

2011, 2824.4

Université de Montréal

**Mécanismes de régulation des enzymes
MEK1 et MEK2 de la voie MAPK^{ERK}**

Par

Geneviève Beauregard

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)

Août 2000

© Geneviève Beauregard, 2000



1000-21-24-4

Université de Montréal

Mécanismes de régulation des enzymes

MEK1 et MEK2 de la voie MAPK^{ERK}

W
4
W58
2000
n. 089

Par

Chercheur principal
Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

Année 2000

© Gauthier Belletang 2000



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Mécanismes de régulation des enzymes
MEK1 et MEK2 de la voie MAPK^{ERK}**

présenté par :

Geneviève Beauregard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Richard L. Hampan
Directeur de recherche : Sylvain Gholché
Membre du jury : Pierre Haldou

Mémoire accepté le : 7 août 2000

SOMMAIRE

Les cellules répondent aux différents signaux extracellulaires en activant des voies de signalisation intracellulaires qui transmettent la réponse jusqu'au noyau. Ces voies de signalisation comprennent, entre autres, la cascade hautement conservée des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK). Cette cascade que l'on retrouve dans tous les organismes eucaryotes, consiste en trois protéines kinases qui s'activent l'une après l'autre. L'activation d'une MAPK kinase kinase (MKKK) entraîne l'activation d'une MAPK kinase (MEK ou MKK) qui entraîne à son tour l'activation d'une MAP kinase ou ERK. La MAPK kinase ou MEK fait partie d'une famille de protéines kinases à double spécificité qui active les ERKs (MAPK) en phosphorylant les résidus thréonine 183 et tyrosine 185 de ces derniers. MEK devient elle-même activée suite à la phosphorylation des sérines 218 et 222, situées sur sa boucle d'activation par Raf, Mos et d'autres MEK kinases. Le domaine C-terminal de MEK est de plus, sujet à de nombreuses phosphorylations entre autres, par ERK, Cdk2 (cyclin-dépendent kinase) et PAK1 (p21-activated kinase). Quant au domaine N-terminal de MEK, il contient une séquence d'exportation du noyau. Cette séquence soulève plusieurs questions par le fait que MEK est localisée dans le noyau lors de la prophase afin d'y permettre, avec l'aide de ERK, l'entrée en phase M de cellules somatiques. Etant donné que MEK est un point de convergence pour différentes voies de signalisation, que son activité est réglée par différentes kinases et qu'elle est possiblement impliquée dans le développement de certaines pathologies, nous avons construit une série de mutants des deux isoformes de MEK dans le but d'analyser plus en détail les mécanismes de régulation de MEK1 et MEK2. Ces mutants ont été exprimés dans des cellules 293 puis analysés pour leur activité enzymatique et biologique. Nos résultats démontrent que la mutation de la sérine 212 en alanine augmente l'activité de MEK1 et MEK2 par rapport à la forme sauvage. À l'inverse, la substitution par un résidu acide diminue l'activité. L'analyse des phosphopeptides et des phosphoaminoacides de MEK1 révèle la phosphorylation de multiples résidus sérine et thréonine dont possiblement la sérine 212. La phosphorylation de la sérine 212, suite à la phosphorylation activatrice des sérines 218 et 222, servirait donc à diminuer l'activité de MEK pour inactiver la voie ERK. La sérine 212 de MEK1 et MEK2 a été conservée chez toutes les MAP kinase kinases de la levure à l'humain. Ce mécanisme de régulation négative interne par un seul acide aminé serait donc une première dans les voies MAP Kinases.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	III
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des signes et abréviations	VIII
1. Voies MAP kinases	1
1.1 Voie MAPK ^{ERK3}	1
1.2 Voie MEK5/MAPK ^{ERK5}	3
1.3 Voie MAPK ^{ERK7}	3
1.4 Voie MAPK ^{P38}	4
1.5 Voie MAPK ^{JNK}	5
1.6 Voie MAPK ^{ERK}	5
1.6.1 Rôles de la voie MAPK ^{ERK}	7
1.6.1.1 La prolifération	7
1.6.1.2 La sénescence	8
1.6.1.3 La différenciation	8
1.6.1.4 La migration	10
1.6.2 Inactivation de la voie MAPK ^{ERK}	11
1.6.3 Autres récepteurs capables d'activer la voie MAPK ^{ERK}	11
1.6.4 Régulation de la voie ERK par les protéines adaptatrices	13
1.6.5 Régulation croisée entre la voie MAPK ^{ERK} et d'autres voies de signalisation	13
1.7 Les membres de la famille MKK	14
1.7.1 Expression de MKK ^{MEK1/MEK2}	14
1.7.2 Structure de MKK ^{MEK1/MEK2}	15
1.7.3 Insertion riche en prolines de MKK ^{MEK1/MEK2}	15
1.7.3.1 Séquence d'exportation nucléaire de MKK ^{MEK1/MEK2}	16
1.7.4 Rôles de MKK ^{MEK1/MEK2} dans le noyau	17
1.8 Implication possible de la voie MAPK ^{ERK} dans diverses pathologies	18
1.8.1 Le syndrome de l'immunité déficiente acquise	18
1.8.2 Rôles des protéines de la voie MAPK ^{ERK} dans le développement du cancer	18
1.8.2.1 Changement dans l'expression des protéines de la voie MAPK ^{ERK}	19
1.8.2.2 Actions des carcinogènes et des hormones stéroïdiennes	20
1.8.2.3 Effets des radiations, de la déprivation de glucose et des agents généotoxiques	21
1.9 MEK1, une nouvelle cible dans le développement de médicaments contre le cancer	21
2. Matériel et méthodes	23
2.1 Matériaux	23
2.2 Sous-clonage et mutagenèse dirigée	23
2.3 Expression des mutants MEK1	24
2.4 Expression des mutants MEK2	24
2.5 Caractérisation des lignées cellulaires	25
2.6 Immunoprécipitation	25
2.7 Immunobuvardage	26
2.8 Les essais protéine-kinase	26
2.9 Immunoprécipitation et marquage ³² P in vivo	27
2.10 Analyse des phosphoaminoacides	27

