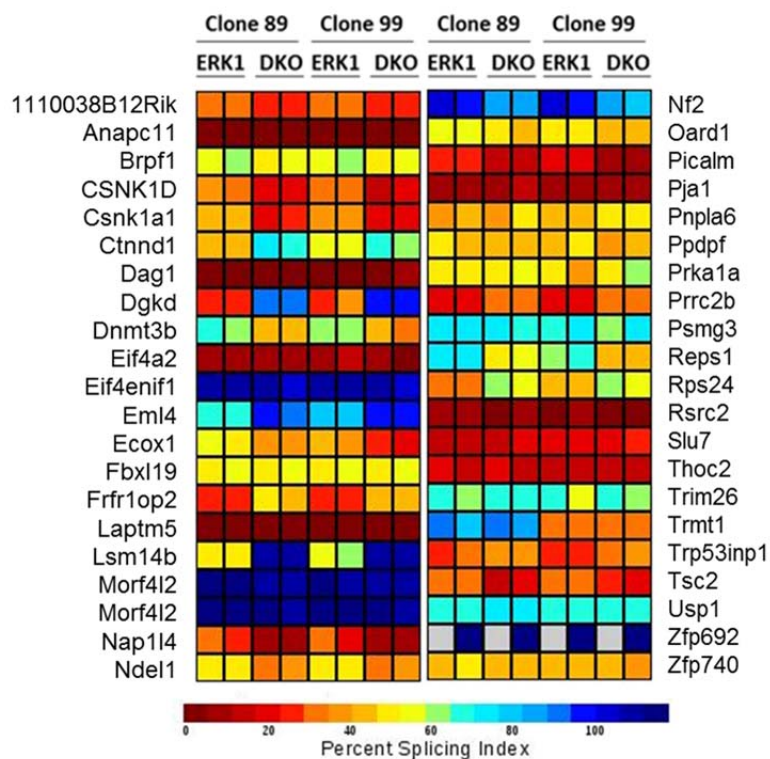


Figure 3-5 Validation des changements d'épissage suivant expression d'ERK1 par électrophorèse capillaire quantitative

Les régions correspondant aux séquences épissées pour chaque gène ont été amplifiées par RT-PCR et mesurées par électrophorèse capillaire sur une station Caliper de la plateforme RNomique de l'université de Sherbrooke. Chaque échantillon est analysé en duplicata pour chaque condition et chaque clone. 20 des 60 gènes de la liste d'origine n'ont pas pu être analysés en raison de séquences exoniques épissées trop petites.

3.2.4 Identification de MBNL2 comme substrat de ERK1/2

L'impact fonctionnel d'une expression des kinases ERK1/2 sur l'épissage d'une panoplie de gènes, et de manière plus générale dans le processus de différenciation, a maintenant été décrit et analysé aux sections précédentes. Cependant, le mécanisme par lequel ERK1/2 induit ces changements reste inconnu, et les facteurs d'épissage en amont des

événements d'épissage observés le sont tout autant. Afin d'élucider ces mécanismes, comme point de départ, nous nous sommes ainsi intéressés aux facteurs d'épissage connus pour avoir un rôle clé dans la différenciation, et plus particulièrement ceux intervenant tôt dans le processus et de manière globale. Parmi ceux-ci viennent les protéines MBNL1 et MBNL2 en tête de liste, dont l'activité régule un programme précoce d'épissage de gènes impliqués directement dans l'état d'auto-renouvellement ou de différenciation (663). Le groupe de Ben Blencowe a entre-autre démontré que MBNL1/2 intervient dans l'épissage alternatif de FOXP1, dont les deux isoformes ont des fonctions opposées dans la différenciation (515). Ces facteurs d'épissages sont d'autant plus intéressants que certaines cibles connues pour être régulées par ces dernières sont épissées de manière différentielle dans notre étude. Effectivement, une étude effectuée dans un modèle de muscle squelettique murin montre qu'une inhibition de l'expression de MBNL1 module notamment le patron d'épissage de *Picalm*, *Fgfr1op2* et *Trp53inp1* (664). Ceux-ci font effectivement parti de la liste de gènes dont l'épissage alternatif a été observé dans notre analyse transcriptomique suite à l'expression de ERK1, puis validé par électrophorèse capillaire. Ceci soulève l'hypothèse que ces facteurs d'épissage pourraient contribuer aux événements que nous observons en réponse à une activité de ERK1 lors de la différenciation des cellules ES.

Les données de séquençage d'ARN à haut-débit indiquent cependant que l'expression de ces protéines n'est pas modulée en réponse à l'expression de ERK1 dans notre modèle de cellules ES ERK1/2 DKO. À défaut de voir une différence d'expression et considérant l'hypothèse que ERK1/2 régule l'activité de ces dernières, nous nous sommes demandé si ces protéines ne pourraient pas plutôt être des substrats de ERK1/2. La littérature suggère que MBNL1 et MBNL2 ont des rôles ainsi qu'une séquence de reconnaissance de l'ARN similaire (665). Cependant, MBNL1 ne possède qu'une seule séquence P-X-S/T-P alors que MBNL2 en possède 4, ce qui en fait une meilleure cible potentielle à priori. Nous avons ainsi cloné MBNL2 dans un vecteur d'expression procaryote pGEX-KG et généré une protéine recombinante purifiée afin d'effectuer un essai kinase *in vitro* en présence de ERK1 recombinant actif.

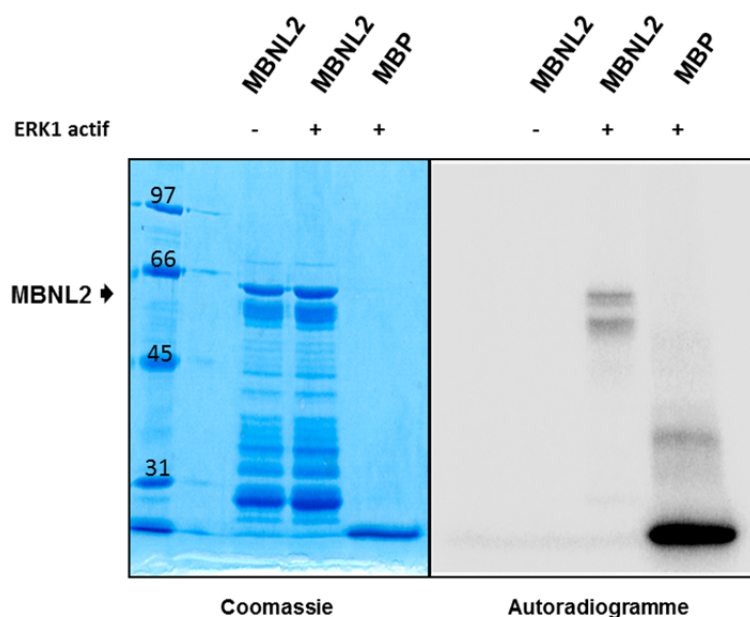


Figure 3-6 **Phosphorylation *in vitro* de MBNL2 par ERK1/2**

Essai kinase *in vitro* du facteur d'épissage MBNL2 en présence de 50 μ M d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 recombinante active. La protéine MBP a été utilisée comme contrôle positif pour l'activité d'ERK1. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

Le résultat de la figure 3-6 suggère que MBNL2 est effectivement un substrat de ERK1 *in vitro*. Des expériences de mutagenèse dirigée ainsi que de spectrométrie de masse pourront révéler le site exact de cette phosphorylation. Si ce motif de phosphorylation est conservé chez l'homologue MBNL1, il sera pertinent de vérifier si ERK1 phosphoryle aussi cette protéine. Finalement, cette phosphorylation devra être validée *in vivo*, et il sera pertinent de vérifier si cette phosphorylation de MBNL2 régule certains des événements d'épissages observés dans l'analyse PSI, notamment ses cibles connues mais aussi en particulier l'épissage de DNMT3b et CTNND1.

3.3 Discussion

3.3.1 L'épissage de DNMT3b est modulé en réponse à l'expression de ERK1/2

DNMT3b est l'une des deux enzymes ADN méthyltransférase *de novo* de notre organisme, de pair avec DNMT3a. La troisième enzyme de cette catégorie, DNMT1, est effectivement responsable en grande partie de la maintenance du statut de méthylation du génome (662). Il est connu qu'à l'état basal, la cellule souche embryonnaire possède un état de méthylation de l'ADN génomique très faible permettant l'expression opportune de gènes lors de la différenciation vers un type de feuillet embryonnaire (666). Cet état change drastiquement lorsque la cellule s'engage dans un destin cellulaire, alors que les gènes liés à l'auto-renouvellement ainsi que ceux relevant d'autres types cellulaires se retrouvent fortement inhibés, notamment par la méthylation à large spectre du génome (661).

Nous avons observé une hausse importante de l'expression totale de DNMT3b ainsi qu'une augmentation du ratio de l'isoforme possédant la portion catalytique de l'enzyme lorsque ERK1 est exprimé dans les cellules ES ERK1/2 DKO. Ceci concorde avec la théorie que l'un des évènements précoces dans la différenciation de ces cellules est la méthylation d'un large patron de gènes menant notamment à l'inhibition de l'expression de facteurs d'auto-renouvellement tels que NANOG, SOX2 et OCT4 (667, 668). Puisque l'expression de ces facteurs est en partie induite de manière synergétique de leur propre activité transcriptionnelle, la perte de méthylation du promoteur semble un élément essentiel à une transition de l'état basal vers l'état « amorcé » où le signal de différenciation se potentialise à son tour de manière irréversible. Pour DNMT3b, le changement d'épissage du gène faisant la promotion de l'isoforme catalytiquement actif est particulièrement intéressant puisque cet isoforme n'existe que peu ou pas dans les cellules différenciées. On observe ainsi une expression forte mais transitoire de cette forme pendant la différenciation (498, 669). Les cellules somatiques sont majoritairement exemptes de cet isoforme, ce qui suggère que la

fonction cellulaire normale est en grande majorité dépendante des mécanismes allostériques décrits entre DNMT3a, DNMT3b3 et DNMT3L pour effectuer la méthylation *de novo*, plutôt que de la fonction de l'enzyme DNMT3b active (670). Une première hypothèse du mécanisme selon lequel les MAP Kinases ERK1/2 induisent la différenciation via la régulation de l'épissage alternatif serait ainsi via la promotion de l'isoforme long de DNMT3b, menant potentiellement à une méthylation du promoteur de gènes liés à l'auto-renouvellement. Il est intéressant de noter qu'un tel mécanisme a été décrit concernant la protéine adaptatrice DNMT3L, qui est catalytiquement inactive mais qui régule de manière positive ce processus dans certains contextes cellulaires (671, 672).

L'impact d'un rôle de ERK1/2 dans l'épissage de DNMT3b dépasse cependant le cadre de la différenciation cellulaire des cellules souches. L'expression aberrante de plusieurs isoformes de DNMT3b, incluant ceux possédant la région catalytique, est aussi observée dans de nombreux cancers (669, 673). Une hypothèse quant à ce rôle concerne la répression de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs (674). De surcroît, l'inhibition de DNMT3b induit l'apoptose dans plusieurs lignées cancéreuses (675). En fait, il a même été suggéré que l'isoforme catalytiquement inactif agit à titre de dominant négatif, et que l'expression de la forme active confère un avantage sélectif à la tumeur (676, 677). Il est donc critique, d'une part, de comprendre le rôle régulateur de cet isoforme ainsi que les facteurs impliqués dans l'épissage des multiples produits de ce gène, et d'autre part d'identifier si ERK1/2 est impliqué dans ces mécanismes.

Une étude fait d'ailleurs état d'une expression aberrante de l'isoforme catalytiquement actif de DNMT3b dans plusieurs lignées de cancer du sein (675). Les résultats de cette étude suggèrent qu'un changement dans les ratios d'épissage favorisant cette forme conduit à une augmentation de la viabilité cellulaire. Ces auteurs ne posent cependant aucune hypothèse quant au mécanisme selon lequel l'épissage de ce gène est altéré dans le cancer. Il est donc intéressant que bien que les isoformes catalytiquement actifs soient absents dans la majorité des lignées somatiques normales, nous observons aussi leur expression dans la lignée de

cancer du sein humaine MCF-7. De plus, nos résultats indiquent qu'une activité de la voie MAP Kinase induit une augmentation de l'expression de tous ces isoformes et en particulier de la forme catalytiquement active, suggérant potentiellement un nouveau mécanisme par lequel la voie MAP Kinase contribue à la tumorigénèse. Il importe donc de se demander quel facteur d'épissage est responsable de l'épissage alternatif de ce gène et comment ERK1/2 y contribue.

3.3.2 L'épissage de CTNND1 est modulé en réponse à l'expression de ERK1/2

L'expression de ERK1 dans les cellules ES ERK1/2 DKO provoque aussi une augmentation de l'épissage du transcrite de delta-caténine, menant à une augmentation de la proportion de l'isoforme dont le NLS est excisé. Cet isoforme a par ailleurs déjà été décrit précédemment, et l'exclusion nucléaire de cette protéine lorsque le NLS est absent a été observé (678). En fait, jusqu'à 32 isoformes issus de l'épissage alternatif du transcrite primaire de la delta-caténine ont été observés (679). Une panoplie de rôles ont subséquemment été décrits et continuent de l'être à ce jour pour certains de ces isoformes tant dans les cellules somatiques normales que dans les cellules cancéreuses (680-682). Par exemple, l'isoforme 3 de p120, dont l'exon épissé code une séquence NES au sein de la protéine, s'accumule au noyau de manière prédominante alors que l'isoforme 1 se localise plutôt au cytoplasme et à la membrane cellulaire (683, 684). Une expression aberrante du premier isoforme est observée dans plusieurs tumeurs métastatiques et son rôle est corrélé à la transition épithélio-mésenchymateuse (685).

De multiples fonctions décrites pour la delta-caténine sont aussi dépendantes de son activité nucléaire. Effectivement, un des partenaires d'interaction de delta-caténine est le répresseur transcriptionnel Kaiso (686). Il a été démontré que cette liaison déstabilise la capacité de Kaiso à lier ses séquences cibles d'ADN et d'effectuer sa fonction inhibitrice sur

ses gènes cibles (687, 688). Parmi ces gènes se retrouvent plusieurs acteurs importants du processus de différenciation, notamment la beta-caténine, un effecteur de la voie Wnt canonique (689). Conséquemment, une diminution de la localisation de delta-caténine au noyau peut corrélérer avec une diminution de l'expression de gènes dont le promoteur est sous le contrôle du répresseur transcriptionnel Kaiso.

Une étude publiée en 2014 rapporte cependant un autre rôle important de la delta-caténine dans la différenciation des cellules souches embryonnaires murines (690). À l'état basal souche, le répresseur transcriptionnel REST ainsi que la protéine d'échafaudage Rcor1 forment un complexe qui inhibe l'expression de gènes impliqués dans la différenciation de cellules souches embryonnaires vers un destin cellulaire de type neuronal, ainsi que certains gènes liés à l'auto-renouvellement. Selon cette étude, delta-caténine actif peut cependant migrer au noyau et lier ce complexe afin de lever l'inhibition de ces gènes et induire leur expression. Dans ce contexte, il est possible que l'augmentation de l'épissage de ce gène suite à l'expression d'ERK1 mène à une diminution de la proportion de delta-caténine pouvant migrer au noyau et, en conséquence, lier cet inhibiteur transcriptionnel. Des travaux subséquents ont cependant montré que la perte de delta-caténine n'est pas un élément critique à l'embryogénèse et que seulement quelques défauts mineurs de différenciation surviennent dans un modèle de cellules ES, suggérant que cette protéine n'occupe pas un rôle de premier plan dans le maintien de l'auto-renouvellement ou dans les étapes précoces de la différenciation embryonnaire (691).

3.3.3 Identification de facteurs d'épissage régulés par ERK1/2 impliqués dans la différenciation des cellules souches

La régulation du processus d'épissage alternatif par les voies de signalisation est encore peu explorée à ce jour. Bien que de nombreuses séquences d'ARNm reconnues par certains facteurs d'épissages commencent à être cartographiées, nous sommes encore bien loin d'un portrait global quant à la régulation de l'épissage en réponse à des changements

d'expression. Plusieurs études supportent pourtant l'idée que la régulation de l'épissage est sujette à une fine régulation post-traductionnelle dépendante des voies de signalisation, dont l'action est rapide et n'est pas dépendante de la synthèse de nouveaux facteurs d'épissage (revu dans (692-694). Parmi les changements d'épissage observés dans l'analyse du séquençage de l'ARN à haut débit, peu sont documentés moléculairement et on ignore quels sont les facteurs d'épissage responsable de leur régulation.

Quelques études suggèrent cependant un rôle important de certains de ces facteurs dans la différenciation des cellules souches embryonnaires. Parmi celles-ci, les travaux du groupe de Benjamin Blencowe ont illustré l'importance de MBNL1/2 dans l'induction d'un vaste programme d'épissage alternatif menant à une signature de différenciation. L'activité de MBNL1/2 induit notamment l'épissage du facteur de transcription FOXP1 menant à l'expression de l'isoforme FOXP1-ES. Alors que la forme longue de FOXP1 stimule l'expression de gènes liés à l'auto-renouvellement dont NANOG et OCT4 tout en inhibant l'expression de marqueurs de différenciation, l'isoforme court FOXP1-ES possède une spécificité de liaison différente à l'ADN et occupe une fonction opposée (515).

L'expression de MBNL1/2 n'est pas modulée en réponse à l'expression de ERK1 dans notre modèle de cellules ES ERK1/2 DKO. De plus, nous n'observons pas de différences significatives dans l'épissage de FOXP1, suggérant que le mécanisme proposé précédemment n'intervient pas dans la même fenêtre de temps que nos observations suivant la différenciation des cellules induite par l'expression de ERK1. Il n'est toutefois pas exclu à ce jour qu'une activité MAP Kinase soit responsable en partie de l'épissage de FOXP1 par MBNL. Effectivement, nous avons identifié MBNL2 comme substrat *in vitro* de ERK1. Considérant que l'activité de MBNL1/2 est nécessaire au contrôle du programme d'épissage alternatif faisant la promotion de l'auto-renouvellement des cellules souches, une baisse de l'activité de ces facteurs d'épissage vis-à-vis ses cibles pourrait avoir un impact aussi important qu'une diminution de leur expression. Considérant la possibilité que la phosphorylation de MBNL par ERK1/2 puisse moduler son activité, une seconde hypothèse concernant le mécanisme par

lequel les MAP Kinases ERK1/2 induisent la différenciation via la régulation de l'épissage alternatif serait que la phosphorylation de ce facteur d'épissage inhibe son activité. Ceci mènerait conséquemment à une augmentation de l'expression d'isoformes impliqués dans la différenciation et à une diminution des isoformes impliqués dans l'auto-renouvellement.

Outre MBNL1/2, d'autres facteurs d'épissage ont été décrits pour avoir des rôles clés dans la différenciation. Les RBP de la famille RBFOX ainsi que Polypyrimidine Tract Binding Protein (PTBP) ont notamment été identifiés comme des régulateurs d'épissage importants dans la différenciation des cellules souches embryonnaires (663, 695, 696). Similairement à MBNL1/2, puisque l'expression de ces facteurs n'est pas modulée en réponse à l'expression de ERK1 dans notre modèle de cellules souche embryonnaires, il sera intéressant de vérifier si certains de ces facteurs sont des substrats de ERK1/2.

Chapitre 4 : La beta-caténine est un nouveau substrat des kinases MEK1/2

4.1 Mise en contexte du projet

Parmi les protéines identifiées comme nouveaux substrats candidats des MAP Kinases ERK1/2 issues de notre étude phosphoprotéomique publiée en 2013, la beta-caténine se détache du lot par son importance dans de nombreuses pathologies dont le cancer colorectal. L'activation des voies MAP Kinase et Wnt/beta-caténine est effectivement une marque distinctive d'une majorité de tumeurs. Plusieurs mécanismes de signalisation croisée ont par ailleurs été décrits entre ces deux voies qui coopèrent à la régulation de nombreux processus cellulaires. Cependant, la possibilité d'une phosphorylation directe de la beta-caténine par un membre de la voie MAP Kinase prend une toute autre importance lorsque l'on considère l'existence d'un phospho-dégron dans la portion N-terminale de la protéine. Effectivement, plusieurs résidus peuvent être phosphorylés par les composantes du complexe de destruction de la beta-caténine, qui sera subséquemment ubiquitinée et marquée pour dégradation par le protéasome. La stabilité de cette protéine est un élément clé de sa fonction signalétique et de ses rôles transcriptionnels.

Des travaux préliminaires effectués par Christophe Frémin, un stagiaire postdoctoral du laboratoire, suggèrent néanmoins que la beta-caténine n'est pas un substrat de ERK1/2 *in vitro*. Considérant que des substrats alternatifs de MEK1/2 ont déjà été décrits et que la stratégie de notre étude phosphoprotéomique se base sur l'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/2, on ne peut pas exclure la possibilité que certaines cibles identifiées soient des substrats de MEK1/2 plutôt que ERK1/2. Entre-autres, une récente publication dans la revue Cell suggère que MEK1/2 phosphoryle le facteur de transcription HSF1 sur la sérine 326, résidu dont le motif de phosphorylation diffère de celui retrouvé à la surface de ERK1/2 (281).

Nous avons ainsi testé l'hypothèse que la beta-caténine soit un substrat de MEK1/2 et non de ERK1/2.

4.2 Approche méthodologique

Matériel et méthodes

Plasmides et anticorps

Les plasmides encodant les gènes humains pCMV5b-myc- β -caténine et pCDNA3- β -caténine ont été données généreusement par Dr David Lohner et Dr. Daniel Dufort, respectivement. Le plasmide pGEX-KG- β -caténine a été généré par clonage du gène humain de la beta-caténine en XbaI/XbaI. Les constructions HA-MEK1 WT, HA-MEK2 WT et le mutant constitutivement actif HA-MEK1(S218D/S222D) ont été décrits précédemment (697, 698). Les plasmides encodant pGEX-KG-ERK1 et pGEX-KG-ERK2 ont été décrit précédemment (699). Le mutant ERK2 KD a été généré par la mutation K101E dans le vecteur pGEX-KG-ERK2. Le plasmide pCDNA3-gamma-catenin a été donné généreusement par Eric Fearon (plasmide Addgene #16827) et cloné dans pGEX-KG en EcoRI/XhoI.