3. Résultats.....	28
3.1 Alignement des séquences de MEK1 et choix de ses mutants	28
3.2 Expression de MEK1, MEK2 et de leurs mutants dans les cellules 293.....	31
3.3 Activité des MEKs et de leurs mutants dans les cellules 293	36
3.4 Phosphorylation in vivo de MEK1.....	38
3.4.1 Analyse des phosphoaminoacides totaux de MEK1	38
4. Discussion.....	53
4.1 MKK ^{MEK1/MEK2} à travers l'évolution	53
4.2 Approches utilisées	53
4.3 Expression et activité enzymatique des mutants MEK1 et MEK2.....	54
4.3.1 Expression des mutants MEK1 et MEK2.....	54
4.3.2 Activité enzymatique des mutants MEK1 et MEK2	54
4.4 Marquage in vivo	56
4.5 Autres sites de régulation des MAPKK de la levure aux mammifères.....	58
4.6 Perspectives	59
4.6.1 Kinase de la sérine 212	59
4.6.2 Phosphatase de la sérine 212	59
4.6.3 Structure cristalline de MEK, rôle de la sérine 212	60
4.6.4 La sérine 212 de MEK1, une nouvelle cible thérapeutique.....	61
Bibliographie.....	63
Annexe I.....	83
Remerciements.....	XI

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Activité enzymatique des mutants MEK1 dans les cellules 293 en phase exponentielle.....	39
Tableau II	Activité enzymatique des mutants MEK1 dans les cellules 293 quiescentes.....	40
Tableau III	Activité enzymatique des mutants MEK2 dans les cellules 293 en phase exponentielle.....	41
Tableau IV	Activité enzymatique des mutants MEK2 dans les cellules 293 quiescentes.....	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Voies de signalisation MAP kinase chez l'humain	2
Figure 2	Comparaison des séquences de MEK1 avec MKKK1, MKKK2, STE7, Byr1, PBS2 et Wis1	29
Figure 3	Représentation schématique des mutants de MEK1 et MEK2 humains	30
Figure 4	Activité enzymatique de MEK1 sauvage et de ses mutants dans les 293 en phase exponentielle	32
Figure 5	Activité enzymatique de MEK2 sauvage et de ses mutants dans les 293 en phase exponentielle	33
Figure 6	Activité enzymatique de MEK1 sauvage et de ses mutants dans les 293 quiescentes	34
Figure 7	Activité enzymatique de MEK2 sauvage et de ses mutants dans les 293 quiescentes	35
Figure 8	Analyse des phosphoaminoacides de MEK1	43
Figure 9	Sites de clivage de la trypsine sur l'enzyme MEK1	44
Figure 10	Analyse des phosphopeptides de MEK1 sauvage suite à une digestion par la trypsine	45
Figure 11	Analyse des phosphopeptides de MEK1 S212A suite à une digestion par la trypsine	46
Figure 12	Analyse des phosphopeptides de MEK1 DD suite à une digestion par la trypsine	47
Figure 13	Analyse des phosphopeptides de MEK1 ADD suite à une digestion par la trypsine	48
Figure 14	Analyse des phosphopeptides de MEK2 AA suite à une digestion par la trypsine	50
Figure 15	Analyse des phosphopeptides de MEK2 AAA suite à une digestion par la trypsine	51
Figure 16	Analyse des phosphopeptides tryptiques de MEK1 clivés par l'endoprotéinase Glu-c (V8 protéase)	52

LISTE DES SIGNES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	adenosine monophosphate
AMPc	adenosine-3', 5'-cyclic phosphate
ARN	acide ribonucléique
ATP	adenosine triphosphate
BHTOOH	butylated hydroxytoluene hydroperoxide
cAPK	cyclic AMP-dependent kinase
CDK	cyclin-dependent kinase
CK2 α	casein kinase 2 α
CLIC3	chloride intracellular channel 3
cm	centimètre
CRE	AMP cyclic response element
CREB	AMP cyclic response element binding protein
CSF-1	colony-stimulating factor-1
ECL	enhanced chemiluminescence
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular regulated kinase
FADD	Fas-associated death domain protein
FAS	CD45 ou Apo1
FLIP	FLICE inhibitory protein
GDP	guanosine diphosphate
GH	growth hormone
GJIC	Gap junction intracellular communication
GTP	guanosine triphosphate
HGF	facteur de croissance hépatocytaire
IL-1	interleukine-1
JAK	janus kinase
JIP	JNK-interacting protein
JNK	c-JUN N-terminal kinase
Kb	kilobase
KSR	kinase suppressor of Ras
L	litre

M	molaire
MAPK	MAP kinase
MAPKAP	MAPK-activated protein kinase
MAPK ^{ERK}	extracellular signal regulated kinase pathway
MAPK ^{JNK}	JNK pathway
MAPK ^{P38}	p38 pathway
MBP	myelin basic protein
MEK	MAP/ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MEM	minimum essential medium
MKK	MAP kinase kinase
MKKK	MAP kinase kinase kinase
MKP	MAP kinase phosphatase
ml	mililitre
MLCK	myosin light chain kinase
MLK	mixed-lineage protein kinase
NES	nuclear export signal
NRS	normal rabbit serum
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbones
PAK 1	p21-activated kinase
PBS	phosphate-buffered-saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PI-3 kinase	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PP1	protein phosphatase 1
PP2A	phosphoprotein phosphatase 2A
PTB	phosphotyrosine binding domain
PTP ases	protéines tyrosine phosphatases
PVDF	polyvinyllidenidifluoride
RB	rétinoblastome
SB	sample buffer
SDS	sodium-dodecylsulphate
SH2	Src-homology 2 domain

SH3	Src-homology 3 domain
SIE	Sis-inducible element
SRE	serum response element
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNF	tumor necrosis factor
UV	ultraviolet

1. VOIES MAP KINASES

Les cellules eucaryotes intègrent à tout moment une diversité de stimuli, qui comprennent différents facteurs de croissance, des cytokines, des hormones, des neurotransmetteurs et des stress cellulaires. Elles transmettent ces signaux jusqu'au noyau par le biais des voies de signalisation. Une des voies de signalisation les plus sollicitées est la voie MAP Kinase, conservée de la levure à l'humain. Le module MAP kinase est constitué de trois protéines kinases qui sont activées de façon séquentielle. La première enzyme est une MAPK kinase kinase (MKKK). Une fois activée suite à son interaction avec une petite protéine G de la famille Ras ou Rho, elle phosphoryle et active une MAPK kinase (MKK ou MEK). Cette dernière est une enzyme à double spécificité qui reconnaît et phosphoryle la séquence Thr-X-Tyr d'une MAPK (MAP kinase ou ERK). La MAPK phosphoryle des résidus sérines et thréonines appartenant à divers facteurs de transcription, protéines kinases, phospholipases et protéines associées au cytosquelette.

1.1 VOIE MAPK^{ERK3}

Chez les cellules de mammifères, six voies MAP kinase ont été décrites (figure 1). La voie MAPK^{ERK3} possède une MAP kinase appelée ERK3 (extracellular regulated kinase 3). Cette dernière, bien qu'appartenant à la famille des kinases ERK, présente des caractéristiques particulières. Son domaine catalytique est seulement 50% identique à celui de ERK1 (extracellular regulated kinase 1) et ERK2 (extracellular regulated kinase 2). Elle possède une séquence d'activation Ser-Glu-Gly qui est différente de la séquence d'activation Thr-Glu-Tyr retrouvée chez les autres ERKs (132, 138). La sérine de cette séquence d'activation, qui se retrouve à la position 189, peut-être phosphorylée par une MAPK^{ERK3} kinase (28) et par MEK2 (MAP/ERK kinase 2) de la voie MAPK^{ERK1} (extracellular signal-regulated kinase pathway) (132). D'ailleurs, une surexpression de PKC β (protéine kinase C β) amène à l'activation constitutive de ERK3 dans les cellules de cancer du colon (138). ERK3 est une protéine kinase nucléaire et sa localisation au noyau est indépendante de son extrémité C-terminale (26). Elle aurait une spécificité restreinte envers ses substrats (26). ERK3 humaine existe en un seul isoforme, une protéine de 100 kDa qui est constituée de 720 acides aminés (166). Elle aurait des effets anti-prolifératifs