Les anticorps contre Hsc70 (SC-7298), c-myc 9E10 (SC-40), et HA Y-11 (SC-805) proviennent de Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps contre phospho-ERK1/2 monoclonal (Thr202/Tyr204) (#9106), ERK1/2 polyclonal (#9102) et gamma-caténine polyclonal (#2309) proviennent de Cell Signaling Technologies. Les anticorps monoclonaux dirigés contre MEK2 (#610236) et beta-caténine (#610154) proviennent de BD Transduction Laboratories. L'anticorps monoclonal dirigé contre MEK1 provient d'Abcam (ab32091).

Production de protéines recombinantes et essais kinase *in vitro*

Les protéines recombinantes GST- β -caténine, GST- γ -caténine, GST-ERK1 WT et GST-ERK2 KD furent produites par induction à 50 mM d'IPTG dans *E. coli* pendant 18 heures à 25°C. Les cellules sont lysées à -80°C dans le tampon de lyse constitué de PBS 1X, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% triton ainsi que des inhibiteurs de protéases (Leupeptine, PMSF, pepstatine), puis soniquées pendant 3x 30 secondes. La purification des protéines recombinantes est effectuée sur billes glutathione-Sepharose (GE Healthcare) pendant 18 heures à 4°C, puis validée sur gel SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie.

Pour les essais kinase, les protéines recombinantes ont été incubées dans le tampon kinase (20 mM Tris-HCl, pH. 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂) en présence d'ATP 50 μ M, 5 μ Ci [γ -³²P]ATP ainsi que 30 ng d'enzyme ERK1 recombinant actif (Millipore), 0.5 U d'enzyme MEK1 (S218D, S222D) recombinant actif (Jena Bioscience) ou 0.5 U d'enzyme MEK1 WT recombinant actif (phosphorylé par Raf et purifié, Millipore). La réaction a été effectuée sous agitation pendant 30 minutes à 30°C. Les produits réactionnels ont été déposés sur un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie et analysés par autoradiographie.

Culture cellulaire et traitements

Les cellules HEK293T ont été obtenues de American Tissue Culture Collection et cultivées à 37°C dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS), de la streptomycine ainsi que de pénicilline. La transfection transitoire de ces cellules a été effectuée avec le polyéthylèneimine (PEI). L'inhibiteur de ERK1/2 SCH772984 a été acheté chez Chemietek et utilisé à une concentration finale de 2.5 μ M dans toutes les expériences. L'inhibiteur de MEK1/2 PD184352 est un cadeau généreux de Pfizer, et est utilisé à une concentration finale de 5 μ M. Le cycloheximide a été acheté chez Sigma-Aldrich et est utilisé à une concentration de 50 μ M pour une durée maximale de 8 heures. L'inhibiteur du protéasome MG132 a été acheté chez UBPBio et est utilisé à une concentration finale de 10 μ M.

Essais rapporteur luciférase

Les cellules HEK293T ont été ensemencées dans des plaques 48-puits et transfectées au PEI avec un mélange équimolaire des plasmides indiqués. Après 48 heures, le milieu de culture est remplacé par le tampon firefly luciférase composé de 100 mM Tris-acétate, 20 mM Mg-Acétate, 2 mM EGTA, 0,7% 2-mercaptoéthanol, 3,6 mM ATP et 4,5% luciférine. Après lecture du signal Firefly luciférase, 0,05% de Coelenterazine (NanoLight) est ajouté à la réaction afin de permettre la lecture de la Rénilla luciférase.

4.3 Résultats

4.3.1 Phosphorylation *in vitro* de la β -caténine par MEK1

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si ERK1/2 ou MEK1/2 sont capables de phosphoryler la beta-caténine *in vitro*. Pour ce faire, nous avons produit et purifié la protéine recombinante GST- β -caténine et effectué un essai kinase en utilisant les kinases actives recombinantes commerciales ERK1 et MEK1. Le gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie montre une bande à environ 120 kDa, qui correspond bien à la taille prédite de la protéine de fusion GST-beta-caténine, dont les poids sont de 26 kDa et 92 kDa, respectivement.

L'activité de ces kinases actives a pu être validée par la phosphorylation des contrôles MBP et ERK2 KD et nous assure que les enzymes sont actives dans notre essai. Nous observons ainsi que, conformément aux observations antérieures de notre groupe, la beta-

caténine n'est pas phosphorylée par ERK1 *in vitro* (Figure 4-1). Nous voyons cependant une forte bande phosphorylée apparaissant à la taille de beta-caténine lorsque incubée en présence de MEK1 actif. Ceci suggère que MEK1 phosphoryle beta-caténine *in vitro*, et non ERK1.

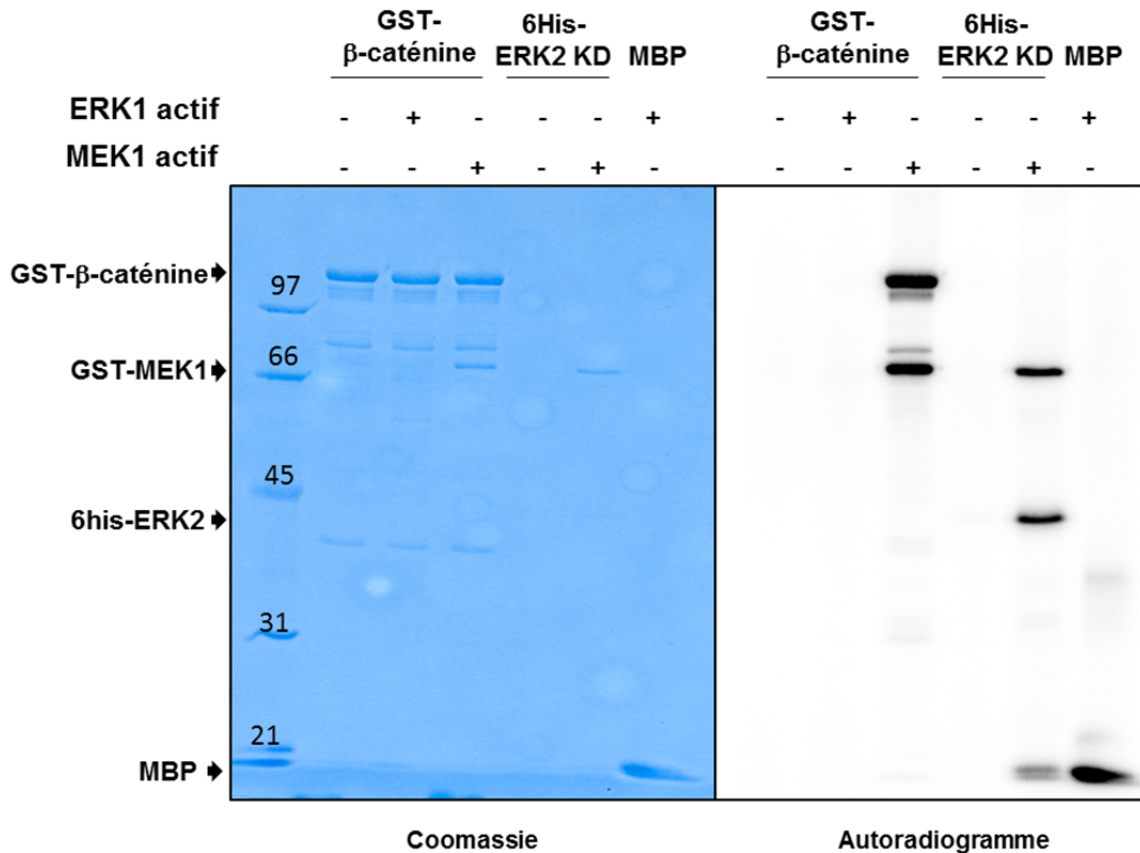


Figure 4-1 **Phosphorylation *in vitro* de beta-caténine par MEK1**

Essai kinase *in vitro* de la beta-caténine en présence de 50 uM d'ATP et 30 ng d'enzyme ERK1 recombinante active ou 0.5 U d'enzyme MEK1 recombinante active. MBP est utilisée comme contrôle pour l'activité enzymatique de ERK1, alors qu'une forme KD de ERK2 produite en bactérie est utilisée comme contrôle pour l'activité enzymatique de MEK1. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

Pour éliminer les risques d'erreur liés à l'utilisation d'une enzyme commerciale contaminée ou impure, nous avons répété cette expérience en utilisant MEK1 provenant de

deux sources commerciales différentes. La première provient de Jena Bioscience, et est issue de la purification de l'enzyme recombinante MEK1 (S218D/S222D) produite en bactérie. Celle-ci est constitutivement active par la mutation de deux résidus dans sa boucle d'activation. La seconde enzyme provient de Millipore et a été purifiée après production en bactéries similairement à l'autre formulation. La séquence de celle-ci est non-altérée cependant, et a été phosphorylée en présence de Raf actif avant d'être purifiée subséquemment afin d'être active. Dans les deux cas, on observe une forte phosphorylation de la beta-caténine ainsi que l'autophosphorylation de MEK1 (Figure 4-2).

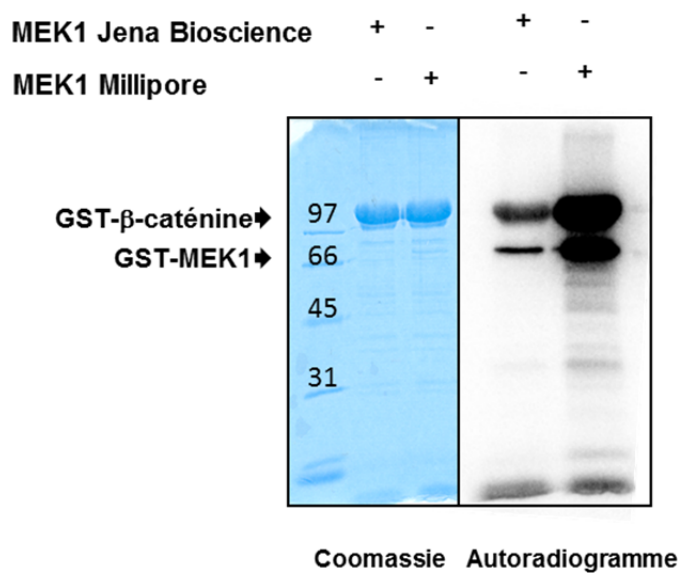


Figure 4-2 La beta-caténine est phosphorylée par MEK1 en provenance de deux sources commerciales distinctes

Essai kinase *in vitro* de la beta-caténine en présence de 50 uM d'ATP et 30 ng d'enzyme MEK1 recombinante active provenant de Jena Bioscience ou de MEK1 recombinante active provenant de Millipore. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

Nous nous sommes ensuite intéressés au(x) résidu(s) de phosphorylation potentiel(s). Puisque le motif de phosphorylation des MAP Kinases T-E-Y n'existe pas au sein de la beta-caténine, ceci suggère que MEK1/2 est capable de phosphorylation sur un motif différent dont on ignore les propriétés biochimiques. Nous avons effectué une analyse de spectrométrie de

masse afin d'identifier les résidus phosphorylés à la suite de l'essai kinase. Celle-ci a permis d'identifier la T102, la T472 et la S473 comme résidus potentiellement phosphorylés par MEK1 *in vitro* (Figure 4-3). Il est important de noter que l'identification des résidus 472 et 473 est fortuite puisque le peptide analysé par le spectromètre de masse dans cette expérience ne correspond pas à un peptide tryptique conventionnel, mais est plutôt issu d'une digestion incomplète de la protéine.

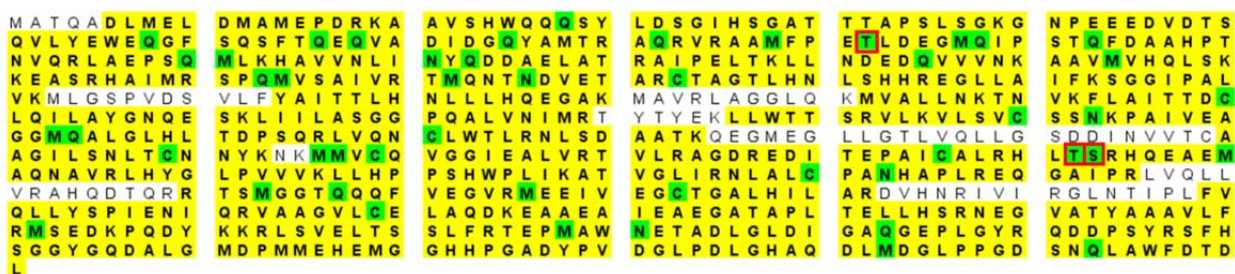


Figure 4-3 **Analyse protéomique de la phosphorylation *in vitro* de β-caténine par MEK1**

La couverture de l'analyse MS est affichée en jaune, alors que les résidus phosphorylés sont mis en évidence par un encadré rouge. Les résidus en vert possèdent une modification post-traductionnelle. Deux expériences indépendantes de spectrométrie de masse ont été réalisées.

L'analyse de nos données phosphoprotéomique dans les cellules IEC-6 et les MEFs révèlent deux résidus phosphorylés suivant l'induction de la voie MAP Kinase par le sérum : la sérine 191 et la sérine 552. Ceux-ci sont différents de ceux que nous avons identifiés *in vitro* et n'ont pas été observés dans cette expérience. En conséquence, nous avons généré des mutants pour tous ces résidus et effectué un essai kinase *in vitro* afin d'observer si une perte de signal est associée à la mutation de l'un d'entre-eux. Les résultats de cette expérience montrent que la mutation de la T472 diminue le signal d'environ 80% (figure 4-4). De plus, cette diminution n'est pas exacerbée par la mutation supplémentaire de la S473 ou de la S552, suggérant que le site de phosphorylation principal de MEK1 sur la β-caténine est bel et bien la thréonine 472. Une cible secondaire intéressante était effectivement la S473, dont la phosphorylation a été observée simultanément à la T472 par spectrométrie de masse. La

mutation de ce résidu ne démontre toutefois pas une diminution significative du signal de l'autoradiogramme.

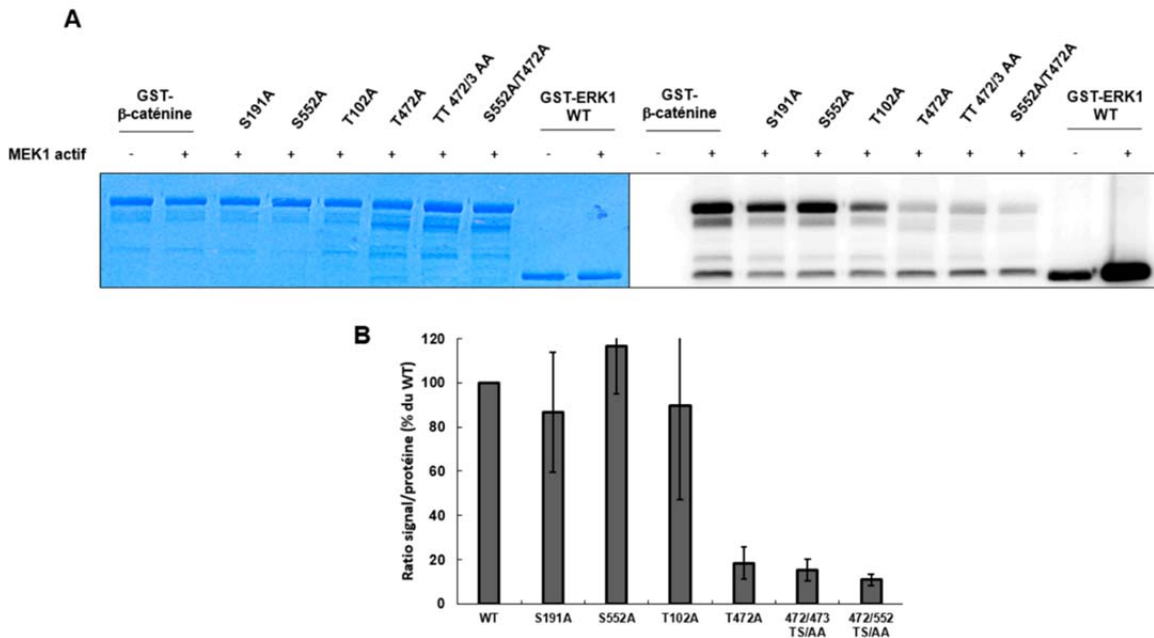


Figure 4-4 **Phosphorylation *in vitro* des mutants de la beta-caténine**

(A) Essai kinase *in vitro* de la beta-caténine WT ou mutante en présence de 50 μ M d'ATP et 30 ng d'enzyme MEK1 recombinante active provenant de Millipore. La protéine ERK1 WT produite en bactérie a été utilisée comme contrôle de l'activité de MEK1. (B) Quantification du signal de l'autoradiogramme, normalisé sur la quantité de protéines recombinantes. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type à la moyenne de trois expériences indépendantes.

Le motif de phosphorylation entourant la T472 varie significativement de celui observé chez ERK1/2, et n'a en commun qu'une leucine précédant la thréonine phosphorylée. Cette séquence est cependant bien conservée chez l'homologue de la beta-caténine, la gamma-caténine. Nous nous sommes ainsi questionnés à savoir si cette séquence au sein de la gamma-caténine était aussi phosphorylée par MEK1/2. Un étudiant à la maîtrise au laboratoire travaillant sous ma supervision, Vincent Poupart, a effectué un essai kinase sur la protéine recombinante produite en bactérie et testé directement la mutation du résidu équivalent en comparaison à la forme sauvage. Les résultats issus de ces expériences suggèrent que MEK1

phosphoryle γ -caténine à même titre que son homologue, et que la mutation de cette thréonine induit une perte du signal de plus de 75%.

4.3.2 Essais de phosphorylation cellulaires

Forts de l'identification d'un site de phosphorylation sur la beta-caténine par MEK1 *in vitro*, nous nous sommes ensuite questionnés sur l'existence de cet évènement de phosphorylation dans les cellules. Nous avons transfecté la lignée HEK293T d'un vecteur vide ou d'une construction exprimant la forme constitutivement active de MEK2, HA-MEK2-DD. Les cellules ont été récoltées puis analysées par immunobuvardage de type western. Une immunoprécipitation a été effectuée sur la protéine beta-caténine endogène en utilisant un anticorps spécifique à cette protéine à partir d'un lysat de 2 mg de protéines. Cette expérience a été réalisée en duplicata simultanément afin de démontrer d'une part l'enrichissement de la protéine par immunobuvardage, et d'autre part d'utiliser cet enrichissement pour analyse par spectrométrie de masse.

Bien que cette expérience fût répétée à plusieurs reprises, l'analyse par spectrométrie de masse ne couvre pas le peptide possédant le résidu d'intérêt (Figure 4-6). Plusieurs modifications au protocole ont été testées afin de contourner cette problématique, dont l'utilisation d'enzymes de digestion alternatifs, la purification d'une plus grande quantité de protéines, l'utilisation de différents tampons de lyse et la modification de certains paramètres de l'appareil de spectrométrie, en vain. Nous avons aussi tenté d'effectuer ces analyses sur la protéine ectopique Myc- β -caténine ainsi que de stabiliser cette dernière via l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome.

Nous croyons que la charge nulle du court peptide, dont la séquence RHLTSR est coupée de part et d'autre par la trypsine, représente la raison pour laquelle celui-ci n'est que peu ionisé et non-déecté par l'appareil. Pour pallier à ceci, une construction mutante codant la

protéine et remplaçant l'arginine 474 dans la séquence a été générée afin d'éliminer ce site de coupure par la trypsine. Cette stratégie fut un succès et nous a permis de visualiser ce peptide lors de l'analyse en spectrométrie de masse, mais à ce jour aucune phosphorylation de la thréonine 472 n'a pu être détectée après transfection d'une forme constitutivement active de MEK2.

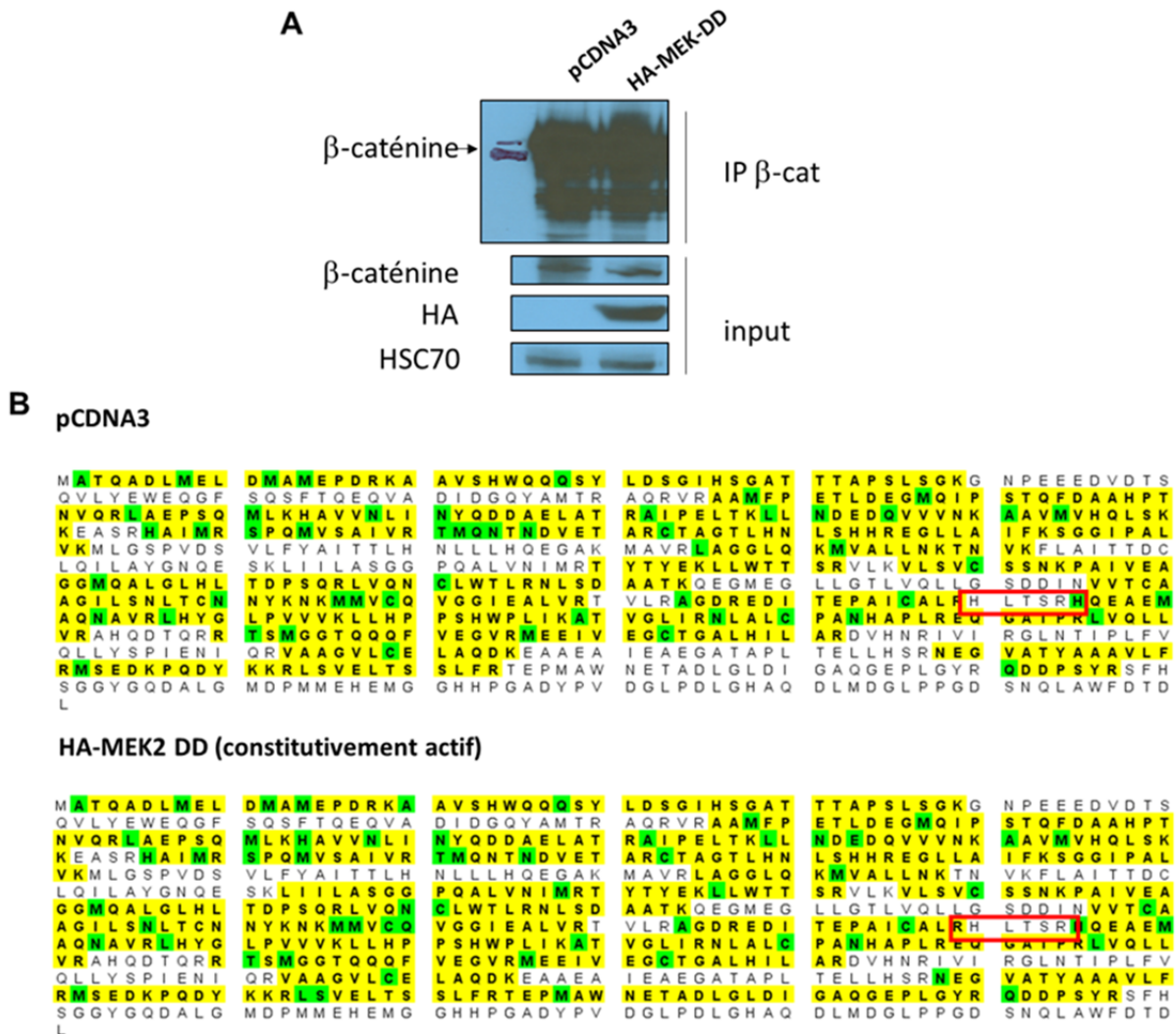


Figure 4-5 Analyse par spectrométrie de masse (MS) de la phosphorylation *in vivo* de β -caténine

(A) Immunoprécipitation de la beta-caténine via l'anticorps anti- β -caténine de cellules transfectées par un plasmide contrôle ou exprimant HA-MEK2-DD constitutivement actif. La bande soumise en spectrométrie de masse correspond à la bonne taille pour la beta-caténine endogène. (B) La couverture de l'analyse MS est affichée en jaune et le

peptide possédant la T472 est mis en évidence par l'encadré rouge. Plus de cinq expériences indépendantes ont été réalisées.