Voie MAP kinase	ERK	JNK	P38	ERK3	ERK5	ERK7
↓						
MAP kinase kinase kinase	Raf-1 A-Raf B-Raf	MKKK1 MKKK2 MKKK3	?	?	?	?
↓						
MAP kinase kinase	MEK1 MEK2	MEK4 MEK7	MEK3 MEK6	MEK2 MAP ^{ERK3} kinase	MEK5	?
↓						
MAP kinase	ERK1 ERK2	JNK1 JNK2 JNK3	P38 α P38 β P38 δ P38 γ	ERK3	ERK5	ERK7

Figure 1 : Voies de signalisation MAP kinase chez l'humain.

par sa capacité à inhiber la formation de colonies de cellules d'adénocarcinome de la vessie T-24 transfectées par ERK3 sauvage. Quant à la différenciation, on observe une induction du messager et de la protéine ERK3 lors de la différenciation des cellules U-937 en macrophages/monocytes (35).

1.2 VOIE MEK5/MAPK^{ERK5}

La voie MEK5/MAPK^{ERK5} peut être activée par le stress oxydatif et l'hyperosmolarité (2). Aucune MKKK n'a été identifiée pour cette voie. Par contre, Ras et Raf-1 coopèrent ensemble pour contrôler l'activité de ERK5 à l'aide d'un mécanisme différent de celui de l'activation de ERK1 et ERK2 de la voie MAPK^{ERK} (47). MEK5 (MAP/ERK kinase 5) active ensuite ERK5 dans le cytoplasme puis ERK5 est relocalisé au noyau. Il active le facteur de transcription MEF2C qui induit l'expression de c-JUN (2, 180). MEK5 est distincte des autres MKK par sa longue séquence N-terminale qui présente une homologie avec 2 protéines de levures, soit le produit du gène CDC24 de *Saccharomyces cerevisia* et la protéine homologue encodée par le gène Scd1 de *Schizosaccharomyces pombe*. Même si la fonction de cette séquence N-terminale est inconnue, il est possible qu'elle se lie à la G protéine Rac (52).

1.3 VOIE MAPK^{ERK7}

La protéine ERK7 (extracellular regulated kinase 7) n'est pas activée par les stimulus extracellulaires qui activent généralement ERK1 et ERK2. Elle n'est pas activée non plus par les activateurs de JNK (c-JUN N-terminal kinase) ou de p38, et ce, malgré la présence de la séquence d'activation Thr-Glu-Tyr (3, 125). ERK7 est une protéine constitutivement active. Son activité kinase requiert un domaine kinase fonctionnel ainsi que son extrémité C-terminale (3, 125). Le transfert de ERK7 du cytoplasme au noyau est dépendant de son extrémité C-terminale et non de la phosphorylation de son domaine d'activation (3, 125). L'extrémité C-terminale possède deux domaines SH3 (Src homology 3 domain) dans sa région riche en prolines. Ces domaines SH3 pourraient faciliter des interactions protéine-protéine qui activeraient ERK7(3). D'ailleurs, la protéine CLIC3 (chloride intracellular channel 3) qui se retrouve principalement au noyau, est capable de se lier à l'extrémité C-terminale de ERK7 suggérant que CLIC3 et ERK7 pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire (125). L'extrémité C-terminale permettrait à

ERK7 d'inhiber la synthèse d'ADN (acide désoxyribonucléique) lors de conditions stressantes comme la stimulation avec des esters de phorbols, le traitement avec du peroxyde d'hydrogène ou la surexpression de MEKK (MEK kinase) constitutivement active de la voie MAPK^{JNK} (3, 125). Ce rôle d'inhibition de la croissance cellulaire est indépendant du niveau d'expression de ERK7 mais non de son activité kinase (3, 125). De plus, ERK7 jouerait un rôle dans le contrôle de l'expression génique par son habileté à phosphoryler certains facteurs de transcription in vitro et par sa localisation majoritaire au noyau (3).

1.4 VOIE MAPK^{P38}

Deux voies MAP Kinases sont principalement activées par le stress cellulaire. La première est la voie MAPK^{P38}. Cette dernière peut être stimulée par plusieurs facteurs dont les radiations UV (ultraviolet), le choc osmotique, le choc thermique, les lipopolysaccharides, les inhibiteurs de synthèse protéiques, certaines cytokines comme IL-1 (interleukine-1), TNF- α (tumor necrosis factor-1) ainsi que les récepteurs couplés aux protéines G (177). Ces signaux activent les MKKK TAK1, ASK1, SPRK ou PAK qui activent à leur tour MEK3 (MAP/ERK kinase 3) ou MEK6 (MAP/ERK kinase 6). Ces dernières phosphorylent une thréonine et une tyrosine de la séquence Thr-Gly-Tyr de MAPK^{P38} (177). MAPK^{P38} existe sous quatre isoformes: MAPK^{P38 α} , MAPK^{P38 β} , MAPK^{P38 δ} et MAPK^{P38 γ} (177). Suite à l'activation d'une MAPK^{P38}, plusieurs substrats sont phosphorylés et activés. Parmi ceux-ci, on compte MAPKAP Kinase 2 et 3 (MAPK-activated protein kinase) ainsi que des facteurs de transcription dont AFT2, ELK1, Chop et Max. ELK1 et Max, une fois phosphorylés, forment un hétérodimère avec c-Myc. Ils sont également des substrats de ERK1 et ERK2, ce qui présente un point de convergence entre la voie MAPK^{P38} et MAPK^{ERK} (177). La voie MAPK^{P38} est impliquée dans la production de cytokines chez les cellules hématopoïétiques, dans la prolifération cellulaire induite par les cytokines et dans l'apoptose (177).

1.5 VOIE MAPK^{JNK}

Une autre voie activée par les stress cellulaires est la voie MAPK^{JNK}. Les stress cellulaires comprennent le choc thermique, l'irradiation ultraviolette, l'ADN endommagé, la formation de H₂O₂, l'hyperosmolarité, les facteurs de différenciation et les facteurs de croissance (177). Ces signaux activent les MKKK MEKK1 (MEK kinase 1), MEKK2 (MEK kinase 2), MEKK3 (MEK kinase 3), MEKK4 (MEK kinase 4), TAK1, MUK, Tpl-2, SPRK, ASK1 ou MST qui activent à leur tour MEK4 (MAP/ERK kinase 4) et MEK7 (MAP/ERK kinase 7). Ces dernières phosphorylent une MAPK^{JNK} sur une thréonine et une tyrosine dans la séquence d'activation Thr-X-Tyr. Les MAPK^{JNK} sont encodées par trois différents gènes, JNK1, JNK2 et JNK3, qui sont également sujet à un épissage alternatif. Les JNKs n'ont pour substrat que des facteurs de transcription incluant c-JUN, ATF 2, ELK-1, p53, DPC4 et NFAT4 (177). La voie MAPK^{JNK} joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose, la morphogénèse, la croissance et la différenciation cellulaire (177). Elle est en plus impliquée dans la régénération hépatique, l'activation des cellules T et la production de cytokines. Tout dépendant de la nature des gènes transformants, elle participe aussi à certains événements oncogéniques (111).

La voie MAPK^{JNK} peut être contrôlée de façon négative par deux phosphatases, soit MKP-1 (MAP kinase phosphatase 1) et M3/6 qui déphosphorylent les JNKs (177). À l'inverse, une protéine adaptatrice JIP-1 (JNK-interacting protein 1), active la voie MAPK^{JNK} en plus de lier MLK (mixed-lineage protein kinase) avec MEK7 et JNK. Ainsi, JIP-1 permet l'activation de la voie en réponse à des signaux spécifiques ou l'isolation de ce module des autres signaux extracellulaires (176).

1.6 VOIE MAPK^{ERK}

Finalement, la dernière et la mieux étudiée des 6 voies MAP kinases chez les mammifères est la voie MAPK^{ERK}. Cette voie est activée par de nombreux signaux extracellulaires incluant les facteurs de croissance, l'insuline (18), les esters de phorbol, la nicotine, l'acide okadaïque, le sérum, les activateurs de la maturation des oocytes, le peroxyde d'hydrogène (126) et autres. En réponse à l'activation des récepteurs tyrosine kinase comme le récepteur EGF (epidermal growth factor), le récepteur GH (Growth hormone receptor), le récepteur PGDF (platelet-derived growth