Une autre stratégie que nous avons utilisée pour détecter la présence de la protéine phosphorylée *in vivo* est la génération d'un anticorps phospho-spécifique contre la thréonine 472. Celui-ci a été généré par injection chez le lapin d'un peptide correspondant à la séquence cible de la beta-caténine dont la thréonine 472 est phosphorylée. L'usage d'un tel anticorps est un outil puissant dans la mesure où il permet la reconnaissance spécifique de la forme phosphorylée de la protéine. Nos essais avec cet outil n'ont cependant pas permis à ce jour d'observer un signal spécifique à cette forme tant à partir de la protéine endogène qu'ectopique issu d'un modèle cellulaire (Figure 4-7 panneau A). L'utilisation des deux versions de cet anticorps contre la protéine recombinante produite en bactérie montre cependant une forte spécificité contre la forme WT de la protéine, alors que la forme mutante ne présente qu'une faible bande (Figure 4-7 panneau B). De plus, la protéine phosphorylée par l'enzyme recombinante active MEK1 est reconnue de manière prédominante par ces anticorps en comparaison au contrôle négatif sans MEK1. Ces résultats suggèrent que cet outil est bel et bien spécifique à une forme phosphorylée de la thréonine 472 de la beta-caténine tel que généré par essai kinase *in vitro*.

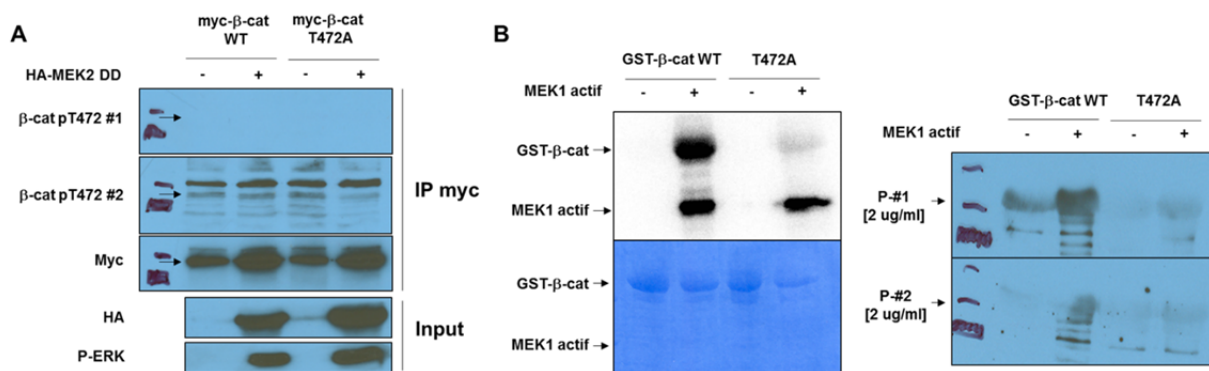


Figure 4-6 **Essais préliminaires de l'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la T472 de beta-caténine**

A) Les cellules ont été transfectées de la forme WT ou T472A de myc-beta-caténine ainsi qu'une forme constitutivement active de MEK2. L'immunoprécipitation de la

beta-caténine a été effectuée à partir de son tag myc et soumise à immunobuvardage de type western à partir des deux anticorps générés (Phospho-#1 et phospho-#2). B) Essai kinase in vitro de la beta-caténine WT ou mutante en présence de 50 uM d'ATP et 0.5 U d'enzyme MEK1 recombinante active. Le panneau de gauche montre le résultat de l'essai kinase en présence de 5 µCi [γ -³²P] par condition. Le produit de l'essai kinase a aussi été déposé sur gel d'acrylamide et soumis à immunobuvardage de type western (panneau de droite). Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

4.3.3 MEK1/2 et beta-caténine forment un complexe

Nous avons ensuite étudié la possibilité que MEK1/2 se lie physiquement à la beta-caténine. La liaison transitoire du substrat à sa kinase via un domaine d'interaction est effectivement une propriété fréquemment observée chez les MAP Kinases, qui permet entre autre une meilleure spécificité de substrat et une plus grande efficacité de phosphorylation (25). Nous avons ainsi exprimé les protéines possédant un tag HA de MEK1, MEK2 ou ERK1 ainsi que Myc-beta-caténine en cellules HEK293T.

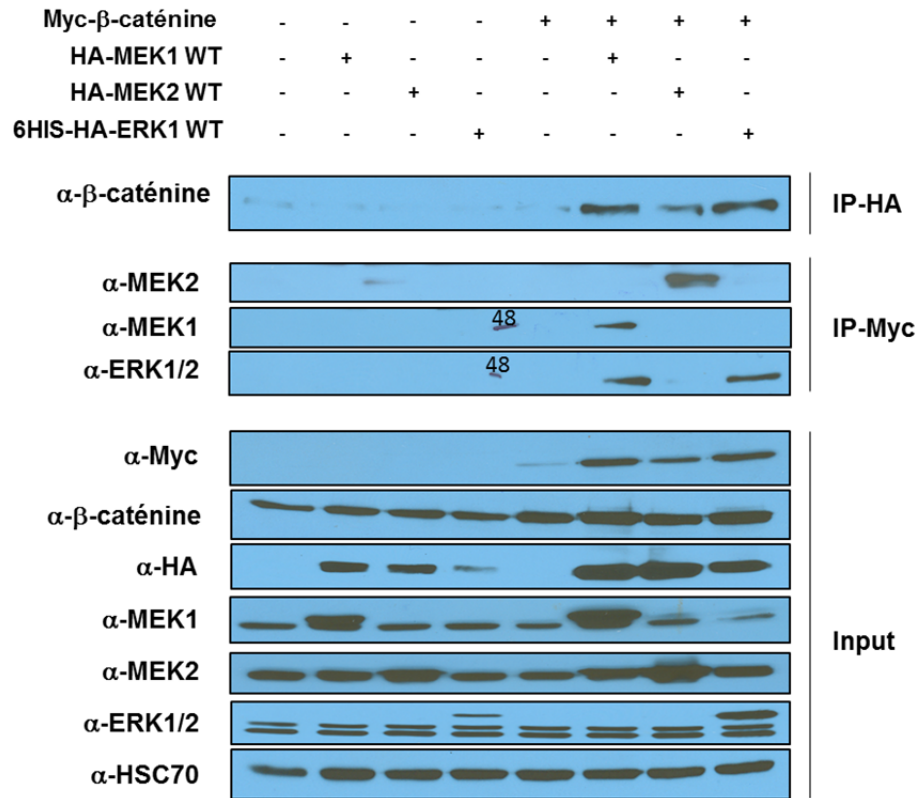


Figure 4-7 **La beta-caténine est un partenaire d'interaction de MEK1/2**

Des cellules HEK293T ont été transfectées avec des formes ectopiques de myc-beta-caténine, HA-MEK1, HA-MEK2, HA-ERK1 ou un vecteur contrôle. Après lyse des cellules, les complexes protéiques ont été immunoprécipités via un anticorps reconnaissant leur marqueur. L'interaction entre les partenaires d'interactions est analysée par immunobuvardage.

Nous avons ensuite procédé à l'immunoprécipitation de ces protéines ectopiques via un anticorps anti-HA ou anti-Myc et observé par immunobuvardage la présence de beta-caténine ou de MEK1/2 et ERK1, respectivement. Les résultats de la figure 4-8 montrent ainsi que l'immunoprécipitation de MEK1 et MEK2 via leur tag HA permet de co-précipiter la beta-caténine dans le complexe immun. Ceci est aussi vrai pour l'immunoprécipitation de la beta-caténine via le tag Myc, qui permet l'immunoprécipitation de MEK1/2. Sans surprise, ERK1 liant directement MEK1/2 durant l'activation de la cascade MAP Kinase, nous pouvons retrouver cette MAP Kinase dans le complexe immun lorsque la beta-caténine se lie à MEK1/2.

4.3.4 Impact de la thréonine 472 sur la stabilité de la β -caténine

La beta-caténine est une protéine instable en absence de liaison à la E-cadhérine et sa dégradation survient de manière continue en absence d'une activation de la voie Wnt. L'activité de la beta-caténine ne dépend pas ainsi de son activation par la phosphorylation d'un résidu à sa surface, mais bien d'une accumulation suivant l'inhibition de son complexe de dégradation et de la translocation de cette dernière au noyau. Conséquemment, nous avons étudié le rôle d'une possible phosphorylation de la thréonine 472 sur la stabilité de la protéine. Pour ce faire, les formes WT ou mutantes pour la T472 ont été exprimées en cellules HEK293T de manière transitoire par transfection. Un vecteur contrôle ou exprimant la forme constitutivement active de MEK2 a été transfecté en parallèle. Après 48h, les cellules ont été traitées avec un inhibiteur de ERK1/2 ou le véhicule, puis soumises à un essai de dégradation en présence de cycloheximide pendant 8 heures.

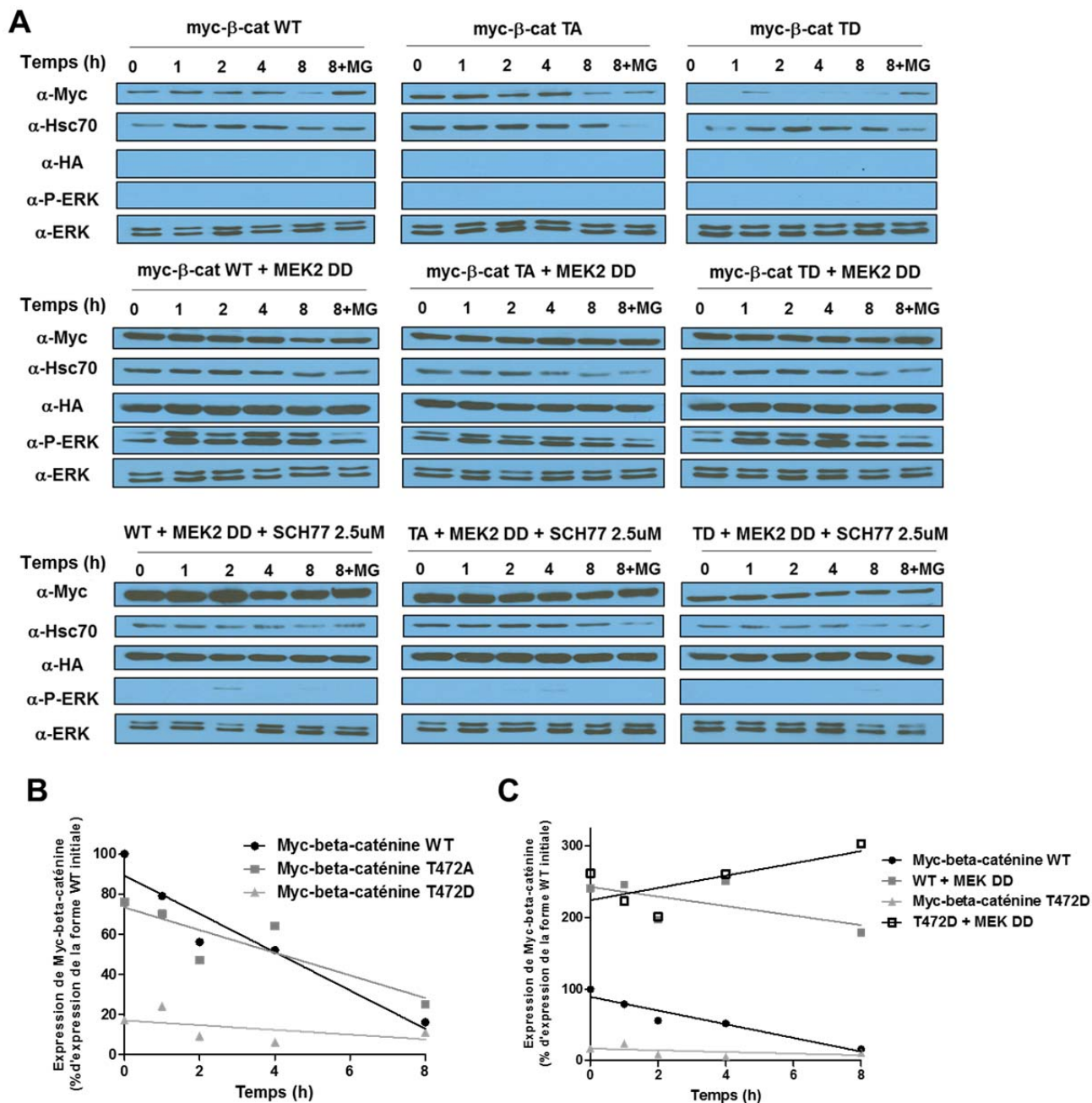


Figure 4-8 Stabilité de la forme ectopique de beta-caténine

(A) La stabilité de la forme WT ou mutante pour la T472 de la beta-caténine a été évaluée par essais de cycloheximide chase. Les cellules ont été transfectées pendant 48h par un plasmide encodant la forme WT, T472A (TA) ou T472D (TD) de myc-beta-caténine, ainsi qu'un plasmide contrôle ou exprimant la forme constitutivement active de HA-MEK2-DD. Les cellules ont été prétraitées au véhicule ou à 2.5 μ M d'inhibiteur de ERK1/2 SCH772984 (SCH77) la nuit précédant l'expérience. Le matin de l'expérience, les cellules ont été traitées par 50 μ g/ml de cycloheximide ainsi

que le véhicule ou 10 uM de MG132 (MG). Les cellules ont été récoltées aux temps indiqués par l'expérience et analysées par immunobuvardage. Cette expérience a été effectuée à deux reprises. (B) Analyses densitométriques de la stabilité de myc- β -caténine WT ou mutante pour la thréonine 472 (Tableau supérieur gauche, centre et droit). (C) Analyses densitométriques de la stabilité de myc- β -caténine WT ou T472D en présence ou absence d'une forme de MEK2 constitutivement active (Tableau supérieur gauche et supérieur droit, tableau du centre gauche et centre droit).

Nous pouvons dès lors constater que la demi-vie du type sauvage de Myc-beta-caténine se situe peu après 4 heures (Figure 4-9 panneau B). L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, valide que la diminution observée de la beta-caténine passe bien par un mécanisme de dégradation par le protéasome. En absence d'une stimulation de la voie MAP Kinase, le mutant alanine de la T472 présente un temps de dégradation similaire à la forme WT. Cependant, le mutant aspartate du résidu, qui peut posséder des propriétés phosphomimétiques, semble être extrêmement instable en comparaison (Figure 4-9 panneau B).

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'expression d'une forme constitutivement active de MEK2 permet de moduler la stabilité de la beta-caténine. Comme contrôle, la phosphorylation de ERK1/2 est observée sur toute la durée de l'expérience. De manière surprenante, une forte stabilisation de la beta-caténine est observée à la suite d'une activité soutenue de MEK2. Cette stabilisation est aussi indépendante de la mutation du résidu en alanine ou en acide aspartique (figure 4-9, panneau C). De surcroit, l'effet déstabilisant de la forme T472D n'est pas suffisant pour renverser la stabilisation induite par l'expression de MEK2 constitutivement actif. Ceci suggère qu'une activité de la voie MAP Kinase induit la stabilisation de la beta-caténine selon un mécanisme indépendant d'une possible phosphorylation de la thréonine 472.

Il est possible que la hausse de stabilité de la beta-caténine suite à une stimulation de la voie MAP Kinase soit dû à un l'effet d'un acteur en aval de la voie plutôt qu'à un effet direct de MEK1/2. Pour valider cette hypothèse, nous avons effectué un traitement à l'inhibiteur de

ERK1/2 SCH772984 16 heures avant l'ajout du cycloheximide et pendant toute la durée de l'expérience, permettant l'inhibition totale de la phosphorylation de ERK1/2 par la forme constitutivement active de MEK1/2 aux concentrations utilisées. Nous observons ainsi que l'inhibition de la voie MAP Kinase ne permet pas de renverser la stabilisation de la beta-caténine induite par l'activité de MEK1/2 (figure 4-9, tableaux du bas). Ceci suggère que cette stabilisation est une conséquence directe de l'activité de MEK1/2 et indépendante de l'activation des autres composantes de la voie MAP Kinase.

Nous nous sommes questionnés à savoir si cet effet direct de MEK1/2 sur la beta-caténine est dû à l'activité catalytique de l'enzyme ou à un mécanisme allostérique. Effectivement, nous avons déjà démontré que MEK1/2 lie la beta-caténine à la figure 4-8. Nous avons donc co-transfecté le mutant T472D de la beta-caténine avec un vecteur contrôle ou une forme dominante négative de MEK2 dont la fonction catalytique est abolie. Contrairement aux résultats observés à la figure 4-9, l'expression de cette forme de MEK1/2 ne permet pas de stabiliser la beta-caténine, suggérant que la fonction catalytique de l'enzyme est indispensable à l'effet stabilisateur observé (figure 4-10). Une possibilité est qu'un second site de phosphorylation par MEK1/2 existe au sein de la beta-caténine, stabilisant cette protéine. Il n'est pas possible à ce stade de prédire si la phosphorylation du résidu T472 module la stabilité de la protéine ou, en d'autres mots, si le mutant T472D agit réellement en phosphomimétique. La perte de stabilité observée lors de la mutation de ce résidu peut être un effet allostérique intrinsèque au repliement de la protéine.

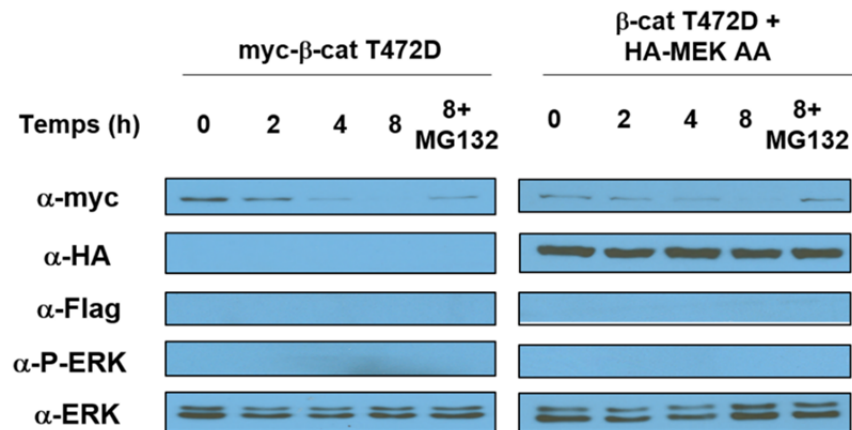


Figure 4-9 **Impact de l'expression d'une forme dominante négative de MEK1/2 sur la stabilité de β -caténine**

Les cellules HEK293T ont été transfectées par la forme T472D (TD) de la beta-caténine et un plasmide contrôle ou une forme dominante négative de MEK2 (S222A/S226A). La stabilité de la beta-caténine T472D a été évaluée par essai de cycloheximide chase tel que décrit précédemment et analysées par immunobuvardage.

4.3.2 Activité transcriptionnelle

Ayant observé une diminution importante de la stabilité de la beta-caténine suivant la mutation de la T472, nous nous sommes ensuite questionnés quant à l'activité transcriptionnelle de la protéine. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences en utilisant le rapporteur luciférase TOPFlash, dont l'expression relève d'une séquence promotrice spécifique à la beta-caténine. Le rapporteur FOPFlash, dont le promoteur est muté, démontre une activité basale au seuil de lecture qui ne varie pas en fonction de l'expression de la beta-caténine (Figure 4-12, panneau A). Le rapporteur luciférase actif TOPFlash présente une activité beaucoup plus importante, notamment dû à l'activité de la forme endogène de la beta-caténine et cette activité double lorsqu'on exprime la forme ectopique WT de la beta-caténine. Cependant, la mutation du résidu T472 en alanine démontre une baisse du signal d'environ 25% comparativement au contrôle TOPFlash seul, alors que la mutation T472D propose plutôt une inhibition du signal de l'ordre de 75% (Figure 4-12, panneau B). Ce résultat suggère que la perte de stabilité de la protéine induite par la mutation du résidu T472 a aussi une incidence fonctionnelle aussi sur son activité transcriptionnelle.

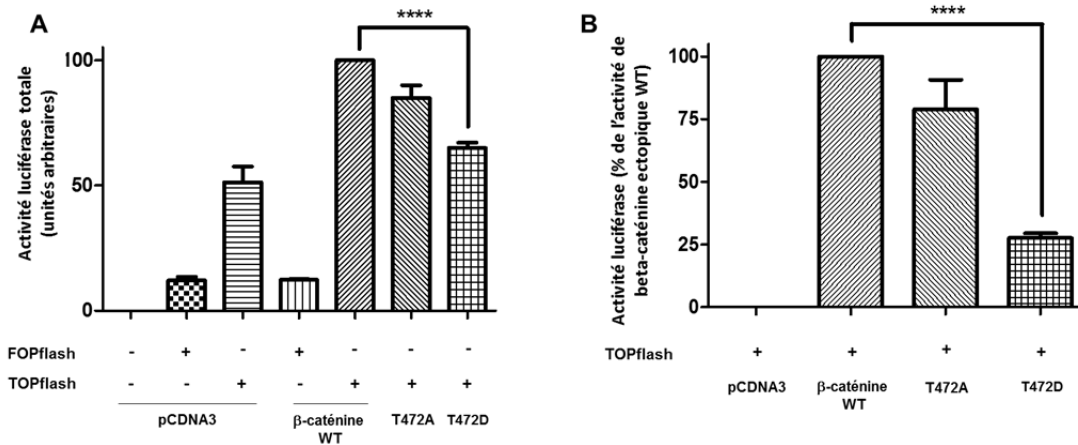


Figure 4-10 **Activité TOPFlash de la beta-caténine WT et mutante pour la T472**

A) Le plasmide rapporteur luciférase TOPFlash ou sa forme mutante inactive FOPFlash a été co-transfecté dans les cellules HEK293T en présence ou non d'une forme WT ou mutante de la beta-caténine. Un plasmide encodant la rénilla luciférase a été utilisé pour normaliser l'efficacité de transfection. B) L'activité luciférase due à la forme ectopique seule a été calculée par soustraction de l'activité du vecteur TOPFlash seul pour chaque point de lecture. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

4.4 Discussion

4.4.1 Validation adéquate de nouveaux substrats de MEK1/2

Plusieurs nouveaux substrats de MEK1/2 ont été décrit au fil des années, mais aucun d'entre eux n'ont été validés par des méthodes biochimiques ou protéomiques adéquates. Il n'existe effectivement aucune méthode parfaite pour caractériser hors de tout doute la phosphorylation d'un substrat par sa kinase en une seule expérience. La faiblesse de ces études tourne ainsi souvent autour de l'utilisation d'un outil unique qui laisse place à interprétation quant à l'exactitude du résultat ou qui n'est pas reproductible. L'absence d'études de suivi de ces candidats témoigne de l'importance de valider adéquatement et par plusieurs méthodes chaque substrat identifié.

Une récente étude dans la prestigieuse revue *Cell* suggère que le facteur de transcription HSF1 est un nouveau substrat de MEK1/2 (281). Celui-ci était déjà connu pour être phosphorylé par ERK1/2 mais sur des résidus différents. Selon ce modèle, les auteurs proposent que MEK1/2 phosphoryle HSF1 sur la sérine 326 alors que le ERK1/2 phosphoryle plutôt la sérine 307. De plus, l'effet de la phosphorylation de ces sites est antagoniste sur la fonction de la protéine. Malgré l'utilisation rigoureuse d'inhibiteurs pharmacologiques afin de discriminer une possible phosphorylation par MEK1/2 plutôt que ERK1/2, les auteurs se basent cependant sur l'utilisation unique d'un anticorps spécifique à la forme phosphorylée de la sérine 326 de HSF1 pour mener la caractérisation biochimique de cette phosphorylation par MEK1/2. En dépit d'une modulation du signal correspondant aux traitements imposés, il existe ainsi toujours une possibilité que celui-ci ne reconnaisse pas spécifiquement l'épitope contre lequel il est dirigé. De plus, les expériences basées sur l'immunoprécipitation des kinases de la cellule n'excluent jamais la possibilité qu'une autre kinase co-immunoprécipite et soit à l'origine des effets observés. Ceci est particulièrement vrai pour les modules des voies MAP Kinase, dont les composantes sont liées par des protéines d'échafaudage dès qu'une activation de la voie survient. L'analyse de la phosphorylation de HSF1 par MEK1/2 se complexifie davantage lorsque l'on considère que ERK1/2 phosphoryle aussi cette protéine sur la S306. La phosphorylation de ce site est d'ailleurs un précurseur nécessaire à la phosphorylation d'autres résidus, telle que la sérine 303. Contrairement à ERK1/2, l'absence d'un motif consensus de phosphorylation par MEK1/2 ne permet pas de discriminer rapidement la possibilité que la kinase phosphoryle un substrat donné. En effet, il serait nécessaire d'analyser plusieurs substrats validés de MEK1/2 afin d'en arriver à un motif consensus reconnu. La sérine 326 possède en revanche une proline en position +1, motif minimal nécessaire à la phosphorylation par ERK1/2 d'une cible.

L'expérience la plus convaincante d'une phosphorylation de HSF1 par MEK1/2 est l'essai kinase *in vitro* de la figure 3-(H) de cette étude, où une forme purifiée commerciale de HSF1 est phosphorylée par la kinase active recombinante GST-MEK1, aussi procurée commercialement. Cette expérience dépend cependant encore une fois de l'utilisation unique de l'anticorps p-HSF1(Ser326) afin de prouver un état de phosphorylation. Un contrôle

critique manquant à cette expérience est l'utilisation d'un mutant HSF1 S326A permettant de valider la spécificité de l'anticorps.

Étant sceptique de ce résultat, nous avons ainsi tenté de le reproduire par essai kinase *in vitro*. Le résultat préliminaire de la figure 4-13 suggère que HSF1 n'est pas un substrat *in vitro* de MEK1, contrairement aux résultats obtenus pour la beta-caténine présentés à ce chapitre.

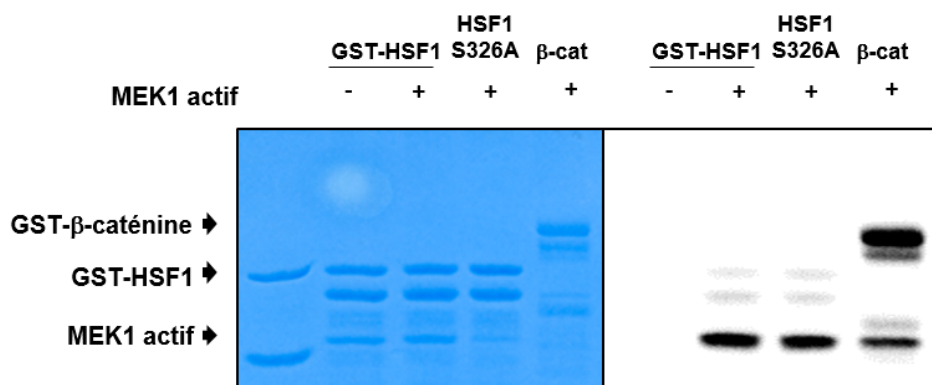


Figure 4-11 **Phosphorylation *in vitro* de HSF1 par MEK1**

Essai kinase *in vitro* de HSF1 WT mutant pour la S326 en présence de 50 uM d'ATP et 0.5 U d'enzyme MEK1 recombinante active. La β-caténine WT est utilisée ici comme contrôle positif pour l'activité de MEK1. Cette expérience a été effectuée à trois reprises.

D'autres études ont aussi indiqué que ce résidu était la cible d'une phosphorylation par des kinases alternatives. Par exemple, un article récent publié dans *Molecular and Cellular Biology* suggère que les MAP Kinases de la famille p38 sont capables de phosphoryler la sérine 326 de HSF1 à la fois *in vitro* et *in vivo* (282). Contrairement à l'étude publiée dans *Cell*, ces expériences biochimiques sont appuyées par des données de protéomique. Les auteurs de cette étude ont aussi démontré que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique à MEK1/2, le U0126, induit une diminution de la phosphorylation de ce résidu sur une longue période de traitement seulement. Un court traitement d'une heure, pourtant suffisant pour

bloquer la phosphorylation de ERK1/2, n'est pas suffisant pour induire la baisse de phosphorylation de HSF1 sur la sérine 326. Ceci suggère que l'effet du U0126 sur la phosphorylation de ce résidu est lié à l'induction d'un stress cellulaire à long terme plutôt qu'à l'inhibition spécifique de MEK1/2, et que les kinases de la famille p38 sont responsables de cette phosphorylation plutôt que MEK1/2.

Ces réflexions soulèvent l'importance d'une validation extensive de tout nouveaux substrats d'une kinase donnée. L'essai kinase *in vitro* est une méthode robuste qui permet d'éliminer la possibilité qu'une autre kinase soit responsable d'une phosphorylation observée dans un modèle cellulaire. Cependant, un signal de phosphorylation *in vitro*, exempt des conditions physiologiques normales et d'éléments régulateurs externes, n'est pas garant d'une phosphorylation dans la cellule. Ainsi, la présence de données de phosphorylation *in vivo* par différentes études protéomiques est une manière simple de vérifier si certains groupes ont déjà observé la phosphorylation du résidu d'intérêt dans un contexte physiologique donné.

Nous avons démontré à ce jour que MEK1/2 phosphoryle la beta-caténine *in vitro* sur la thréonine 472. La preuve de la phosphorylation de ce résidu dans un modèle cellulaire demeure cependant difficile à démontrer. Contrairement à plusieurs autres sites au sein de la beta-caténine, la banque de donnée Phosphosite ne recense qu'une seule étude protéomique ayant observé la phosphorylation de la T472 (700). Le peptide recensé dans cette étude est par ailleurs clivé de manière incomplète par la trypsine, similairement à notre observation ayant permis l'identification du site de phosphorylation *in vitro*. De manière intéressante et à l'instar de notre propre observation, ce peptide phosphorylé l'est à la fois sur la T472 et la S473. Nous croyons ainsi que l'absence d'informations concernant la phosphorylation de la T472 est dû à la difficulté technique liée à la détection de ce peptide par spectrométrie de masse. Pour pallier à cette problématique, nous avons produit une construction ectopique de la beta-caténine dont l'arginine en position -3 est mutée, éliminant un site de clivage de la trypsine. Le peptide généré devrait ainsi être détecté plus facilement en spectrométrie de masse.

4.4.2 Fonctions possibles d'une phosphorylation de la T472 de la beta-caténine par MEK1/2

Plusieurs questions demeurent quant à la fonction possible d'une phosphorylation de la thréonine 472 de la beta-caténine par MEK1/2. D'une part, nos expériences suggèrent que la mutation de ce résidu par un acide aminé phosphomimétique diminue de manière importante la stabilité de la protéine. Nous ne pouvons cependant pas à ce jour affirmer irréfutablement que ce mutant mime réellement un état de phosphorylation puisque l'induction d'une activité MEK1/2 cause une stabilisation de la protéine selon un mécanisme qui est indépendant de cette phosphorylation. L'effet global de l'activité MEK1/2 sur la protéine WT semble ainsi être une augmentation de sa stabilité, et l'effet d'une phosphorylation de la thréonine 472, si le mutant phosphomimétique agit de manière similaire, est marginal quant à l'effet observé sur les niveaux totaux de la protéine. Puisque ce site est aussi conservé pour la gamma-caténine, et que nous avons démontré précédemment que celui-ci est aussi une cible *in vitro* de MEK1, nous nous sommes interrogés à savoir si la mutation de ce résidu induit un effet similaire à celui observé pour la beta-caténine. Des expériences préliminaires ont ainsi été effectuées par Vincent Poupart et suggèrent que la mutation du résidu équivalent à la thréonine 472 de la beta-caténine en alanine ou en acide aspartique, la thréonine 462 de la plakoglobine, diminue la stabilité de cette dernière. Ce résultat est en opposition à ceux obtenus pour la beta-caténine, où la mutation de la thréonine 472 en alanine n'induit pas une déstabilisation importante de la protéine.

Peu d'informations existe quant à un rôle possible de la phosphorylation de ce résidu. Seule une étude publiée en 2014 identifie la T472 de la beta-caténine comme cible de phosphorylation directe par CamKII et suggère un impact sur sa stabilité (701). Dans cette étude, les auteurs stipulent que la phosphorylation de trois sites distincts par cette kinase cause la déstabilisation et la perte d'activité de la beta-caténine en réponse à un traitement à l'éthanol. Ce site est effectivement consistant avec le motif de phosphorylation reconnu de CamKII, caractérisé par la présence d'une arginine en position -3 (702). L'identification des

sites de phosphorylation est cependant laborieuse, puisque la mutation des trois résidus, la thréonine 332, la sérine 552 et la thréonine 472, causent individuellement une diminution presque complète du signal de phosphorylation. Sans validation subséquente, les auteurs spéculent ainsi que ces trois sites sont responsables collectivement de la phosphorylation par CamKII. Il est possible que la kinase responsable de la phosphorylation de la T472 soit bien CamKII en réponse aux traitements effectués, mais les auteurs n'ont pas montré de résultats quant à la stabilité de la protéine suivant la mutation ou la phosphorylation de la T472.

L'un des phénotypes couramment observés lors de la transformation de lignées cellulaires normales telles que les IEC-6 suivant l'expression d'une forme oncogénique de MEK1/2, B-Raf ou KRas est la perte de contacts entre les cellules et l'évolution vers une morphologie fibroblastique (703-705). De surcroît, l'expression d'une forme constitutivement active de MEK1/2 est suffisante pour induire une prolifération aberrante, la perte d'adhésion cellulaire et la formation d'adénocarcinomes suivant une transplantation orthotopique dans un modèle murin (697). Les mécanismes à l'origine de cette transformation ne sont pas bien caractérisés à ce jour, mais plusieurs observations ont toutefois été faites. La transition épithélio-mésenchymateuse observée dans de nombreux types de cancers est liée en bonne partie à une perte de fonction des composantes des jonctions adhérentes (706). Une diminution d'expression de la E-cadhérine, notamment, est fréquente et accélère le processus de tumorigénèse, d'invasion et de formation de métastases (706, 707). Plusieurs groupes ont par ailleurs démontré qu'une phosphorylation de la beta-caténine ou de la E-cadhérine est suffisante pour affecter leur capacité de liaison, menant à une déstabilisation du complexe et à cette perte de fonction (708-710). À la vue de nos résultats, une hypothèse consiste donc qu'une activité oncogénique de la voie MAP Kinase permette la phosphorylation de la beta-caténine par MEK1/2, menant à une diminution de sa capacité de liaison à ses partenaires d'interaction à la membrane. Ceci expliquerait en partie l'occurrence de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par une activation oncogénique de la voie MAP Kinase.

Outre cet effet sur la morphologie cellulaire, il a été proposé à maintes reprises que la fraction de beta-caténine présente aux jonctions adhérentes est généralement séquestrée de l'activité du complexe de destruction de la beta-caténine (711). L'équilibre qui existe entre les niveaux de beta-caténine à la membrane et dans le cytoplasme est non seulement une fonction de l'activité de la voie Wnt, mais aussi une fonction de l'interaction avec l' α -caténine et la E-cadhérine (712). Ce mécanisme de compétition entre les composantes du cytosquelette d'actine et l'APC pour la beta-caténine est ainsi caractérisé depuis maintenant plus de vingt ans (713). Il a aussi été décrit pour la plakoglobine, aussi connue sous le nom de gamma-caténine, l'homologue de la beta-caténine (714). Nos données de stabilité suggèrent que la mutation de la thréonine 472 par un acide aminé phosphomimétique induit une déstabilisation de la beta-caténine dans un modèle cellulaire physiologique normal. Une hypothèse pourrait donc être que la phosphorylation de la beta-caténine sur ce résidu nuise à l'interaction avec ses partenaires à la membrane favorisant ainsi la liaison au complexe de destruction de la beta-caténine.

Effectivement, en absence d'une stimulation de la voie Wnt ou d'une perte de fonction de l'APC, le déplacement de la beta-caténine de la membrane au cytoplasme ne corrèle donc pas forcément à l'augmentation de sa stabilité ou de son accumulation nucléaire puisque les composantes du complexe de dégradation de la beta-caténine sont toujours présentes et fonctionnelles (711). Dans un contexte cellulaire normal possédant des jonctions E-cadhérine, ceci se traduit par une diminution globale des niveaux de beta-caténine, dont la titration survient par le déplacement de l'équilibre vers le cytoplasme. À l'opposé, dans un contexte tumoral où une perte de fonction de l'APC existe, ceci se traduit par une augmentation des niveaux de beta-caténine pouvant migrer au noyau. Il devient ainsi pertinent de vérifier si une forme mutée de beta-caténine est encore capable de lier correctement ses partenaires d'interaction aux jonctions adhérentes tels que la E-cadhérine et l' α -caténine via des expériences de co-immunoprécipitation. De plus, considérant que l'hypothèse d'une diminution de la liaison à ses partenaires se confirme, ceci serait observable par une diminution de beta-caténine à la membrane par des techniques d'imagerie, soit par immunofluorescence directe ou par l'expression de la protéine couplée à un fluorophore.

Afin de répondre à ces questions, nous travaillons présentement à la génération d'une construction GFP- β -caténine WT et mutante pour la thréonine 472. Cet outil permettra d'une part de visualiser la localisation intracellulaire de la protéine et, d'autre part, de vérifier si ce résidu agit à titre de dégron lorsque phosphorylé. En effet, une autre hypothèse possible est que la thréonine 472 soit un dégron, dont la phosphorylation induise subséquentement la dégradation. Bien que plusieurs des dégrons connus au sein de la β -caténine se situent à l'extrémité N-terminale de la protéine, on ne peut pas exclure la possibilité que la T472 en soit un néanmoins (715). Cette hypothèse semble cependant peu probable considérant l'augmentation de la stabilité induite globalement par l'activité de MEK1/2, indépendamment de la phosphorylation de la T472.

Outre la β -caténine, nous avons aussi identifié la phosphorylation *in vitro* de la même séquence chez son homologue, la plakoglobine. Ceci soulève la question à savoir si le rôle d'une phosphorylation de ce résidu s'applique de la même façon chez ces deux protéines. Effectivement, la plakoglobine est connue principalement en raison de ses rôles aux jonctions adhérentes et aux desmosomes, mais est régulée par la voie Wnt dans une certaine mesure ainsi que via le système ubiquitine-protéasome. Conséquentement, la plakoglobine est une protéine instable qui possède aussi des rôles transcriptionnels, quoique ceux-ci sont plus limités que ceux reconnus pour la β -caténine (716, 717). Sans surprise, la phosphorylation de ce résidu n'a été identifiée ou caractérisée dans aucune étude. Effectivement, ce peptide ayant la même séquence chez les deux homologues, il n'est pas étonnant que celui-ci n'ait pas été identifié précédemment par des méthodes protéomiques, similairement à la β -caténine (700).

Des expériences préliminaires ont été effectuées dans notre laboratoire par un étudiant de maîtrise sous ma supervision et travaillant sur mon propre projet, Vincent Poupart. Les résultats de ces expériences suggèrent que la mutation du résidu équivalent à la thréonine 472 de la β -caténine, la thréonine 462 de la plakoglobine, diminue significativement la stabilité

de cette dernière. Bien que ces expériences doivent être répétées et validées, les résultats de celles-ci diffèrent de ceux observés pour la beta-caténine de par la dégradation marquée du mutant T462A. Si ce résultat est confirmé, cette instabilité induite par le mutant T462A infirme l'hypothèse que ce résidu agisse à titre de phospho-détron pour la protéine. Dans ce contexte, on pourrait cependant concevoir que la liaison de cette protéine à ses partenaires d'interaction à la membrane et au cytosquelette est maximale lorsque cette thréonine est intacte, mais diminuée si celle-ci est phosphorylée ou mutée en un autre acide aminé. Similairement aux expériences proposées pour la beta-caténine, la capacité de liaison de la plakoglobine de type sauvage ou mutante à ses partenaires d'interaction permettra de répondre en partie à ces questions.

4.4.3 MEK1/2 a-t-il d'autres cibles que la thréonine 472?

Indépendamment de la mutation de la thréonine 472, l'expression d'une forme constitutivement active de MEK1/2 cause la stabilisation de la beta-caténine dans notre modèle cellulaire. De plus, l'inhibition pharmacologique de ERK1/2 ne permet pas l'abrogation de cet effet, suggérant que MEK1/2 stabilise la beta-caténine selon un mécanisme qui est dépendant de son activité kinase mais indépendante de l'activation de ERK1/2 en aval (figure 4-9). Il est donc possible que MEK1/2 phosphoryle un acide aminé alternatif à la thréonine 472 sur la beta-caténine. Cette hypothèse est renforcée par la présence résiduelle d'un signal de phosphorylation *in vitro* lorsque la thréonine 472 est mutée (Figure 4-4). Bien que nos efforts se concentrent présentement sur cette thréonine, le site principal de phosphorylation identifié par nos essais, nous pouvons tout de même envisager l'existence d'un autre site de phosphorylation au sein de la protéine pouvant expliquer le phénomène de stabilisation observé.

Le peptide non-tryptique ayant mené à l'identification de la thréonine 472 par spectrométrie de masse présente aussi une phosphorylation de la sérine 473. Similairement à la

T472, la phosphorylation de la S473 n'a été observée qu'à une seule instance dans un étude protéomique à grande échelle, où les deux résidus sont phosphorylés conjointement (700). Considérant que les deux seules analyses en spectrométrie de masse analysant ce peptide présentent la phosphorylation des deux résidus conjointement, il y a bonne raison de croire que la S473 soit un second résidu de phosphorylation par MEK1/2. La mutation de ceux-ci en essai kinase *in vitro* ne montre cependant pas de diminution d'intensité du signal en comparaison à la simple mutation de la thréonine 472 (figure 4-4). Une hypothèse quant à ce résultat serait que la phosphorylation de la T472 soit un prérequis à la phosphorylation subséquente de la S473. Ceci ne permet cependant pas d'expliquer la hausse de stabilité induite par l'activité de MEK1/2 en modèle cellulaire, puisque la mutation de la T472 ne renverse pas l'effet observé sur la beta-caténine.

La beta-caténine est une protéine phosphorylée sur de multiples résidus dont de nombreuses fonctions et propriétés biochimiques dépendent (revue dans (718)). De plus, la phosphorylation de plusieurs de ces sites est parfois lié à une activité MAP Kinase, notamment la phosphorylation de la sérine 552 par MSK1 et Akt (719, 720). L'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/2 dans un modèle cellulaire de cancer colorectal ne diminue cependant pas les niveaux de phosphorylation de cette sérine suivant stimulation de la voie MAP Kinase (275). Une étude du groupe de Nathalie Rivard effectuée dans un modèle de cellules épithéliales intestinales de rat suggère qu'une activation soutenue de la voie MAP Kinase stimule l'induction de la voie Wnt/ β -caténine (275). Le mécanisme proposé pour cette interaction entre ces deux voies de signalisation est la phosphorylation du récepteur LRP6 par ERK1/2. Les auteurs observent une accumulation nucléaire de la protéine ainsi qu'une hausse de son activité transcriptionnelle par essai TOPFlash suivant activation de la voie MAP Kinase. Le mécanisme décrit par ce groupe ne peut cependant pas expliquer l'effet que nous observons, considérant que la hausse des niveaux de beta-caténine induite par l'activité de MEK1/2 subsiste même après le traitement à long terme avec un inhibiteur de ERK1/2. Une phosphorylation directe d'un résidu alternatif au sein de la beta-caténine menant à sa stabilisation pourrait, en revanche, expliquer en partie l'effet que ce groupe observe sur l'activation de la voie Wnt canonique en complément à la phosphorylation de LRP6.