factor) et le récepteur à insuline, il y a phosphorylation en tyrosine des domaines intracellulaires des récepteurs eux-même, en plus de la phosphorylation de protéines adaptatrices comme Shc. Shc consiste en un domaine PTB (phosphotyrosine binding domain), deux domaines SH2 (Src homology 2 domain) et un domaine SH3. Il se lie à des phosphotyrosines spécifiques du récepteur EGF par son domaine PTB ce qui résulte en sa phosphorylation en tyrosine soit par le récepteur ou par Src, une tyrosine kinase intracellulaire. Cette phosphorylation permet à une seconde protéine adaptatrice, Grb2, de se lier à Shc par son domaine SH2. Grb2 consiste en un domaine SH2 et 2 domaines SH3. Cette association augmente la quantité de Grb2 qui s'associe au récepteur. Parce que le facteur d'échange de nucléotide guanyliques SOS (son of Sevenless) est constitutivement lié au domaine SH3 de Grb2, l'association au récepteur de Grb2 permet l'échange de GDP (guanosine diphosphate) pour du GTP (guanosine triphosphate) sur Ras au niveau de la membrane plasmique. La forme active de Ras-GTP recrute MKKK^{Raf-1} par son domaine NH₂-terminal à la membrane. Raf-1 est phosphorylé sur les tyrosines 340 ou 341 par des tyrosines kinases associées à la membrane comme c-Src (43, 177). Il est également phosphorylé sur deux sérines en position 338 et 339 (43, 83). Raf-1 activé peut maintenant phosphoryler MKK^{MEK1/MEK2} sur 2 sérines régulatrices (8, 23). MEK1 (MAP/ERK kinase 1) et MEK2 (MAP/ERK kinase 2) font partie d'un petit groupe de kinases à double spécificité qui catalysent la phosphorylation en sérine/thréonine ainsi qu'en tyrosine (15). Ces enzymes phosphorylent MAPK^{ERK-1/ERK-2} sur la thréonine 183 et la tyrosine 185 de la séquence Thr-Glu-Tyr située sur la boucle d'activation de ces derniers (127). Les réactions ont lieu au niveau du cytoplasme par une liaison au domaine N-terminal de MEK1 et MEK2 (51, 140). Lorsqu'il y a activation de la voie, ERK1 et ERK2 se dissocient des MEKS, se dimérisent et sont rapidement relocalisés au noyau. Ils contrôlent alors l'activité de facteurs de transcription en phosphorylant les motifs Pro-Leu-Ser/Thr-Pro sur ces derniers (140).

Parmi les substrats de ERK1 et ERK2, nous retrouvons des protéines kinases comme p90^{rsk}, la phospholipase cytosolique A₂, la région juxtra-membranaire du récepteur EGF, plusieurs protéines associées aux microtubules dont MAP-1, MAP-2, MAP-4 et Tau, les facteurs de transcription comme ELK 1, Ets 1, Sap 1a, c-Myc, Tal, les protéines STAT (signal transducer and activator of transcription proteins), Myb (177) et la phosphatase MKP-3 (MAP kinase phosphatase-3) (21). ERK1 et ERK2

peuvent aussi phosphoryler Ras, Raf-1 et MEK1 réduisant ainsi leur activité catalytique par un mécanisme de régulation négative (177, 198). De plus, ERK1 et ERK2 sont capables de s'autophosphoryler (145, 180).

1.6.1 RÔLES DE LA VOIE MAPK^{ERK}

La voie MAPK^{ERK} est principalement impliquée dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la migration cellulaire et de la sénescence. La réponse est déterminée selon la durée de l'activation de ERK par des stimuli extracellulaires. Un exemple classique est la cellule PC12 qui, lorsque stimulée par le EGF, se divise, alors que stimulée par le NGF va se différencier en neurone et arrêter sa croissance (37, 171, 177).

1.6.1.1 LA PROLIFÉRATION

La prolifération est généralement induite par une activation transitoire de la voie MAPK^{ERK} (100). Par exemple, dans des cultures primaires d'hépatocytes de rats, une activation aiguë de la cascade MAPK^{ERK} augmente la synthèse d'ADN ce qui permet la progression en phase G₁/S (164). De même pour les cellules PC12, l'activation transitoire de cette voie par Ras induit leur croissance cellulaire (100). Cependant, il arrive parfois que la prolifération soit induite par une activation soutenue de la voie MAPK^{ERK}. Notamment, chez les fibroblastes, l'activation soutenue de la voie MAPK^{ERK} par des facteurs de croissance durant la phase G₁ amène à la croissance cellulaire en permettant l'entrée en phase S et à la transformation dans certains cas (36, 90, 102, 104, 119).

La durée de l'activation de ERK n'est pas le seul élément impliqué dans la prolifération cellulaire. La voie MAPK^{ERK} possède elle-même une activité anti-apoptotique. Cette voie atténue les signaux apoptotiques initiés par les « death receptors » grâce à MEK qui induit l'expression de FLIP (FLICE inhibitory protein), un inhibiteur de l'apoptose (194). La voie MAPK^{ERK} inhibe aussi l'apoptose induite par la déprivation du NGF chez des cellules PC12 (185). Les MAPK^{ERKs} sont également activés par la sphingosine-1-phosphate, ce qui résulte en l'inhibition de l'apoptose induite par les céramides (40, 155) mais aussi par la cardiotrophine 1 dans les myocytes cardiaques (150). Le rôle de la voie MAPK^{ERK} dans la prolifération est de plus

supporté par le fait que la moitié des ERKs activés sont attachés au cytosquelette participant ainsi à la réorganisation de ce dernier (130).

1.6.1.2 LA SÉNESCENCE

Suite à plusieurs divisions cellulaires *in vitro*, les cellules cessent de proliférer et deviennent sénescents. La sénescence est un état qui se caractérise par l'arrêt irréversible de la division cellulaire, la rétention de la viabilité des cellules et l'induction d'un marqueur enzymatique pour la sénescence, la β -galactosidase acide (200). La sénescence peut être induite par de l'ADN endommagé, par le raccourcissement excessif des télomères, par les composés chimiques capables de démétyler l'ADN, par les céramides, par les inhibiteurs de la déacétylation des histones et par l'activation constitutive de la voie MAPK^{ERK} (93, 200). Cette dernière permet non seulement l'initiation d'une prolifération cellulaire aberrante, mais accélère aussi la sénescence en induisant p53 et p16, deux gènes supresseurs de tumeurs. L'accumulation de p53 et de p16 sert à bloquer la division cellulaire initiée par Ras ou Raf oncogéniques et à induire la sénescence. Toutefois, les cellules qui auraient acquis des mutations dans le gène p53 ou dans le locus INK4a/ARF échappent à la sénescence révélant ainsi le pouvoir transformant de la voie MAPK^{ERK} constitutivement active (93, 200).

1.6.1.3 LA DIFFÉRENTIATION

Contrairement à une activation transitoire de la voie MAPK^{ERK} qui induit généralement la croissance cellulaire, une activation soutenue de cette voie mais non constitutive permet la différenciation cellulaire. La différenciation cellulaire est un processus complexe qui implique l'arrêt de croissance des cellules, la sortie du cycle cellulaire et l'expression de gènes spécifiques au type cellulaire. Par exemple, une activation soutenue de la cascade MAPK^{ERK} dans les cellules de tétrocarcinome F9 augmente l'expression des protéines inhibitrices cdk, réduit l'activité des cdk (cyclin-dépendent kinase) et inhibe la synthèse d'ADN (164). Chez les cellules PC12 qui ont été stimulées par le NGF, la différenciation neuronale est assurée par l'activation soutenue de la voie MAPK^{ERK} et par la relocalisation nucléaire des ERKs (36, 100, 177, 185). La différenciation des cellules PC12 peut aussi être induite par un facteur neurotrophique dérivé de cellules d'astrocytomes humains (1321N1) qui active la voie ERK (116). Chez les fibroblastes, le PDGF induit une activation soutenue des

ERKS. Cette activation soutenue est médiée par les isoformes de PKC (protéine kinase C) et de PI-3 kinase (phosphatidylinositol-3-kinase) et non par MEK ou les MEK kinases (61). L'activation de ERK1, ERK2 et de la p70 (s6K) sont requises pour la différenciation terminale des préadipocytes 3T3-F442A indépendamment de l'hormone de croissance (192). L'inhibition de l'activité kinase de ERK par des inhibiteurs pharmacologiques de MEK, par l'expression d'un mutant dominant négatif de ERK ou par l'expression de MKP-1, permet d'inhiber l'activation du promoteur de la protéine myéline dans les cellules D6P2T. Par conséquent, la différenciation des oligodendrocytes et des cellules de Schwann en des cellules matures capables de produire de la myéline est bloquée en réponse à l'AMP cyclique (adenosine-3', 5'-phosphate cyclique) (33). Le traitement par le bryostatine-1 induit la différenciation d'une lignée de cellules leucémique promyélocytique en activant ERK. Ce dernier hyperphosphoryle ensuite le mutant p53 surexprimé, ce qui provoque sa dégradation (153). Dans une autre lignée de cellules leucémiques myéloblastiques humaines, le traitement avec l'acide rétinoïque amène l'activation de ERK, l'hyperphosphorylation de la protéine suppresseur de tumeur rétinoblastome (RB), la différenciation cellulaire et l'arrêt en G₀ (195). De plus, l'activation de Ras-Raf-MEK-ERK par l'acide rétinoïque est suffisante pour induire la différenciation de l'endoderme primitif de cellules F9 de carcinome embryonnaire de souris (170). Toujours en ce qui a trait aux cellules cancéreuses, chez une lignée de cellules de carcinome du sein, l'activation soutenue de la MAPK^{ERK} est essentielle et suffisante pour que l'Hérégulin beta 1 induise la différenciation cellulaire (92).