Outre la phosphorylation d'un site alternatif au sein de la beta-caténine, une hypothèse possible est la phosphorylation directe d'un autre substrat par MEK1/2 ayant un impact sur la stabilité de la beta-caténine. Un groupe a décrit précédemment la phosphorylation de la kinase GSK3 par MEK1/2 (272). Dans cette étude, les auteurs indiquent que cette phosphorylation par MEK1 inhibe l'activité de GSK3 vis-à-vis la beta-caténine, ce qui mène à sa stabilisation subséquente et à son accumulation nucléaire. Bien que la validité de cette étude soit controversée (voir explications à la section 1.3.2), un tel mécanisme expliquerait l'effet stabilisateur que l'on observe sur la beta-caténine de manière indépendante à l'inhibition de ERK1/2.

4.4.4 Stratégies pour l'identification *in vivo* des sites de phosphorylation de la β -caténine

Considérant les difficultés à détecter le peptide d'intérêt par spectrométrie de masse, quelques avenues alternatives ont été testées ou sont en voie de l'être afin de valider ou infirmer la phosphorylation de beta-caténine par MEK1/2 en cellules eucaryotes. Une première possibilité quant à la détection d'une forme phosphorylée par spectrométrie de masse est la génération d'une forme ectopique mutante de la protéine dont l'une des arginines entourant le peptide tryptique d'intérêt est modifiée. Cette hypothèse a pu être testée et nous a effectivement permis de détecter le peptide lors d'une analyse en spectrométrie de masse. Aucune phosphorylation de la thréonine 472 n'a cependant été détectée dans la condition en présence de MEK2-DD à ce jour. Il est possible que les conditions physiologiques dans lesquelles une potentielle phosphorylation de la beta-caténine par MEK1/2 survient ne sont pas atteintes via l'utilisation de cette forme constitutivement active de MEK2, et que l'utilisation d'un modèle cellulaire différent ou de conditions de stimulation alternatives puisse palier à cette problématique. D'autre part, il est aussi possible que la mutation de l'arginine 474 nuise à la phosphorylation *in vivo* de la beta-caténine par MEK1/2 et que notre stratégie

pour analyser ce peptide contrecarre nos efforts pour observer la forme phosphorylée de la thréonine 472. Considérant qu'un autre groupe de recherche a observé dans le passé une forme phosphorylée de ce résidu *in vivo* par analyse en spectrométrie de masse, nous savons que celui-ci existe bel et bien dans un contexte cellulaire donné, et nos observations quant à la phosphorylation *in vitro* de ce résidu par MEK1 suggère qu'il ne s'agit pas uniquement d'un artefact non-reproductible dans un modèle cellulaire.

De plus, nous avons voulu vérifier si des anticorps dirigés contre une forme phosphorylée d'une thréonine permettait de reconnaître la forme phosphorylée de la thréonine 472. Effectivement, certains anticorps commerciaux permettent la détection de sérines ou thréonines phosphorylées de manière générique et sans égard à la séquence peptidique environnante. Nous avons donc testé quelques-uns de ces anticorps, mais nos essais à ce jour n'ont cependant pas permis de détecter un signal à la taille de la beta-caténine dont l'intensité fluctue en fonction d'une activité MAP Kinase. L'utilisation d'un anticorps généré spécifiquement contre la forme phosphorylée de la thréonine 472 de la beta-caténine montre cependant des signes encourageants. En effet, cet outil démontre une forte spécificité à la forme phosphorylée de la thréonine 472 suite à un essai kinase *in vitro* sur la protéine recombinante produite en bactérie. Considérant que cet anticorps puisse aussi reconnaître cet épitope de la beta-caténine issue d'un modèle cellulaire, l'absence d'un signal suivant l'expression d'une forme constitutivement active de MEK1 suggère que les conditions physiologiques dans lesquelles une potentielle phosphorylation de la beta-caténine par MEK1/2 survient n'est pas atteinte par l'expression de MEK1-DD.

Une autre option que nous considérons est le marquage métabolique *in vivo* au phosphate [γ - ^{32}P]. En utilisant une forme sauvage ou mutée de la beta-caténine, ceci nous permettra de voir *in vivo* de manière spécifique la phosphorylation du résidu d'intérêt suivant stimulation de la voie MAP Kinase. La protéine ectopique peut ensuite être immunoprécipitée afin d'être analysée par autoradiographie. Une autre manière élégante d'effectuer cette expérience consiste en l'utilisation de cellules dont la thréonine 472 de la forme endogène de la beta-caténine est mutée via la technologie CRISPR/Cas-9. Effectivement, cet outil

permettra non seulement d'étudier la phosphorylation de ce résidu sans que la protéine endogène de type sauvage n'interfère avec le résultat, mais aussi d'étudier sa fonction précise dans un contexte physiologique normal.

Conclusion

Le rôle crucial de la voie MAP Kinase dans une multitude de processus cellulaires continue d'être mis en évidence chaque année par l'identification perpétuelle de nouveaux effecteurs de la voie. Dans les travaux couverts par cette thèse, nous avons identifié de nouveaux substrats de ERK1/2 impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif. Bien que l'implication potentielle des voies de signalisation dans le contrôle de ce processus post-transcriptionnel a été décrite de manière sporadique, nos études jettent les bases d'une modulation à grande échelle par la voie MAP Kinase par la phosphorylation de plusieurs facteurs d'épissage. Les protéines CDK12, RNPS1 et SRPK2, identifiées dans l'analyse phosphoprotéomique à grande échelle, ont ainsi été validés comme substrats de ERK1/2 par essais kinase *in vitro*. Plusieurs résidus de phosphorylation au sein de la kinase CDK12 ont notamment été identifiés.

En ce qui concerne les fonctions potentielles de la voie MAP Kinase découlant de la régulation de ce processus, nous nous sommes intéressés spécifiquement au rôle de ERK1/2 dans les étapes précoces de la différenciation des cellules souches embryonnaires. Pour ce faire, une analyse transcriptomique a été effectuée par séquençage de l'ARN à haut débit dans des cellules et a permis la génération d'une liste de gènes épissés de manière différentielle après l'expression d'ERK1 dans un modèle murin de cellules ES ERK1/2 DKO. Nous avons ainsi observé une diminution de l'expression d'une isoforme spécifique de DNMT3b en réponse à cette activité de ERK1, menant à une augmentation de l'expression de l'enzyme possédant le domaine catalytique. Parmi les facteurs d'épissage ayant un rôle clé dans le processus de différenciation, nous avons aussi identifié la protéine MBNL2 comme nouveau substrat de ERK1/2 par essai kinase *in vitro*.

Notre recherche de nouveaux substrats de la voie MAP Kinase nous a finalement mené à l'identification d'un nouveau substrat de MEK1/2 : la beta-caténine. Nos expériences

suggèrent que cette phosphorylation potentielle survient de manière prédominante sur la thréonine 472 et que la mutation de ce résidu par un acide aminé phosphomimétique déstabilise cette protéine. Cette séquence étant conservée chez l'homologue de la beta-caténine, la plakoglobine, nous avons aussi validé la phosphorylation in vitro de ce résidu sur cette protéine.

Pour conclure, cette thèse édifie, d'une part, les bases d'une régulation à grande échelle de l'épissage alternatif par les MAP Kinases ERK1/2, et d'autre part suggère un nouvel élément de régulation entre la voie Wnt/beta-caténine et la voie MAP Kinase par l'identification de la beta-caténine comme nouveau substrat de MEK1/2.

Bibliographie

1. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):153-83.
2. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2011;75(1):50-83.
3. Cooper JA, Sefton BM, Hunter T. Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells. *Molecular and cellular biology*. 1984;4(1):30-7.
4. Boulton TG, Gregory JS, Cobb MH. Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry*. 1991;30(1):278-86.
5. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991;65(4):663-75.
6. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*. 1990;249(4964):64-7.
7. Bonner TI, Oppermann H, Seeburg P, Kerby SB, Gunnell MA, Young AC, et al. The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene. *Nucleic acids research*. 1986;14(2):1009-15.
8. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, et al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*. 1992;358(6385):417-21.
9. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH, Jr., et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(14):4218-22.

10. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992;258(5081):478-80.
11. Thomas SM, DeMarco M, D'Arcangelo G, Halegoua S, Brugge JS. Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell*. 1992;68(6):1031-40.
12. Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular biotechnology*. 2005;31(2):151-74.
13. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*. 2012;66(2):105-43.
14. Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*. 1998;17(11 Reviews):1447-55.
15. Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, et al. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(20):14373-81.
16. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*. 2006;24(1):21-44.
17. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(9):726-35.
18. Courcelles M, Fremin C, Voisin L, Lemieux S, Meloche S, Thibault P. Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Molecular systems biology*. 2013;9:669.
19. Unal EB, Uhlitz F, Bluthgen N. A compendium of ERK targets. *FEBS letters*. 2017;591(17):2607-15.
20. Fremin C, Guegan JP, Plutoni C, Mahaffey J, Philips MR, Emery G, et al. ERK1/2-induced phosphorylation of R-Ras GTPases stimulates their oncogenic potential. *Oncogene*. 2016;35(43):5692-8.
21. Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & development*. 1999;13(2):163-75.

22. Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*. 2000;2(2):110-6.
23. Yang SH, Yates PR, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD. The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(2):710-20.
24. Sharrocks AD, Yang SH, Galanis A. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends in biochemical sciences*. 2000;25(9):448-53.
25. Fernandes N, Allbritton NL. Effect of the DEF motif on phosphorylation of peptide substrates by ERK. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;387(2):414-8.
26. Burkhard KA, Chen F, Shapiro P. Quantitative analysis of ERK2 interactions with substrate proteins: roles for kinase docking domains and activity in determining binding affinity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(4):2477-85.
27. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78(6):1027-37.
28. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994;265(5173):808-11.
29. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994;78(6):1039-49.
30. Han J, Richter B, Li Z, Kravchenko V, Ulevitch RJ. Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1265(2-3):224-7.
31. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*. 1995;267(5198):682-5.
32. Mertens S, Craxton M, Goedert M. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS letters*. 1996;383(3):273-6.
33. Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3

(MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *The EMBO journal*. 1997;16(12):3563-71.

34. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):17920-6.

35. Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ, Paulson KE. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):12908-13.

36. Deacon K, Blank JL. Characterization of the mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)/c-Jun NH2-terminal kinase 1 and MKK3/p38 pathways regulated by MEK kinases 2 and 3. MEK kinase 3 activates MKK3 but does not cause activation of p38 kinase in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(22):14489-96.

37. Winston BW, Chan ED, Johnson GL, Riches DW. Activation of p38mapk, MKK3, and MKK4 by TNF-alpha in mouse bone marrow-derived macrophages. *Journal of immunology*. 1997;159(9):4491-7.

38. Trempelec N, Dave-Coll N, Nebreda AR. SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell*. 2013;152(4):924- e1.

39. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2004;68(2):320-44.

40. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Molecular cell*. 2000;6(1):109-16.

41. Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, et al. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(19):10454-9.

42. Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*. 1998;92(6):1859-69.

43. Morooka T, Nishida E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(38):24285-8.
44. Davidson SM, Morange M. Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes. *Developmental biology*. 2000;218(2):146-60.
45. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal*. 2010;429(3):403-17.
46. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research*. 2005;15(1):11-8.
47. Ashwell JD. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(7):532-40.
48. Schieven GL. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Current topics in medicinal chemistry*. 2005;5(10):921-8.
49. Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(44):28670-6.
50. Chen C, Chen YH, Lin WW. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. *Immunology*. 1999;97(1):124-9.
51. Kim C, Sano Y, Todorova K, Carlson BA, Arpa L, Celada A, et al. The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nature immunology*. 2008;9(9):1019-27.
52. Kang YJ, Chen J, Otsuka M, Mols J, Ren S, Wang Y, et al. Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. *Journal of immunology*. 2008;180(7):5075-82.
53. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.
54. Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, et al. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*. 2001;411(6833):102-7.

55. Hirose Y, Katayama M, Stokoe D, Haas-Kogan DA, Berger MS, Pieper RO. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(22):8306-15.
56. Cha H, Wang X, Li H, Fornace AJ, Jr. A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(31):22984-92.
57. Matsusaka T, Pines J. Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 2004;166(4):507-16.
58. Heron-Milhavet L, LeRoith D. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):15600-6.
59. Nelyudova A, Aksenov N, Pospelov V, Pospelova T. By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell cycle*. 2007;6(17):2171-7.
60. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997;275(5296):90-4.
61. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *The EMBO journal*. 1999;18(23):6845-54.
62. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell death and differentiation*. 2007;14(4):693-702.
63. Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(18):12229-35.
64. Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer research*. 2000;60(9):2464-72.

65. Mikule K, Delaval B, Kaldis P, Jurczyk A, Hergert P, Doxsey S. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nature cell biology*. 2007;9(2):160-70.
66. Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(28):17355-63.
67. Minden A, Lin A, Smeal T, Derijard B, Cobb M, Davis R, et al. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(10):6683-8.
68. Sluss HK, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(12):8376-84.
69. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal*. 1996;15(11):2760-70.
70. Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *The EMBO journal*. 1995;14(23):5957-64.
71. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 1995;267(5196):389-93.
72. Noguchi K, Yamana H, Kitanaka C, Mochizuki T, Kokubu A, Kuchino Y. Differential role of the JNK and p38 MAPK pathway in c-Myc- and s-Myc-mediated apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;267(1):221-7.
73. Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, et al. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3004-9.
74. Holland PM, Suzanne M, Campbell JS, Noselli S, Cooper JA. MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(40):24994-8.
75. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis*. 2007;46(8):591-8.

76. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76(6):1025-37.
77. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(34):20608-16.
78. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular cell*. 2004;15(5):713-25.
79. Gutierrez GJ, Tsuji T, Chen M, Jiang W, Ronai ZA. Interplay between Cdh1 and JNK activity during the cell cycle. *Nature cell biology*. 2010;12(7):686-95.
80. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development*. 1993;7(11):2135-48.
81. Jaeschke A, Karasarides M, Ventura JJ, Ehrhardt A, Zhang C, Flavell RA, et al. JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Molecular cell*. 2006;23(6):899-911.
82. Hirata Y, Adachi K, Kiuchi K. Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 1998;71(4):1607-15.
83. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997;89(7):1067-76.
84. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000;288(5467):870-4.
85. Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*. 2003;38(6):899-914.
86. Fan M, Chambers TC. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2001;4(4):253-67.
87. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, et al. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular cell*. 2004;13(3):329-40.

88. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(48):6245-51.
89. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *Journal of clinical immunology*. 2001;21(4):253-7.
90. Yarza R, Vela S, Solas M, Ramirez MJ. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Frontiers in pharmacology*. 2015;6:321.
91. Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*. 1997;389(6653):865-70.
92. Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;213(2):715-24.
93. English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(7):3854-60.
94. Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee JD. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(51):36035-8.
95. Yan C, Takahashi M, Okuda M, Lee JD, Berk BC. Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(1):143-50.
96. Kato Y, Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Lee JD. Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunologic research*. 2000;21(2-3):233-7.
97. Reddy SP, Adiseshaiah P, Shapiro P, Vuong H. BMK1 (ERK5) regulates squamous differentiation marker SPRR1B transcription in Clara-like H441 cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;27(1):64-70.
98. Hii CS, Anson DS, Costabile M, Mukaro V, Dunning K, Ferrante A. Characterization of the MEK5-ERK5 module in human neutrophils and its relationship to ERK1/ERK2 in the chemotactic response. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(48):49825-34.

99. Buschbeck M, Ullrich A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(4):2659-67.
100. Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(49):35449-56.
101. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, et al. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature cell biology*. 2003;5(12):1104-10.
102. Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL, et al. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):5093-100.
103. Nakamura K, Johnson GL. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(39):36989-92.
104. Chayama K, Papst PJ, Garrington TP, Pratt JC, Ishizuka T, Webb S, et al. Role of MEKK2-MEK5 in the regulation of TNF-alpha gene expression and MEKK2-MKK7 in the activation of c-Jun N-terminal kinase in mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(8):4599-604.
105. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998;395(6703):713-6.
106. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO journal*. 1997;16(23):7054-66.
107. Cude K, Wang Y, Choi HJ, Hsuan SL, Zhang H, Wang CY, et al. Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway. *The Journal of cell biology*. 2007;177(2):253-64.
108. Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CE, Muller J, Cross MJ. The role of ERK5 in endothelial cell function. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(6):1584-9.

109. Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CE, Muller J, Cross MJ. ERK5: structure, regulation and function. *Cellular signalling*. 2012;24(11):2187-96.
110. Roberts OL, Holmes K, Muller J, Cross DA, Cross MJ. ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 18):3189-200.
111. Nithianandarajah-Jones GN, Cross MJ. Analysis of VEGF-Mediated ERK5 Activity in Endothelial Cells. *Methods in molecular biology*. 2015;1332:133-42.
112. Carvajal-Vergara X, Tabera S, Montero JC, Esparis-Ogando A, Lopez-Perez R, Mateo G, et al. Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood*. 2005;105(11):4492-9.
113. Simoes AE, Rodrigues CM, Borralho PM. The MEK5/ERK5 signalling pathway in cancer: a promising novel therapeutic target. *Drug discovery today*. 2016;21(10):1654-63.
114. Hayashi M, Fearn C, Eliceiri B, Yang Y, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis. *Cancer research*. 2005;65(17):7699-706.
115. Zhu AX, Zhao Y, Moller DE, Flier JS. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(12):8202-11.
116. Turgeon B, Saba-El-Leil MK, Meloche S. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *The Biochemical journal*. 2000;346 Pt 1:169-75.
117. Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS letters*. 1992;304(2-3):170-8.
118. Aberg E, Perander M, Johansen B, Julien C, Meloche S, Keyse SM, et al. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(46):35499-510.
119. Deleris P, Trost M, Topisirovic I, Tanguay PL, Borden KL, Thibault P, et al. Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(8):6470-8.
120. De la Mota-Peynado A, Chernoff J, Beeser A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(15):13603-11.

121. Hoeflich KP, Eby MT, Forrest WF, Gray DC, Tien JY, Stern HM, et al. Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *International journal of oncology*. 2006;29(4):839-49.
122. Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, et al. Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(47):29734-9.
123. Deleris P, Rousseau J, Coulombe P, Rodier G, Tanguay PL, Meloche S. Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocation of MK5. *Journal of cellular physiology*. 2008;217(3):778-88.
124. Sun M, Wei Y, Yao L, Xie J, Chen X, Wang H, et al. Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(1):209-14.
125. Hansen CA, Bartek J, Jensen S. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell cycle*. 2008;7(3):325-34.
126. Klinger S, Turgeon B, Levesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, Meloche S. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(39):16710-5.
127. Marquis M, Boulet S, Mathien S, Rousseau J, Thebault P, Daudelin JF, et al. The non-classical MAP kinase ERK3 controls T cell activation. *PloS one*. 2014;9(1):e86681.
128. Sirois J, Daudelin JF, Boulet S, Marquis M, Meloche S, Labrecque N. The atypical MAPK ERK3 controls positive selection of thymocytes. *Immunology*. 2015;145(1):161-9.
129. Choi KW, Benzer S. Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell*. 1994;78(1):125-36.
130. Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(3):963-8.
131. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+)

pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(1):131-9.

132. Lv L, Wan C, Chen B, Li M, Liu Y, Ni T, et al. Nemo-like kinase (NLK) inhibits the progression of NSCLC via negatively modulating WNT signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*. 2014;115(1):81-92.

133. Masoumi KC, Daams R, Sime W, Siino V, Ke H, Levander F, et al. NLK-mediated phosphorylation of HDAC1 negatively regulates Wnt signaling. *Molecular biology of the cell*. 2017;28(2):346-55.

134. Li M, Wang H, Huang T, Wang J, Ding Y, Li Z, et al. TAB2 scaffolds TAK1 and NLK in repressing canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(18):13397-404.

135. Rocheleau CE, Yasuda J, Shin TH, Lin R, Sawa H, Okano H, et al. WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell*. 1999;97(6):717-26.

136. Meneghini MD, Ishitani T, Carter JC, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Thorpe CJ, et al. MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1999;399(6738):793-7.

137. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999;399(6738):798-802.

138. Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, et al. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes & development*. 2004;18(7):816-29.

139. Ohkawara B, Shirakabe K, Hyodo-Miura J, Matsuo R, Ueno N, Matsumoto K, et al. Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes & development*. 2004;18(4):381-6.

140. Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, et al. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(12):4524-9.

141. Ota S, Ishitani S, Shimizu N, Matsumoto K, Itoh M, Ishitani T. NLK positively regulates Wnt/beta-catenin signalling by phosphorylating LEF1 in neural progenitor cells. *The EMBO journal*. 2012;31(8):1904-15.
142. Ishitani T, Hirao T, Suzuki M, Isoda M, Ishitani S, Harigaya K, et al. Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nature cell biology*. 2010;12(3):278-85.
143. Han Y, Kuang Y, Xue X, Guo X, Li P, Wang X, et al. NLK, a novel target of miR-199a-3p, functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2014;68(5):497-505.
144. Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(2):1301-12.
145. Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, et al. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(19):16733-43.
146. Valenciano AL, Ramsey AC, Santos WL, Mackey ZB. Discovery and antiparasitic activity of AZ960 as a *Trypanosoma brucei* ERK8 inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2016;24(19):4647-51.
147. Strambi A, Mori M, Rossi M, Colecchia D, Manetti F, Carlomagno F, et al. Structure prediction and validation of the ERK8 kinase domain. *PloS one*. 2013;8(1):e52011.
148. Klevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Peggie M, Morton S, Cohen P. Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *The Biochemical journal*. 2006;394(Pt 1):365-73.
149. Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE, Rosner MR. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(24):21272-9.
150. Miyatake K, Kusakabe M, Takahashi C, Nishida E. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nature communications*. 2015;6:6666.

151. Liwak-Muir U, Dobson CC, Naing T, Wylie Q, Chehade L, Baird SD, et al. ERK8 is a novel HuR kinase that regulates tumour suppressor PDCD4 through a miR-21 dependent mechanism. *Oncotarget*. 2016;7(2):1439-50.
152. Bermingham DP, Hardaway JA, Refai O, Marks CR, Snider SL, Sturgeon SM, et al. The Atypical MAP Kinase SWIP-13/ERK8 Regulates Dopamine Transporters through a Rho-Dependent Mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37(38):9288-304.
153. Groehler AL, Lannigan DA. A chromatin-bound kinase, ERK8, protects genomic integrity by inhibiting HDM2-mediated degradation of the DNA clamp PCNA. *The Journal of cell biology*. 2010;190(4):575-86.
154. Rossi M, Colecchia D, Iavarone C, Strambi A, Piccioni F, Verrotti di Pianella A, et al. Extracellular signal-regulated kinase 8 (ERK8) controls estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) cellular localization and inhibits its transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):8507-22.
155. Zacharogianni M, Kondylis V, Tang Y, Farhan H, Xanthakis D, Fuchs F, et al. ERK7 is a negative regulator of protein secretion in response to amino-acid starvation by modulating Sec16 membrane association. *The EMBO journal*. 2011;30(18):3684-700.
156. Busca R, Christen R, Lovern M, Clifford AM, Yue JX, Goss GG, et al. ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1. *BMC evolutionary biology*. 2015;15:179.
157. Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*. 1999;286(5443):1374-7.
158. Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, et al. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO reports*. 2003;4(10):964-8.
159. Fremin C, Saba-El-Leil MK, Levesque K, Ang SL, Meloche S. Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell reports*. 2015;12(6):913-21.
160. Ashton-Beaucage D, Udell CM, Lavoie H, Baril C, Lefrancois M, Chagnon P, et al. The exon junction complex controls the splicing of MAPK and other long intron-containing transcripts in *Drosophila*. *Cell*. 2010;143(2):251-62.

161. Schwanhaussner B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473(7347):337-42.
162. Ashton-Beaucage D, Lemieux C, Udell CM, Sahmi M, Rochette S, Therrien M. The Deubiquitinase USP47 Stabilizes MAPK by Counteracting the Function of the N-end Rule ligase POE/UBR4 in *Drosophila*. *PLoS biology*. 2016;14(8):e1002539.
163. Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Molecular cell*. 2002;9(5):945-56.
164. Maruyama T, Kadowaki H, Okamoto N, Nagai A, Naguro I, Matsuzawa A, et al. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. *The EMBO journal*. 2010;29(15):2501-14.
165. Charlaftis N, Suddason T, Wu X, Anwar S, Karin M, Gallagher E. The MEKK1 PHD ubiquitinates TAB1 to activate MAPKs in response to cytokines. *The EMBO journal*. 2014;33(21):2581-96.
166. Shin J, Watanabe S, Hoelper S, Kruger M, Kostin S, Poling J, et al. BRAF activates PAX3 to control muscle precursor cell migration during forelimb muscle development. *eLife*. 2016;5.
167. Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E. Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(33):20024-8.
168. Jaaro H, Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R. Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(8):3742-7.
169. Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Lissovitch M, Seger R. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(3):803-17.
170. Chuderland D, Konson A, Seger R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular cell*. 2008;31(6):850-61.

171. Adachi M, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *The Journal of cell biology*. 2000;148(5):849-56.
172. Lorenzen JA, Baker SE, Denhez F, Melnick MB, Brower DL, Perkins LA. Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development*. 2001;128(8):1403-14.
173. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO journal*. 1997;16(8):1901-8.
174. Noda M, Ko M, Ogura A, Liu DG, Amano T, Takano T, et al. Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*. 1985;318(6041):73-5.
175. Pandiella A, Lehtvaslainen H, Magni M, Alitalo K, Meldolesi J. Activation of an EGFR/neu chimeric receptor: early intracellular signals and cell proliferation responses. *Oncogene*. 1989;4(11):1299-305.
176. Gomez N, Cohen P. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature*. 1991;353(6340):170-3.
177. Dodelet VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene*. 2000;19(49):5614-9.
178. Binns KL, Taylor PP, Sicheri F, Pawson T, Holland SJ. Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(13):4791-805.
179. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992;70(3):431-42.
180. Bonfini L, Karlovich CA, Dasgupta C, Banerjee U. The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science*. 1992;255(5044):603-6.
181. Rogge RD, Karlovich CA, Banerjee U. Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1991;64(1):39-48.

182. Leever SJ, Paterson HF, Marshall CJ. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*. 1994;369(6479):411-4.
183. Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, et al. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*. 1993;364(6435):308-13.
184. Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell*. 1992;71(2):335-42.
185. Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science*. 1992;257(5075):1404-7.
186. Howe LR, Marshall CJ. Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(28):20717-20.
187. Gardner AM, Vaillancourt RR, Johnson GL. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase by G protein and tyrosine kinase oncoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(24):17896-901.
188. Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(15):13061-8.
189. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, et al. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*. 1993;364(6434):249-52.
190. Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(38):23512-9.
191. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*. 1997;275(5298):394-7.
192. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology*. 2007;69:483-510.

193. Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, et al. Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(16):10856-64.
194. Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(20):11406-11.
195. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(2):1261-73.
196. Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL. cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *The EMBO journal*. 1993;12(11):4211-20.
197. Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*. 1993;262(5136):1069-72.
198. Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, Macdonald SG, Ross R, et al. Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(21):10300-4.
199. Severson BR, Kong X, Lawrence JC, Jr. Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(21):10305-9.
200. Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E. Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(8):6207-14.
201. Erhardt P, Troppmair J, Rapp UR, Cooper GM. Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(10):5524-30.
202. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 1994;372(6508):786-91.

203. Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 1998;94(5):625-34.
204. Coles LC, Shaw PE. PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene*. 2002;21(14):2236-44.
205. Slack-Davis JK, Eblen ST, Zecevic M, Boerner SA, Tarcsafalvi A, Diaz HB, et al. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *The Journal of cell biology*. 2003;162(2):281-91.
206. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell*. 1998;9(7):1863-71.
207. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature cell biology*. 2002;4(8):556-64.
208. Tarcic G, Boguslavsky SK, Wakim J, Kiuchi T, Liu A, Reinitz F, et al. An unbiased screen identifies DEP-1 tumor suppressor as a phosphatase controlling EGFR endocytosis. *Current biology : CB*. 2009;19(21):1788-98.
209. Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(2):739-44.
210. Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nature cell biology*. 2005;7(1):78-85.
211. Toledano-Katchalski H, Kraut J, Sines T, Granot-Attas S, Shohat G, Gil-Henn H, et al. Protein tyrosine phosphatase epsilon inhibits signaling by mitogen-activated protein kinases. *Molecular cancer research : MCR*. 2003;1(7):541-50.
212. Flint AJ, Tiganis T, Barford D, Tonks NK. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(5):1680-5.
213. Sacco F, Tinti M, Palma A, Ferrari E, Nardoza AP, Hooft van Huijsduijnen R, et al. Tumor suppressor density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) inhibits the RAS pathway by direct dephosphorylation of ERK1/2 kinases. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(33):22048-58.

214. Roda-Navarro P, Bastiaens PI. Dynamic recruitment of protein tyrosine phosphatase PTPD1 to EGF stimulation sites potentiates EGFR activation. *PloS one*. 2014;9(7):e103203.
215. Agazie YM, Hayman MJ. Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(21):7875-86.
216. Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Matsumoto K, Nishida E. Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(22):22992-5.
217. Kidger AM, Keyse SM. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin Cell Dev Biol*. 2016;50:125-32.
218. Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):41882-91.
219. Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science*. 1999;286(5449):2514-7.
220. Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. 1990;24:230-5.
221. Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM, Cohen P. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Current biology : CB*. 1995;5(3):283-95.
222. Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell*. 1993;75(5):887-97.
223. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical journal*. 2001;353(Pt 3):417-39.

224. Kins S, Kurosinski P, Nitsch RM, Gotz J. Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *The American journal of pathology*. 2003;163(3):833-43.
225. Wassarman DA, Solomon NM, Chang HC, Karim FD, Therrien M, Rubin GM. Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1-mediated photoreceptor development in *Drosophila*. *Genes & development*. 1996;10(3):272-8.
226. Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, et al. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(29):22300-4.
227. Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Current biology : CB*. 2003;13(16):1356-64.
228. Lake D, Correa SA, Muller J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(23):4397-413.
229. Northwood IC, Gonzalez FA, Wartmann M, Raden DL, Davis RJ. Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(23):15266-76.
230. Li X, Huang Y, Jiang J, Frank SJ. ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cellular signalling*. 2008;20(11):2145-55.
231. Sato K, Shin MS, Sakimura A, Zhou Y, Tanaka T, Kawanishi M, et al. Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation. *Cancer science*. 2013;104(10):1315-22.
232. Zakrzewska M, Haugsten EM, Nadratowska-Wesolowska B, Oppelt A, Hausott B, Jin Y, et al. ERK-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor receptor 1 on Ser777 inhibits signaling. *Science signaling*. 2013;6(262):ra11.
233. Turke AB, Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga CL, Asara JM, et al. MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer research*. 2012;72(13):3228-37.

234. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 2012;483(7387):100-3.
235. Wu Y, Chen Z, Ullrich A. EGFR and FGFR signaling through FRS2 is subject to negative feedback control by ERK1/2. *Biological chemistry*. 2003;384(8):1215-26.
236. Kamioka Y, Yasuda S, Fujita Y, Aoki K, Matsuda M. Multiple decisive phosphorylation sites for the negative feedback regulation of SOS1 via ERK. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(43):33540-8.
237. Saha M, Carriere A, Cheerathodi M, Zhang X, Lavoie G, Rush J, et al. RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. *The Biochemical journal*. 2012;447(1):159-66.
238. Douville E, Downward J. EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene*. 1997;15(4):373-83.
239. Balan V, Leicht DT, Zhu J, Balan K, Kaplun A, Singh-Gupta V, et al. Identification of novel in vivo Raf-1 phosphorylation sites mediating positive feedback Raf-1 regulation by extracellular signal-regulated kinase. *Molecular biology of the cell*. 2006;17(3):1141-53.
240. Baljuls A, Schmitz W, Mueller T, Zahedi RP, Sickmann A, Hekman M, et al. Positive regulation of A-RAF by phosphorylation of isoform-specific hinge segment and identification of novel phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(40):27239-54.
241. Hekman M, Fischer A, Wennogle LP, Wang YK, Campbell SL, Rapp UR. Novel C-Raf phosphorylation sites: serine 296 and 301 participate in Raf regulation. *FEBS letters*. 2005;579(2):464-8.
242. Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, et al. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular cell*. 2005;17(2):215-24.
243. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, et al. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(11):6486-93.
244. Ritt DA, Monson DM, Specht SI, Morrison DK. Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(3):806-19.

245. Brummer T, Naegele H, Reth M, Misawa Y. Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf. *Oncogene*. 2003;22(55):8823-34.
246. Rossomando AJ, Dent P, Sturgill TW, Marshak DR. Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(3):1594-602.
247. Brunet A, Pages G, Pouyssegur J. Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS letters*. 1994;346(2-3):299-303.
248. Eblen ST, Slack-Davis JK, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ, Catling AD. Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(6):2308-17.
249. Xu B, Wilsbacher JL, Collisson T, Cobb MH. The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(48):34029-35.
250. Nantel A, Mohammad-Ali K, Sherk J, Posner BI, Thomas DY. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(17):10475-84.
251. Whitmarsh AJ. Casein kinase 2 sends extracellular signal-regulated kinase nuclear. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(17):3512-4.
252. Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, Rubin GM. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*. 1995;83(6):879-88.
253. Kornfeld K, Hom DB, Horvitz HR. The *ksr-1* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell*. 1995;83(6):903-13.
254. Muller J, Ory S, Copeland T, Piwnicka-Worms H, Morrison DK. C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Molecular cell*. 2001;8(5):983-93.
255. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *The Biochemical journal*. 2005;392(Pt 2):249-61.
256. Kolch W, Calder M, Gilbert D. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS letters*. 2005;579(8):1891-5.

257. Canal F, Palygin O, Pankratov Y, Correa SA, Muller J. Compartmentalization of the MAPK scaffold protein KSR1 modulates synaptic plasticity in hippocampal neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(7):2362-72.
258. Zhang Z, Kobayashi S, Borczuk AC, Leidner RS, Laframboise T, Levine AD, et al. Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 2010;31(4):577-86.
259. Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, et al. Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *The Biochemical journal*. 2008;412(2):287-98.
260. Ozaki K, Kadomoto R, Asato K, Tanimura S, Itoh N, Kohno M. ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(5):1084-8.
261. Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature cell biology*. 2002;4(11):850-8.
262. Yusoff P, Lao DH, Ong SH, Wong ES, Lim J, Lo TL, et al. Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(5):3195-201.
263. Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, Sasaki M, et al. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nature cell biology*. 2003;5(5):427-32.
264. Ryan MB, Der CJ, Wang-Gillam A, Cox AD. Targeting RAS-mutant cancers: is ERK the key? *Trends in cancer*. 2015;1(3):183-98.
265. Beazely MA, Alan JK, Watts VJ. Protein kinase C and epidermal growth factor stimulation of Raf1 potentiates adenylyl cyclase type 6 activation in intact cells. *Molecular pharmacology*. 2005;67(1):250-9.
266. Ding Q, Gros R, Gray ID, Taussig R, Ferguson SS, Feldman RD. Raf kinase activation of adenylyl cyclases: isoform-selective regulation. *Molecular pharmacology*. 2004;66(4):921-8.

267. Osawa Y, Yim PD, Xu D, Panettieri RA, Emala CW. Raf-1 kinase mediates adenylyl cyclase sensitization by TNF-alpha in human airway smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(6):L1414-21.
268. Johnston CA, Watts VJ. Sensitization of adenylate cyclase: a general mechanism of neuroadaptation to persistent activation of Galpha(i/o)-coupled receptors? *Life sciences*. 2003;73(23):2913-25.
269. Pfliegerer P, Sumandea MP, Rybin VO, Wang C, Steinberg SF. Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase. *Journal of muscle research and cell motility*. 2009;30(1-2):67-72.
270. Sumandea MP, Pyle WG, Kobayashi T, de Tombe PP, Solaro RJ. Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(37):35135-44.
271. Broustas CG, Grammatikakis N, Eto M, Dent P, Brautigan DL, Kasid U. Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(4):3053-9.
272. Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Hirata M, Miwa Y, Morimoto S, Sasaguri T. Glycogen synthase kinase-3beta is tyrosine-phosphorylated by MEK1 in human skin fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;316(2):411-5.
273. Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *The Biochemical journal*. 2004;377(Pt 1):249-55.
274. Ren S, Johnson BG, Kida Y, Ip C, Davidson KC, Lin SL, et al. LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(4):1440-5.
275. Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, Carrier J, Rivard N. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/beta-catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene*. 2015;34(38):4914-27.
276. Cervenka I, Wolf J, Masek J, Krejci P, Wilcox WR, Kozubik A, et al. Mitogen-activated protein kinases promote WNT/beta-catenin signaling via phosphorylation of LRP6. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(1):179-89.

277. Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC. The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(46):43844-8.
278. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development*. 1998;12(22):3499-511.
279. Maki K, Ikuta K. MEK1/2 induces STAT5-mediated germline transcription of the TCRgamma locus in response to IL-7R signaling. *Journal of immunology*. 2008;181(1):494-502.
280. Jo C, Cho SJ, Jo SA. Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) stabilizes MyoD through direct phosphorylation at tyrosine 156 during myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(21):18903-13.
281. Tang Z, Dai S, He Y, Doty RA, Shultz LD, Sampson SB, et al. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. *Cell*. 2015;160(4):729-44.
282. Dayalan Naidu S, Sutherland C, Zhang Y, Risco A, de la Vega L, Caunt CJ, et al. Heat Shock Factor 1 Is a Substrate for p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Molecular and cellular biology*. 2016;36(18):2403-17.
283. Li W, Reeb AN, Lin B, Subramanian P, Fey EE, Knoverek CR, et al. Heat Shock-induced Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) by MAPK/ERK Kinase Regulates TDP-43 Function. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(12):5089-100.
284. Buratti E, Baralle FE. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA biology*. 2010;7(4):420-9.
285. Pan C, Olsen JV, Daub H, Mann M. Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(12):2796-808.
286. Old WM, Shabb JB, Houel S, Wang H, Coutts KL, Yen CY, et al. Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma. *Molecular cell*. 2009;34(1):115-31.
287. Kosako H, Yamaguchi N, Aranami C, Ushiyama M, Kose S, Imamoto N, et al. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nature structural & molecular biology*. 2009;16(10):1026-35.

288. Carlson SM, Chouinard CR, Labadorf A, Lam CJ, Schmelzle K, Fraenkel E, et al. Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3. *Science signaling*. 2011;4(196):rs11.
289. Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, et al. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO journal*. 1995;14(5):951-62.
290. Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*. 1992;358(6385):414-7.
291. Bahrami S, Drablos F. Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*. 2016;62:37-49.
292. Leppa S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *The EMBO journal*. 1998;17(15):4404-13.
293. Deng T, Karin M. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes & development*. 1993;7(3):479-90.
294. Vinciguerra M, Vivacqua A, Fasanella G, Gallo A, Cuzzo C, Morano A, et al. Differential phosphorylation of c-Jun and JunD in response to the epidermal growth factor is determined by the structure of MAPK targeting sequences. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(10):9634-41.
295. Baker SJ, Kerppola TK, Luk D, Vandenberg MT, Marshak DR, Curran T, et al. Jun is phosphorylated by several protein kinases at the same sites that are modified in serum-stimulated fibroblasts. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(10):4694-705.
296. O'Hagan RC, Tozer RG, Symons M, McCormick F, Hassell JA. The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene*. 1996;13(6):1323-33.
297. Sgouras DN, Athanasiou MA, Beal GJ, Jr., Fisher RJ, Blair DG, Mavrothalassitis GJ. ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *The EMBO journal*. 1995;14(19):4781-93.

298. Janknecht R, Monte D, Baert JL, de Launoit Y. The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene*. 1996;13(8):1745-54.
299. Yang BS, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, Stacey KJ, et al. Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(2):538-47.
300. Rebay I, Rubin GM. Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell*. 1995;81(6):857-66.
301. Charlot C, Dubois-Pot H, Serchov T, Tournette Y, Wasylyk B. A review of post-translational modifications and subcellular localization of Ets transcription factors: possible connection with cancer and involvement in the hypoxic response. *Methods in molecular biology*. 2010;647:3-30.
302. Li QJ, Yang SH, Maeda Y, Sladek FM, Sharrocks AD, Martins-Green M. MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300. *The EMBO journal*. 2003;22(2):281-91.
303. Ducret C, Maira SM, Dierich A, Wasylyk B. The net repressor is regulated by nuclear export in response to anisomycin, UV, and heat shock. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(10):7076-87.
304. Selvaraj N, Kedage V, Hollenhorst PC. Comparison of MAPK specificity across the ETS transcription factor family identifies a high-affinity ERK interaction required for ERG function in prostate cells. *Cell communication and signaling : CCS*. 2015;13:12.
305. Kedage V, Strittmatter BG, Dausinas PB, Hollenhorst PC. Phosphorylation of the oncogenic transcription factor ERG in prostate cells dissociates polycomb repressive complex 2, allowing target gene activation. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(42):17225-35.
306. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Chang LL, Cheng AL. Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. *Oncogene*. 2004;23(20):3580-8.
307. Cheng Y, Qiu F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. ERK and JNK mediate TNFalpha-induced p53 activation in apoptotic and autophagic L929 cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;376(3):483-8.

308. Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, et al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature cell biology*. 2008;10(2):138-48.
309. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current biology : CB*. 2000;10(19):1201-4.
310. Fisher TL, Blenis J. Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(3):1212-9.
311. Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/pp90rsk that are inducible by MAPK. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(3):1496-505.
312. Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *The Biochemical journal*. 2012;441(2):553-69.
313. Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, et al. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal*. 2006;25(12):2781-91.
314. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal*. 2001;20(16):4370-9.
315. Blenis J, Chung J, Erikson E, Alcorta DA, Erikson RL. Distinct mechanisms for the activation of the RSK kinases/MAP2 kinase/pp90rsk and pp70-S6 kinase signaling systems are indicated by inhibition of protein synthesis. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1991;2(6):279-85.
316. Anjum R, Roux PP, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Current biology : CB*. 2005;15(19):1762-7.
317. Schouten GJ, Vertegaal AC, Whiteside ST, Israel A, Toebes M, Dorsman JC, et al. IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase. *The EMBO journal*. 1997;16(11):3133-44.

318. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005;121(2):179-93.
319. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(37):13489-94.
320. Korneeva NL, Song A, Gram H, Edens MA, Rhoads RE. Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-interacting Kinase (MNK) Preferentially Affects Translation of mRNAs Containing Both a 5'-Terminal Cap and Hairpin. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(7):3455-67.
321. Flynn A, Vries RG, Proud CG. Signalling pathways which regulate eIF4E. *Biochemical Society transactions*. 1997;25(2):192S.
322. Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC. 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. *The EMBO journal*. 1999;18(17):4779-93.
323. Drohic B, Perez-Cadahia B, Yu J, Kung SK, Davie JR. Promoter chromatin remodeling of immediate-early genes is mediated through H3 phosphorylation at either serine 28 or 10 by the MSK1 multi-protein complex. *Nucleic acids research*. 2010;38(10):3196-208.
324. Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, et al. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Molecular cell*. 2005;20(2):199-211.
325. Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, et al. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO journal*. 2003;22(11):2788-97.
326. Ishibe S, Joly D, Zhu X, Cantley LG. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Molecular cell*. 2003;12(5):1275-85.
327. Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. 2001;20(44):6459-72.

328. Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(12):10452-8.
329. Marklund U, Brattsand G, Shingler V, Gullberg M. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(20):15039-47.
330. Marklund U, Larsson N, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *The EMBO journal*. 1996;15(19):5290-8.
331. Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(1):18-24.
332. Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation. *PLoS one*. 2016;11(1):e0147103.
333. Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation of Rac1 T108 by extracellular signal-regulated kinase in response to epidermal growth factor: a novel mechanism to regulate Rac1 function. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(22):4538-51.
334. Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Yanagihara K, Sakamoto H, et al. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer research*. 2005;65(6):2115-24.
335. Graham SM, Oldham SM, Martin CB, Drugan JK, Zohn IE, Campbell S, et al. TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene*. 1999;18(12):2107-16.
336. Lee JH, Pyon JK, Lee SH, Lee YJ, Kang SG, Kim CH, et al. Greater expression of TC21/R-ras2 in highly aggressive malignant skin cancer. *International journal of dermatology*. 2011;50(8):956-60.
337. Clark GJ, Kinch MS, Gilmer TM, Burridge K, Der CJ. Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene*. 1996;12(1):169-76.
338. Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Shokat KM, et al. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nature cell biology*. 2001;3(3):325-30.

339. Matter N, Herrlich P, Konig H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature*. 2002;420(6916):691-5.
340. Locatelli A, Lange CA. Met receptors induce Sam68-dependent cell migration by activation of alternate extracellular signal-regulated kinase family members. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(24):21062-72.
341. Paronetto MP, Cappellari M, Busa R, Pedrotti S, Vitali R, Comstock C, et al. Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68. *Cancer research*. 2010;70(1):229-39.
342. Valacca C, Bonomi S, Buratti E, Pedrotti S, Baralle FE, Sette C, et al. Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *The Journal of cell biology*. 2010;191(1):87-99.
343. Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *The Journal of cell biology*. 2007;176(7):929-39.
344. Song J, Richard S. Sam68 Regulates S6K1 Alternative Splicing during Adipogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(11):1926-39.
345. Huot ME, Vogel G, Zabarauskas A, Ngo CT, Coulombe-Huntington J, Majewski J, et al. The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis. *Molecular cell*. 2012;46(2):187-99.
346. Al-Ayoubi AM, Zheng H, Liu Y, Bai T, Eblen ST. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation of splicing factor 45 (SPF45) regulates SPF45 alternative splicing site utilization, proliferation, and cell adhesion. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(14):2880-93.
347. Morton S, Yang HT, Moleleki N, Campbell DG, Cohen P, Rousseau S. Phosphorylation of the ARE-binding protein DAZAP1 by ERK2 induces its dissociation from DAZ. *The Biochemical journal*. 2006;399(2):265-73.
348. Choudhury R, Roy SG, Tsai YS, Tripathy A, Graves LM, Wang Z. The splicing activator DAZAP1 integrates splicing control into MEK/Erk-regulated cell proliferation and migration. *Nature communications*. 2014;5:3078.

349. Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, et al. A requirement for ERK-dependent Dicer phosphorylation in coordinating oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Developmental cell*. 2014;31(5):614-28.
350. Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell*. 2009;139(1):112-22.
351. Frost JA, Geppert TD, Cobb MH, Feramisco JR. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(9):3844-8.
352. Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(11):6508-16.
353. Merchant JL, Du M, Todisco A. Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;254(2):454-61.
354. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development*. 2000;14(19):2501-14.
355. Ma RY, Tong TH, Cheung AM, Tsang AC, Leung WY, Yao KM. Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 4):795-806.
356. Edmunds JW, Mahadevan LC. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 17):3715-23.
357. Hu S, Xie Z, Onishi A, Yu X, Jiang L, Lin J, et al. Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell*. 2009;139(3):610-22.
358. McReynolds AC, Karra AS, Li Y, Lopez ED, Turjanski AG, Dioum E, et al. Phosphorylation or Mutation of the ERK2 Activation Loop Alters Oligonucleotide Binding. *Biochemistry*. 2016;55(12):1909-17.
359. Liu YZ, Thomas NS, Latchman DS. CBP associates with the p42/p44 MAPK enzymes and is phosphorylated following NGF treatment. *Neuroreport*. 1999;10(6):1239-43.

360. Font de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(14):5041-7.
361. Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(6):4475-83.
362. Misra P, Owuor ED, Li W, Yu S, Qi C, Meyer K, et al. Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(50):48745-54.
363. Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, Blenis J, et al. A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(10):6260-73.
364. Heidenreich O, Neining A, Schrott G, Zinck R, Cahill MA, Engel K, et al. MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(20):14434-43.
365. Buck M, Poli V, Hunter T, Chojkier M. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Molecular cell*. 2001;8(4):807-16.
366. Wu J, Janknecht R. Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(45):42669-79.
367. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO journal*. 1996;15(17):4629-42.
368. Bonnet F, Vigneron M, Bensaude O, Dubois MF. Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic acids research*. 1999;27(22):4399-404.
369. Tee WW, Shen SS, Oksuz O, Narendra V, Reinberg D. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell*. 2014;156(4):678-90.

370. Joshi S, Plataniias LC. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World journal of biological chemistry*. 2014;5(3):321-33.
371. Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(15):6539-49.
372. Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(32):14134-9.
373. Phillips A, Blaydes JP. MNK1 and EIF4E are downstream effectors of MEKs in the regulation of the nuclear export of HDM2 mRNA. *Oncogene*. 2008;27(11):1645-9.
374. Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer research*. 2004;64(23):8639-42.
375. von Der Haar T, Ball PD, McCarthy JE. Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(39):30551-5.
376. Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(5):3303-9.
377. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(19):14056-64.
378. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development*. 2001;15(21):2852-64.
379. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004;18(16):1926-45.
380. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 2009;136(4):731-45.

381. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 1994;371(6500):762-7.
382. Meyuhas O. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International review of cell and molecular biology*. 2008;268:1-37.
383. Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, et al. S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(8):3112-24.
384. Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovitch-Rain M, Nir T, et al. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development*. 2005;19(18):2199-211.
385. Rogers GW, Jr., Richter NJ, Lima WF, Merrick WC. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(33):30914-22.
386. Cheadle JP, Reeve MP, Sampson JR, Kwiatkowski DJ. Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Human genetics*. 2000;107(2):97-114.
387. Grasso L, Suska O, Davidson L, Gonatopoulos-Pournatzis T, Williamson R, Wasmus L, et al. mRNA Cap Methylation in Pluripotency and Differentiation. *Cell reports*. 2016;16(5):1352-65.
388. Gonatopoulos-Pournatzis T, Dunn S, Bounds R, Cowling VH. RAM/Fam103a1 is required for mRNA cap methylation. *Molecular cell*. 2011;44(4):585-96.
389. Missan DS, Mitchell K, Subbaram S, DiPersio CM. Integrin alpha3beta1 signaling through MEK/ERK determines alternative polyadenylation of the MMP-9 mRNA transcript in immortalized mouse keratinocytes. *PloS one*. 2015;10(3):e0119539.
390. Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal*. 2001;20(17):4987-97.
391. Hachet O, Ephrussi A. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature*. 2004;428(6986):959-63.

392. Kozlovski I, Siegfried Z, Amar-Schwartz A, Karni R. The role of RNA alternative splicing in regulating cancer metabolism. *Human genetics*. 2017.
393. Herzel L, Ottoz DSM, Alpert T, Neugebauer KM. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(10):637-50.
394. Grabowski PJ, Seiler SR, Sharp PA. A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell*. 1985;42(1):345-53.
395. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):108-21.
396. Chen HC, Cheng SC. Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience reports*. 2012;32(4):345-59.
397. Wassarman DA, Steitz JA. RNA splicing. Alive with DEAD proteins. *Nature*. 1991;349(6309):463-4.
398. Jankowsky E. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(1):19-29.
399. Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current opinion in cell biology*. 1999;11(3):363-71.
400. Zahler AM, Lane WS, Stolk JA, Roth MB. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes & development*. 1992;6(5):837-47.
401. Barash Y, Calarco JA, Gao W, Pan Q, Wang X, Shai O, et al. Deciphering the splicing code. *Nature*. 2010;465(7294):53-9.
402. Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell*. 2003;12(1):5-14.
403. Gazzara MR, Vaquero-Garcia J, Lynch KW, Barash Y. In silico to in vivo splicing analysis using splicing code models. *Methods*. 2014;67(1):3-12.
404. Manabe T, Katayama T, Sato N, Gomi F, Hitomi J, Yanagita T, et al. Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation*. 2003;10(6):698-708.
405. Fu RH, Liu SP, Huang SJ, Chen HJ, Chen PR, Lin YH, et al. Aberrant alternative splicing events in Parkinson's disease. *Cell transplantation*. 2013;22(4):653-61.

406. Fan X, Tang L. Aberrant and alternative splicing in skeletal system disease. *Gene*. 2013;528(1):21-6.
407. Fackenthal JD, Godley LA. Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cells. *Disease models & mechanisms*. 2008;1(1):37-42.
408. Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*. 2016;35(19):2413-27.
409. Zhou J, Chng WJ. Aberrant RNA splicing and mutations in spliceosome complex in acute myeloid leukemia. *Stem cell investigation*. 2017;4:6.
410. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 1993;74(4):597-608.
411. Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 2001;34(1):55-61.
412. Wang Y, Chen D, Qian H, Tsai YS, Shao S, Liu Q, et al. The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer cell*. 2014;26(3):374-89.
413. Shapiro BA, Vu NT, Shultz MD, Shultz JC, Mietla JA, Gouda MM, et al. Melanoma Differentiation-associated Gene 7/IL-24 Exerts Cytotoxic Effects by Altering the Alternative Splicing of Bcl-x Pre-mRNA via the SRC/PKCdelta Signaling Axis. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(41):21669-81.
414. Revil T, Pelletier J, Toutant J, Cloutier A, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(32):21458-67.
415. Cloutier P, Toutant J, Shkreta L, Goekjian S, Revil T, Chabot B. Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(31):21315-24.
416. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
417. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

418. Lodomery M. Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. *International journal of cell biology*. 2013;2013:463786.
419. Das S, Krainer AR. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Molecular cancer research : MCR*. 2014;12(9):1195-204.
420. Anczukow O, Akerman M, Clery A, Wu J, Shen C, Shirole NH, et al. SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer. *Molecular cell*. 2015;60(1):105-17.
421. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(3):185-93.
422. Best A, Daghiesh C, Ehrmann I, Kheirollahi-Kouhestani M, Tyson-Capper A, Elliott DJ. Expression of Tra2 beta in Cancer Cells as a Potential Contributory Factor to Neoplasia and Metastasis. *International journal of cell biology*. 2013;2013:843781.
423. Watermann DO, Tang Y, Zur Hausen A, Jager M, Stamm S, Stickeler E. Splicing factor Tra2-beta1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene. *Cancer research*. 2006;66(9):4774-80.
424. Jia R, Li C, McCoy JP, Deng CX, Zheng ZM. SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance. *International journal of biological sciences*. 2010;6(7):806-26.
425. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ. Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene*. 2004;23(58):9369-80.
426. Goncalves V, Henriques AF, Pereira JF, Neves Costa A, Moyer MP, Moita LF, et al. Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor-related Rac1b in colorectal cells. *Rna*. 2014;20(4):474-82.
427. Aubol BE, Plocinik RM, Hagopian JC, Ma CT, McGlone ML, Bandyopadhyay R, et al. Partitioning RS domain phosphorylation in an SR protein through the CLK and SRPK protein kinases. *Journal of molecular biology*. 2013;425(16):2894-909.
428. Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, et al. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *The EMBO journal*. 1996;15(2):265-75.

429. Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE, Davidowitz K, et al. Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(14):14302-9.
430. Vu NT, Park MA, Shultz JC, Goehe RW, Hoeflerlin LA, Shultz MD, et al. hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(12):8575-84.
431. Kajitani N, Glahder J, Wu C, Yu H, Nilsson K, Schwartz S. hnRNP L controls HPV16 RNA polyadenylation and splicing in an Akt kinase-dependent manner. *Nucleic acids research*. 2017;45(16):9654-78.
432. Blaustein M, Pelisch F, Coso OA, Bissell MJ, Kornblihtt AR, Srebrow A. Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(20):21029-37.
433. Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, et al. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Molecular cell*. 2012;47(3):422-33.
434. Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, et al. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(36):24512-25.
435. Cicens J. The potential role of Akt phosphorylation in human cancers. *The International journal of biological markers*. 2008;23(1):1-9.
436. Krishnakumar S, Mohan A, Kandam M, Ramkumar HL, Venkatesan N, Das RR. SRPK1: a cisplatin sensitive protein expressed in retinoblastoma. *Pediatric blood & cancer*. 2008;50(2):402-6.
437. Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer research*. 2007;67(5):2072-80.
438. Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773(8):1299-310.
439. Morgan DO. *The cell cycle : principles of control*. Oxford: Oxford University Press; 2012.

440. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, et al. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 1997;277(5331):1497-501.
441. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 1997;91(3):325-34.
442. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*. 1997;420(1):25-7.
443. St Clair S, Giono L, Varmeh-Ziaie S, Resnick-Silverman L, Liu WJ, Padi A, et al. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Molecular cell*. 2004;16(5):725-36.
444. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001;20(15):1803-15.
445. Woo RA, Poon RY. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell cycle*. 2003;2(4):316-24.
446. Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*. 2004;117(2):239-51.
447. Cho YY, Tang F, Yao K, Lu C, Zhu F, Zheng D, et al. Cyclin-dependent kinase-3-mediated c-Jun phosphorylation at Ser63 and Ser73 enhances cell transformation. *Cancer research*. 2009;69(1):272-81.
448. Garrett S, Barton WA, Knights R, Jin P, Morgan DO, Fisher RP. Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(1):88-99.
449. Serizawa H, Makela TP, Conaway JW, Conaway RC, Weinberg RA, Young RA. Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIID. *Nature*. 1995;374(6519):280-2.
450. Ramanathan Y, Rajpara SM, Reza SM, Lees E, Shuman S, Mathews MB, et al. Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(14):10913-20.
451. Zhou M, Halanski MA, Radonovich MF, Kashanchi F, Peng J, Price DH, et al. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-

terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(14):5077-86.

452. Guen VJ, Gamble C, Flajolet M, Unger S, Thollet A, Ferandin Y, et al. CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(48):19525-30.

453. Bartkowiak B, Liu P, Phatnani HP, Fuda NJ, Cooper JJ, Price DH, et al. CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes & development*. 2010;24(20):2303-16.

454. Chen HH, Wang YC, Fann MJ. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(7):2736-45.

455. Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeusen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z, et al. The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes & development*. 2011;25(20):2158-72.

456. Bosken CA, Farnung L, Hintermair C, Merzel Schachter M, Vogel-Bachmayr K, Blazek D, et al. The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nature communications*. 2014;5:3505.

457. Chila R, Guffanti F, Damia G. Role and therapeutic potential of CDK12 in human cancers. *Cancer treatment reviews*. 2016;50:83-8.

458. Tien JF, Mazloomian A, Cheng SG, Hughes CS, Chow CCT, Canapi LT, et al. CDK12 regulates alternative last exon mRNA splicing and promotes breast cancer cell invasion. *Nucleic acids research*. 2017;45(11):6698-716.

459. Okuda K, Sanghera JS, Pelech SL, Kanakura Y, Hallek M, Griffin JD, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. *Blood*. 1992;79(11):2880-7.

460. Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(18):8319-23.

461. Frost JA, Alberts AS, Sontag E, Guan K, Mumby MC, Feramisco JR. Simian virus 40 small t antigen cooperates with mitogen-activated kinases to stimulate AP-1 activity. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(9):6244-52.
462. Watanabe G, Howe A, Lee RJ, Albanese C, Shu IW, Karnezis AN, et al. Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):12861-6.
463. Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature*. 1988;334(6183):629-31.
464. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta*. 1991;1072(2-3):129-57.
465. Monje P, Hernandez-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(42):35081-4.
466. Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ. Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene*. 1994;9(12):3635-45.
467. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development*. 1993;7(5):812-21.
468. Sherr CJ, Matsushime H, Roussel MF. Regulation of CYL/cyclin D genes by colony-stimulating factor 1. *Ciba Foundation symposium*. 1992;170:209-19; discussion 19-26.
469. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes & development*. 1993;7(3):331-42.
470. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81(3):323-30.
471. Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1):61-8.
472. Zwicker J, Liu N, Engeland K, Lucibello FC, Muller R. Cell cycle regulation of E2F site occupation in vivo. *Science*. 1996;271(5255):1595-7.

473. Pagano M, Theodoras AM, Tam SW, Draetta GF. Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes & development*. 1994;8(14):1627-39.
474. Fukami-Kobayashi J, Mitsui Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Experimental cell research*. 1999;246(2):338-47.
475. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, et al. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature*. 2000;403(6767):328-32.
476. Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular cell*. 2006;21(5):629-39.
477. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2005;69(1):79-100.
478. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, et al. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(28):20293-7.
479. Heald R, McKeon F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*. 1990;61(4):579-89.
480. Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science*. 1998;282(5388):487-90.
481. Roberts EC, Shapiro PS, Nahreini TS, Pages G, Pouyssegur J, Ahn NG. Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(20):7226-41.
482. Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(20):11335-40.
483. Das D, Pintucci G, Stern A. MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS letters*. 2000;472(1):50-2.

484. Ding Q, Wang Q, Evers BM. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;284(2):282-8.
485. Lovicu FJ, McAvoy JW. FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development*. 2001;128(24):5075-84.
486. Porras A, Muszynski K, Rapp UR, Santos E. Dissociation between activation of Raf-1 kinase and the 42-kDa mitogen-activated protein kinase/90-kDa S6 kinase (MAPK/RSK) cascade in the insulin/Ras pathway of adipocytic differentiation of 3T3 L1 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(17):12741-8.
487. Sabbagh W, Jr., Flatauer LJ, Bardwell AJ, Bardwell L. Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Molecular cell*. 2001;8(3):683-91.
488. Li YQ. Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cellular reprogramming*. 2010;12(1):3-13.
489. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell research*. 2007;17(1):42-9.
490. Kraushaar DC, Zhao K. The epigenomics of embryonic stem cell differentiation. *International journal of biological sciences*. 2013;9(10):1134-44.
491. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915-26.
492. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
493. Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, et al. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2006;11(7):805-14.
494. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 1999;236(1):87-95.
495. Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature genetics*. 2007;39(3):391-6.

496. Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Molecular cancer research* : MCR. 2004;2(1):62-72.
497. Gordon CA, Hartono SR, Chedin F. Inactive DNMT3B splice variants modulate de novo DNA methylation. *PLoS one*. 2013;8(7):e69486.
498. Duymich CE, Charlet J, Yang X, Jones PA, Liang G. DNMT3B isoforms without catalytic activity stimulate gene body methylation as accessory proteins in somatic cells. *Nature communications*. 2016;7:11453.
499. Akel S, Bertolette D, Petrow-Sadowski C, Ruscetti FW. Levels of Smad7 regulate Smad and mitogen activated kinases (MAPKs) signaling and controls erythroid and megakaryocytic differentiation of erythroleukemia cells. *Platelets*. 2007;18(8):566-78.
500. Melemed AS, Ryder JW, Vik TA. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells. *Blood*. 1997;90(9):3462-70.
501. Uchida M, Kirito K, Shimizu R, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N. A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *International journal of hematology*. 2001;73(1):78-83.
502. Racke FK, Lewandowska K, Goueli S, Goldfarb AN. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(37):23366-70.
503. Li Z, Theus MH, Wei L. Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Development, growth & differentiation*. 2006;48(8):513-23.
504. Ding HT, Wang CG, Zhang TL, Wang K. Fibronectin enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via ERK pathway. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;99(5):1343-52.
505. Jo C, Kim H, Jo I, Choi I, Jung SC, Kim J, et al. Leukemia inhibitory factor blocks early differentiation of skeletal muscle cells by activating ERK. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1743(3):187-97.

506. Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, et al. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):14443-50.
507. Michailovici I, Harrington HA, Azogui HH, Yahalom-Ronen Y, Plotnikov A, Ching S, et al. Nuclear to cytoplasmic shuttling of ERK promotes differentiation of muscle stem/progenitor cells. *Development*. 2014;141(13):2611-20.
508. Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousailleakh M, Wray J, Meloche S, Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*. 2007;134(16):2895-902.
509. Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental biology*. 1999;210(1):30-43.
510. Hamilton WB, Kaji K, Kunath T. ERK2 suppresses self-renewal capacity of embryonic stem cells, but is not required for multi-lineage commitment. *PloS one*. 2013;8(4):e60907.
511. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008;453(7194):519-23.
512. Kim KW, Kim SH, Lee EY, Kim ND, Kang HS, Kim HD, et al. Extracellular signal-regulated kinase/90-KDA ribosomal S6 kinase/nuclear factor-kappa B pathway mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(16):13186-91.
513. Ohta S, Nishida E, Yamanaka S, Yamamoto T. Global splicing pattern reversion during somatic cell reprogramming. *Cell reports*. 2013;5(2):357-66.
514. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947-56.
515. Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, Slobodeniuc V, O'Hanlon D, Sung HK, et al. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell*. 2011;147(1):132-46.
516. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature medicine*. 2013;19(8):1047-53.
517. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers*. 2016;8(4).

518. Kirsten WH, Mayer LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1967;39(2):311-35.
519. Harvey JJ. An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature*. 1964;204:1104-5.
520. Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature*. 1982;300(5894):762-5.
521. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*. 1982;298(5872):343-7.
522. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*. 1982;297(5866):474-8.
523. Marshall CJ, Hall A, Weiss RA. A transforming gene present in human sarcoma cell lines. *Nature*. 1982;299(5879):171-3.
524. Cooper GM, Lane MA. Cellular transforming genes and oncogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 1984;738(1-2):9-20.
525. Castellano E, Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;346:143-69.
526. Herrmann C. Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struc Biol*. 2003;13(1):122-9.
527. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(20):10983-5.
528. Hofer F, Fields S, Schneider C, Martin GS. Activated Ras Interacts with the Ral Guanine-Nucleotide Dissociation Stimulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(23):11089-93.
529. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, et al. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*. 1997;89(3):457-67.
530. Henry DO, Moskalenko SA, Kaur KJ, Fu M, Pestell RG, Camonis JH, et al. Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF-kappaB. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(21):8084-92.

531. Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, et al. Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *The EMBO journal*. 1999;18(13):3629-42.
532. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-90.
533. Dinu D, Dobre M, Panaitescu E, Birla R, Iosif C, Hoara P, et al. Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study. *Journal of medicine and life*. 2014;7(4):581-7.
534. Murugan AK, Dong J, Xie J, Xing M. MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas. *Cell cycle*. 2009;8(13):2122-4.
535. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
536. Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, et al. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes & development*. 1997;11(21):2822-34.
537. Ouerhani S, Elgaaied AB. The mutational spectrum of HRAS, KRAS, NRAS and FGFR3 genes in bladder cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2011;10(6):259-66.
538. Hah JH, Zhao M, Pickering CR, Frederick MJ, Andrews GA, Jasser SA, et al. HRAS mutations and resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head & neck*. 2014;36(11):1547-54.
539. Beukers W, Hercegovac A, Zwarthoff EC. HRAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*. 2014;22(6):837-9.
540. Emuss V, Garnett M, Mason C, Marais R. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer research*. 2005;65(21):9719-26.
541. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(7):4378-83.

542. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO journal*. 1999;18(8):2137-48.
543. Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Molecular cell*. 2005;20(6):963-9.
544. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006;439(7074):358-62.
545. FDA approves Gleevec for leukemia treatment. *FDA consumer*. 2001;35(4):6.
546. Kantarjian HM, Talpaz M. Imatinib mesylate: clinical results in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Seminars in oncology*. 2001;28(5 Suppl 17):9-18.
547. Gross DJ, Munter G, Bitan M, Siegal T, Gabizon A, Weitzen R, et al. The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(2):535-40.
548. Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, Stevens T, Carius B, Gschaidmeier H, et al. In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia*. 2003;17(6):999-1009.
549. Matei D, Chang DD, Jeng MH. Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependent on platelet-derived growth factor receptor alpha and Akt inactivation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(2):681-90.
550. Abdel-Aziz AK, Mantawy EM, Said RS, Helwa R. The tyrosine kinase inhibitor, sunitinib malate, induces cognitive impairment in vivo via dysregulating VEGFR signaling, apoptotic and autophagic machineries. *Experimental neurology*. 2016;283(Pt A):129-41.
551. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD, Jr., Morse D, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(4):1212-8.
552. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine*. 2011;364(6):501-13.

553. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(2):123-32.
554. Chu SC, Tang JL, Li CC. Dasatinib in chronic myelogenous leukemia. *The New England journal of medicine*. 2006;355(10):1062-3; author reply 3-4.
555. Finn RS, Dering J, Ginther C, Wilson CA, Glaspy P, Tchekmedyian N, et al. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast cancer research and treatment*. 2007;105(3):319-26.
556. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*. 2010;464(7287):431-5.
557. Holderfield M, Nagel TE, Stuart DD. Mechanism and consequences of RAF kinase activation by small-molecule inhibitors. *British journal of cancer*. 2014;111(4):640-5.
558. Holderfield M, Merritt H, Chan J, Wallroth M, Tandeske L, Zhai H, et al. RAF inhibitors activate the MAPK pathway by relieving inhibitory autophosphorylation. *Cancer cell*. 2013;23(5):594-602.
559. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(7):455-67.
560. Duncia JV, Santella JB, 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Frieze WE, et al. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 1998;8(20):2839-44.
561. Delaney AM, Printen JA, Chen H, Fauman EB, Dudley DT. Identification of a novel mitogen-activated protein kinase kinase activation domain recognized by the inhibitor PD 184352. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(21):7593-602.
562. Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, Waterhouse D, Hecht JR, Natale RB, et al. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(22):4456-62.

563. Sausville EA. Promises from trametinib in RAF active tumors. *The New England journal of medicine*. 2012;367(2):171-2.
564. Wright CJ, McCormack PL. Trametinib: first global approval. *Drugs*. 2013;73(11):1245-54.
565. Hatzivassiliou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, et al. Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. *Nature*. 2013;501(7466):232-6.
566. Pratils CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4519-24.
567. Maik-Rachline G, Seger R. The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2016;25:1-12.
568. Jha S, Morris EJ, Hruza A, Mansueto MS, Schroeder GK, Arbanas J, et al. Dissecting Therapeutic Resistance to ERK Inhibition. *Molecular cancer therapeutics*. 2016;15(4):548-59.
569. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *The New England journal of medicine*. 2015;372(1):30-9.
570. Long GV, Eroglu Z, Infante J, Patel S, Daud A, Johnson DB, et al. Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;JCO2017741025.
571. Sanchez-Hernandez I, Baquero P, Calleros L, Chiloeches A. Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/AKT/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK-independent mechanism. *Cancer letters*. 2012;314(2):244-55.
572. Kim YH. Dual inhibition of BRAF and MEK in BRAF-mutated metastatic non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2016;8(9):2369-71.
573. Navarro M, Nicolas A, Ferrandez A, Lanás A. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(20):3632-42.

574. cancer Scd. Statistiques sur le cancer colorectal 2017 [cited 2017 27 Oct]. Available from: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/colorectal/statistics/?region=on>.
575. Roncucci L, Mariani F. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? *European journal of internal medicine*. 2015;26(10):752-6.
576. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
577. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(14):9433-8.
578. Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016;469(2):125-34.
579. Cong F, Schweizer L, Chamorro M, Varmus H. Requirement for a nuclear function of beta-catenin in Wnt signaling. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(23):8462-70.
580. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*. 1976;48(2):461-5.
581. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 1982;31(1):99-109.
582. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell*. 1992;69(7):1073-87.
583. McMahon AP, Moon RT. int-1--a proto-oncogene involved in cell signalling. *Development*. 1989;107 Suppl:161-7.
584. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 1991;64(2):231.
585. Wang HX, Tekpetey FR, Kidder GM. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. *Molecular human reproduction*. 2009;15(1):11-7.
586. Gergen JP, Wieschaus EF. Localized requirements for gene activity in segmentation of *Drosophila* embryos: analysis of armadillo, fused, giant and unpaired mutations in mosaic embryos. *Roux's archives of developmental biology : the official organ of the EDBO*. 1986;195(1):49-62.

587. Wieschaus E, Riggelman R. Autonomous requirements for the segment polarity gene *armadillo* during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*. 1987;49(2):177-84.
588. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(11):4246-50.
589. Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *The Journal of cell biology*. 1994;124(5):729-41.
590. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the *armadillo* protein in *Drosophila* (*plakoglobin*) associated with E-cadherin. *Science*. 1991;254(5036):1359-61.
591. Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P. Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(5):2128-34.
592. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997;275(5307):1787-90.
593. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(4):364-71.
594. Nelson S, Nathke IS. Interactions and functions of the adenomatous polyposis coli (APC) protein at a glance. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 4):873-7.
595. Astudillo P, Larrain J. Wnt signaling and cell-matrix adhesion. *Current molecular medicine*. 2014;14(2):209-20.
596. Hoover BA. Beta-catenin Mediated Wnt Signaling as a Marker for Characterization of Human Bone Marrow-Derived Connective Tissue Progenitor Cells. *Journal of Young Investigators*. 2005.
597. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell calcium*. 2005;38(3-4):439-46.
598. Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2011;240(3):616-26.

599. Gomez-Orte E, Saenz-Narciso B, Moreno S, Cabello J. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends in genetics : TIG*. 2013;29(9):545-53.
600. Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*. 2001;107(7):843-54.
601. Herman M. C. elegans POP-1/TCF functions in a canonical Wnt pathway that controls cell migration and in a noncanonical Wnt pathway that controls cell polarity. *Development*. 2001;128(4):581-90.
602. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(6):1130-4.
603. Ahadova A, von Knebel Doeberitz M, Blaker H, Kloor M. CTNNB1-mutant colorectal carcinomas with immediate invasive growth: a model of interval cancers in Lynch syndrome. *Familial cancer*. 2016;15(4):579-86.
604. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281(5382):1509-12.
605. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology*. 1999;155(4):1033-8.
606. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 2012;336(6088):1549-54.
607. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398(6726):422-6.
608. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(2):150-8.
609. Ayadi M, Bouygues A, Ouaret D, Ferrand N, Chouaib S, Thiery JP, et al. Chronic chemotherapeutic stress promotes evolution of stemness and WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells: implications for clinical use of WNT-signaling inhibitors. *Oncotarget*. 2015;6(21):18518-33.
610. Liu D, Du L, Chen D, Ye Z, Duan H, Tu T, et al. Reduced CD146 expression promotes tumorigenesis and cancer stemness in colorectal cancer through activating Wnt/beta-catenin signaling. *Oncotarget*. 2016;7(26):40704-18.

611. Adamo A, Fiore D, De Martino F, Roscigno G, Affinito A, Donnarumma E, et al. RYK promotes the stemness of glioblastoma cells via the WNT/ beta-catenin pathway. *Oncotarget*. 2017;8(8):13476-87.
612. Chen MJ, Wu DW, Wang YC, Chen CY, Lee H. PAK1 confers chemoresistance and poor outcome in non-small cell lung cancer via beta-catenin-mediated stemness. *Scientific reports*. 2016;6:34933.
613. Martins-Neves SR, Paiva-Oliveira DI, Wijers-Koster PM, Abrunhosa AJ, Fontes-Ribeiro C, Bovee JV, et al. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer letters*. 2016;370(2):286-95.
614. Zhao Z, Song Z, Liao Z, Liu Z, Sun H, Lei B, et al. PKM2 promotes stemness of breast cancer cell by through Wnt/beta-catenin pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(3):4223-34.
615. Bie Q, Sun C, Gong A, Li C, Su Z, Zheng D, et al. Non-tumor tissue derived interleukin-17B activates IL-17RB/AKT/beta-catenin pathway to enhance the stemness of gastric cancer. *Scientific reports*. 2016;6:25447.
616. Huang H, Chen Z, Ni X. Tissue transglutaminase-1 promotes stemness and chemoresistance in gastric cancer cells by regulating Wnt/beta-catenin signaling. *Experimental biology and medicine*. 2017;242(2):194-202.
617. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(1):51-9.
618. Gehren AS, Rocha MR, de Souza WF, Morgado-Diaz JA. Alterations of the apical junctional complex and actin cytoskeleton and their role in colorectal cancer progression. *Tissue barriers*. 2015;3(3):e1017688.
619. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 3):499-511.
620. Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2011;91(10):1443-58.

621. Konsavage WM, Jr., Kyler SL, Rennoll SA, Jin G, Yochum GS. Wnt/beta-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(15):11730-9.
622. Luo F, Brooks DG, Ye H, Hamoudi R, Pouligiannis G, Patek CE, et al. Mutated K-ras(Asp12) promotes tumourigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *International journal of experimental pathology*. 2009;90(5):558-74.
623. Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min do S, Choi KY. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(2):djt373.
624. Sansom OJ, Meniel V, Wilkins JA, Cole AM, Oien KA, Marsh V, et al. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(38):14122-7.
625. van Es JH, Clevers H. Generation and analysis of mouse intestinal tumors and organoids harboring APC and K-Ras mutations. *Methods in molecular biology*. 2015;1267:125-44.
626. Wang C, Zhao R, Huang P, Yang F, Quan Z, Xu N, et al. APC loss-induced intestinal tumorigenesis in *Drosophila*: Roles of Ras in Wnt signaling activation and tumor progression. *Developmental biology*. 2013;378(2):122-40.
627. Mologni L, Brussolo S, Cecon M, Gambacorti-Passerini C. Synergistic effects of combined Wnt/KRAS inhibition in colorectal cancer cells. *PloS one*. 2012;7(12):e51449.
628. Mologni L, Dekhil H, Cecon M, Purgante S, Lan C, Cleris L, et al. Colorectal tumors are effectively eradicated by combined inhibition of {beta}-catenin, KRAS, and the oncogenic transcription factor ITF2. *Cancer research*. 2010;70(18):7253-63.
629. Torre C, Benhamouche S, Mitchell C, Godard C, Veber P, Letourneur F, et al. The transforming growth factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation. *Journal of hepatology*. 2011;55(1):86-95.
630. Hwang I, Kim J, Jeong S. beta-Catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-delta coordinate dynamic chromatin loops for the transcription of vascular endothelial growth

- factor A gene in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(49):41364-73.
631. Paul I, Bhattacharya S, Chatterjee A, Ghosh MK. Current Understanding on EGFR and Wnt/beta-Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes & cancer*. 2013;4(11-12):427-46.
632. Abiola M, Favier M, Christodoulou-Vafeiadou E, Pichard AL, Martelly I, Guillet-Deniau I. Activation of Wnt/beta-catenin signaling increases insulin sensitivity through a reciprocal regulation of Wnt10b and SREBP-1c in skeletal muscle cells. *PloS one*. 2009;4(12):e8509.
633. Kim D, Rath O, Kolch W, Cho KH. A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK pathways. *Oncogene*. 2007;26(31):4571-9.
634. Wang Q, Zhou Y, Wang X, Evers BM. Glycogen synthase kinase-3 is a negative regulator of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene*. 2006;25(1):43-50.
635. Fang DX, Hawke D, Zheng YH, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(15):11221-9.
636. He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, et al. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature genetics*. 2007;39(2):189-98.
637. Caro-Gonzalez HY, Nejsum LN, Siemers KA, Shaler TA, Nelson WJ, Barth AI. Mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) regulates adenomatous polyposis coli during growth-factor-induced cell extension. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 5):1247-58.
638. Morris JPt, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(2):508-20.
639. Biechele TL, Kulikauskas RM, Toroni RA, Lucero OM, Swift RD, James RG, et al. Wnt/beta-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. *Science signaling*. 2012;5(206):ra3.
640. Hailfinger S, Jaworski M, Braeuning A, Buchmann A, Schwarz M. Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology*. 2006;43(3):407-14.

641. Stahl S, Ittrich C, Marx-Stoelting P, Kohle C, Altug-Teber O, Riess O, et al. Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology*. 2005;42(2):353-61.
642. Zeller E, Hammer K, Kirschnick M, Braeuning A. Mechanisms of RAS/beta-catenin interactions. *Archives of toxicology*. 2013;87(4):611-32.
643. Loyer P, Trembley JH, Lahti JM, Kidd VJ. The RNP protein, RNPS1, associates with specific isoforms of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase in vivo. *Journal of cell science*. 1998;111 (Pt 11):1495-506.
644. Boyle WJ, van der Geer P, Hunter T. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods in enzymology*. 1991;201:110-49.
645. Trembley JH, Tatsumi S, Sakashita E, Loyer P, Slaughter CA, Suzuki H, et al. Activation of pre-mRNA splicing by human RNPS1 is regulated by CK2 phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(4):1446-57.
646. Stuart SA, Houel S, Lee T, Wang N, Old WM, Ahn NG. A Phosphoproteomic Comparison of B-RAFV600E and MKK1/2 Inhibitors in Melanoma Cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2015;14(6):1599-615.
647. Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PN, Bohmer FD, et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Molecular cell*. 2009;36(2):326-39.
648. Imami K, Sugiyama N, Imamura H, Wakabayashi M, Tomita M, Taniguchi M, et al. Temporal profiling of lapatinib-suppressed phosphorylation signals in EGFR/HER2 pathways. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2012;11(12):1741-57.
649. Ko TK, Kelly E, Pines J. CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 14):2591-603.
650. Dai Q, Lei T, Zhao C, Zhong J, Tang YZ, Chen B, et al. Cyclin K-containing kinase complexes maintain self-renewal in murine embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(30):25344-52.
651. Dixon-Clarke SE, Elkins JM, Cheng SW, Morin GB, Bullock AN. Structures of the CDK12/CycK complex with AMP-PNP reveal a flexible C-terminal kinase extension important for ATP binding. *Scientific reports*. 2015;5:17122.

652. Jeronimo C, Collin P, Robert F. The RNA Polymerase II CTD: The Increasing Complexity of a Low-Complexity Protein Domain. *Journal of molecular biology*. 2016;428(12):2607-22.
653. Li X, Chatterjee N, Spirohn K, Boutros M, Bohmann D. Cdk12 Is A Gene-Selective RNA Polymerase II Kinase That Regulates a Subset of the Transcriptome, Including Nrf2 Target Genes. *Scientific reports*. 2016;6:21455.
654. Juan HC, Lin Y, Chen HR, Fann MJ. Cdk12 is essential for embryonic development and the maintenance of genomic stability. *Cell death and differentiation*. 2016;23(6):1038-48.
655. Ye ZB, Ma G, Zhao YH, Xiao Y, Zhan Y, Jing C, et al. miR-429 inhibits migration and invasion of breast cancer cells in vitro. *International journal of oncology*. 2015;46(2):531-8.
656. Popova T, Manie E, Boeva V, Battistella A, Goundiam O, Smith NK, et al. Ovarian Cancers Harboring Inactivating Mutations in CDK12 Display a Distinct Genomic Instability Pattern Characterized by Large Tandem Duplications. *Cancer research*. 2016;76(7):1882-91.
657. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, Miller RE, Rehman FL, Brough R, et al. Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer research*. 2014;74(1):287-97.
658. Paculova H, Kohoutek J. The emerging roles of CDK12 in tumorigenesis. *Cell division*. 2017;12:7.
659. Ekumi KM, Paculova H, Lenasi T, Pospichalova V, Bosken CA, Rybarikova J, et al. Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic acids research*. 2015;43(5):2575-89.
660. Joshi PM, Sutor SL, Huntoon CJ, Karnitz LM. Ovarian cancer-associated mutations disable catalytic activity of CDK12, a kinase that promotes homologous recombination repair and resistance to cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(13):9247-53.
661. Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):129-40.
662. Altun G, Loring JF, Laurent LC. DNA methylation in embryonic stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;109(1):1-6.

663. Han H, Irimia M, Ross PJ, Sung HK, Alipanahi B, David L, et al. MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature*. 2013;498(7453):241-5.
664. Du H, Cline MS, Osborne RJ, Tuttle DL, Clark TA, Donohue JP, et al. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(2):187-93.
665. Konieczny P, Stepniak-Konieczna E, Sobczak K. MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic acids research*. 2014;42(17):10873-87.
666. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293(5532):1089-93.
667. Petell CJ, Alabdi L, He M, San Miguel P, Rose R, Gowher H. An epigenetic switch regulates de novo DNA methylation at a subset of pluripotency gene enhancers during embryonic stem cell differentiation. *Nucleic acids research*. 2016;44(16):7605-17.
668. Li JY, Pu MT, Hirasawa R, Li BZ, Huang YN, Zeng R, et al. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(24):8748-59.
669. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic acids research*. 1999;27(11):2291-8.
670. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(26):27816-23.
671. Neri F, Krepelova A, Incarnato D, Maldotti M, Parlato C, Galvagni F, et al. Dnmt3L antagonizes DNA methylation at bivalent promoters and favors DNA methylation at gene bodies in ESCs. *Cell*. 2013;155(1):121-34.
672. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*. 2002;129(8):1983-93.
673. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1057-68.

674. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in oncology*. 2014;4:80.
675. Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR. An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(31):28176-81.
676. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, et al. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic acids research*. 2001;29(17):3506-12.
677. Soejima K, Fang W, Rollins BJ. DNA methyltransferase 3b contributes to oncogenic transformation induced by SV40T antigen and activated Ras. *Oncogene*. 2003;22(30):4723-33.
678. Aho S, Levansuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U, Uitto J. Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 7):1391-402.
679. Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, Reynolds A, et al. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics*. 1998;50(2):129-46.
680. Hong JY, Oh IH, McCrea PD. Phosphorylation and isoform use in p120-catenin during development and tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(1):102-14.
681. Zhang Y, Zhao Y, Jiang G, Zhang X, Zhao H, Wu J, et al. Impact of p120-catenin isoforms 1A and 3A on epithelial mesenchymal transition of lung cancer cells expressing E-cadherin in different subcellular locations. *PloS one*. 2014;9(2):e88064.
682. Wang R, Chen YS, Dashwood WM, Li Q, Lohr CV, Fischer K, et al. Divergent roles of p120-catenin isoforms linked to altered cell viability, proliferation, and invasiveness in carcinogen-induced rat skin tumors. *Molecular carcinogenesis*. 2017;56(7):1733-42.
683. Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 2004;23(48):7947-56.
684. Talvinen K, Tuikkala J, Nykanen M, Nieminen A, Anttinen J, Nevalainen OS, et al. Altered expression of p120catenin predicts poor outcome in invasive breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(9):1377-87.

685. Sarrio D, Perez-Mies B, Hardisson D, Moreno-Bueno G, Suarez A, Cano A, et al. Cytoplasmic localization of p120^{ctn} and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene*. 2004;23(19):3272-83.
686. Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM. NLS-dependent nuclear localization of p120^{ctn} is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 13):2675-86.
687. Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, et al. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & development*. 2001;15(13):1613-8.
688. Daniel JM, Reynolds AB. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(5):3614-23.
689. Liu Y, Dong QZ, Wang S, Xu HT, Miao Y, Wang L, et al. Kaiso interacts with p120-catenin to regulate beta-catenin expression at the transcriptional level. *PloS one*. 2014;9(2):e87537.
690. Lee M, Ji H, Furuta Y, Park JI, McCrea PD. p120-catenin regulates REST and CoREST, and modulates mouse embryonic stem cell differentiation. *Journal of cell science*. 2014;127(Pt 18):4037-51.
691. Pieters T, Goossens S, Haeneballe L, Andries V, Stryjewska A, De Rycke R, et al. p120 Catenin-Mediated Stabilization of E-Cadherin Is Essential for Primitive Endoderm Specification. *PLoS genetics*. 2016;12(8):e1006243.
692. Naro C, Sette C. Phosphorylation-mediated regulation of alternative splicing in cancer. *International journal of cell biology*. 2013;2013:151839.
693. Stamm S. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(3):1223-7.
694. Misteli T. RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Current biology : CB*. 1999;9(6):R198-200.
695. Tahmasebi S, Jafarnejad SM, Tam IS, Gonatopoulos-Pournatzis T, Matta-Camacho E, Tsukumo Y, et al. Control of embryonic stem cell self-renewal and differentiation via coordinated alternative splicing and translation of YY2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(44):12360-7.

696. Venables JP, Lapasset L, Gadea G, Fort P, Klinck R, Irimia M, et al. MBNL1 and RBFOX2 cooperate to establish a splicing programme involved in pluripotent stem cell differentiation. *Nature communications*. 2013;4:2480.
697. Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-El-Leil MK, et al. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC cancer*. 2008;8:337.
698. Sharma P, Veeranna, Sharma M, Amin ND, Sihag RK, Grant P, et al. Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):528-34.
699. Fleurent M, Gingras AC, Sonenberg N, Meloche S. Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(7):4006-12.
700. Chen Y, Choong LY, Lin Q, Philp R, Wong CH, Ang BK, et al. Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007;6(12):2072-87.
701. Flentke GR, Garic A, Hernandez M, Smith SM. CaMKII represses transcriptionally active beta-catenin to mediate acute ethanol neurodegeneration and can phosphorylate beta-catenin. *Journal of neurochemistry*. 2014;128(4):523-35.
702. White RR, Kwon YG, Taing M, Lawrence DS, Edelman AM. Definition of optimal substrate recognition motifs of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(6):3166-72.
703. Montesano R, Soriano JV, Hosseini G, Pepper MS, Schramek H. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;10(5):317-32.
704. Schramek H, Feifel E, Healy E, Pollack V. Constitutively active mutant of the mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 induces epithelial dedifferentiation and growth inhibition in madin-darby canine kidney-C7 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(17):11426-33.

705. Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C, Rivard N. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *International journal of cancer*. 2009;125(7):1575-86.
706. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998;392(6672):190-3.
707. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 1991;66(1):107-19.
708. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(51):36734-40.
709. Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, et al. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(7):2287-97.
710. Bamji SX, Rico B, Kimes N, Reichardt LF. BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin-beta-catenin interactions. *The Journal of cell biology*. 2006;174(2):289-99.
711. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7.
712. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of cell science*. 1999;112 (Pt 8):1237-45.
713. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *The Journal of cell biology*. 1994;127(6 Pt 2):2061-9.
714. Sadot E, Simcha I, Iwai K, Ciechanover A, Geiger B, Ben-Ze'ev A. Differential interaction of plakoglobin and beta-catenin with the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene*. 2000;19(16):1992-2001.

715. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(40):24735-8.
716. Lai YH, Cheng J, Cheng D, Feasel ME, Beste KD, Peng J, et al. SOX4 interacts with plakoglobin in a Wnt3a-dependent manner in prostate cancer cells. *BMC cell biology*. 2011;12:50.
717. Miravet S, Piedra J, Miro F, Itarte E, Garcia de Herreros A, Dunach M. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(36):18854.
718. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology*. 2007;22:303-9.
719. Wu S, Wang S, Zheng S, Verhaak R, Koul D, Yung WK. MSK1-Mediated beta-Catenin Phosphorylation Confers Resistance to PI3K/mTOR Inhibitors in Glioblastoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2016;15(7):1656-68.
720. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(15):11221-9.