Pour certains types cellulaires, la différenciation peut être induite par un arrêt de signalisation de la voie MAPK^{ERK}. Chez les HT29-18-N2, un sous-clone d'une lignée de cellules dérivées du cancer du colon humain, l'arrêt de la voie MAPK^{ERK} par l'inhibiteur PD098059 de MEK induit la différenciation des composantes de l'unité crypte-villosité de ces cellules (162). L'inhibition de la voie MAPK^{ERK} induit aussi la différenciation de cellules mélanomes B16 (46).

Il est intéressant de noter que dans les cellules glomérulaires mésangiales, les ARN messagers (acide ribonucléique) de ERK et de MEK sont contrôlés différemment lorsque la voie MARK^{ERK} est activée à long terme. Contrairement à ERK, l'induction des ARN messagers de MEK est dépendante de la synthèse de nouvelles protéines ainsi que la durée de la stimulation de la voie par le sérum, l'endothéline-1

et le PDGF BB. De plus, l'augmentation de l'expression des ARN messagers de MEK induite par le sérum est accompagnée par une augmentation de l'expression de ces protéines, de l'activité de MEK et de ERK (141).

1.6.1.4 LA MIGRATION

La migration cellulaire est un phénomène essentiel pour une variété de processus biologiques allant du développement et de l'angiogénèse jusqu'à la formation des métastases. Cette mobilité est induite par plusieurs facteurs de croissance agissant sur des récepteurs qui possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque. Parmi les cellules capables de migrer, nous retrouvons les cellules musculaires lisses vasculaires impliquées dans la formation néointimale et dans l'athérosclérose. La migration de ces cellules est possible grâce à l'activation de ERK1 et ERK2 par le PDGF-BB, l'angiotensine II, les esters de phorbols et la signalisation chimiotactique de TNF-alpha (17, 56, 60, 86, 115, 124). Les ERKs ainsi activés augmentent l'activité kinase de la MLCK (myosin light chain kinase) qui phosphoryle à son tour la chaîne légère de la myosine (86).

D'autres types cellulaires sont également capables de migrer en réponse à un stimulus chimiotactique. Suite à une lésion, la prolifération et la migration des cellules mésangiales est assurée par la voie PI-3 kinase qui a pour cible ERK (31). Dans les cellules HT29 de carcinome du colon, le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) règle la mobilité cellulaire par les intégrines et par ERK (66). Chez les cellules neuro-épithéliome embryonnaire SK-N-MC, une activation soutenue de ERK2 serait impliquée dans la dispersion des cellules (169). Cependant, il existe des cas où l'activation de la voie MAPK^{ERK} ne soit pas suffisante pour induire la migration cellulaire. Par exemple, c'est le cas où la mobilité est relayée par le récepteur EGF. L'activité de ERK ne semble pas être suffisante pour induire la migration cellulaire alors que l'activité de la phospholipase C est requise (30). Par ailleurs, chez les neutrophiles, la migration est dépendante de l'activation de tyrosine kinases et de la protéine kinase C. Elle est de plus partiellement dépendante de l'activation de la PI-3 kinase et n'implique pas l'activation des ERKs (186).

1.6.2 INACTIVATION DE LA VOIE MAPK^{ERK}

Les MAP kinases ERK1 et ERK2 sont déphosphorylées sur leur motif d'activation Thr (P) – Glu – Tyr (P) par une famille de phosphatases à double spécificité. Ces protéines tyrosine phosphatases (PTPases) sont caractérisées par la séquence (I/V) HCXAGXXR (S/T)G qui est essentielle pour leur activité. Certaines d'entre elles sont situées dans le noyau, tel MKP-1, MKP-2, PAC 1, VHR, B23, M3/6, alors que d'autres sont situées dans le cytoplasme, tel MKP-3 et MKP-4. Elles permettent à ERK de se réassocier avec MEK1 dans le cytoplasme (64, 177). Parmi ces phosphatases, MKP-1, MKP-3 et MKP-4 sont plus sélectives pour déphosphoryler ERK1 et ERK2 que les autres MAPKs alors que M3/6 qui est très spécifique pour MAPK^{P38} et MAPK^{JNK} (64, 109, 140, 149, 177).

Suite à l'activation et à la translocation nucléaire de ERK, il y a induction du gène MKP-1. La cinétique de la synthèse de MKP-1 coïncide partiellement avec la cinétique d'inactivation de ERK dans des fibroblastes 3T3 de souris stimulées avec du sérum (160). Il a donc été proposé que MKP-1 exercerait un effet de rétroinhibition sur la signalisation de la voie MAPK^{ERK}. Cependant, dans les cellules PC12, même s'il y a induction de l'expression de l'ARN messager de MKP-1 par le EGF, l'inactivation de ERK se fait avant même l'induction de MKP-1 (182). Ceci suggère que les mécanismes d'inactivation de ERK sont dépendants du type cellulaire et du type de stimulation. Tout comme MKP-1, l'expression de MKP-3 est, elle aussi, induite par la voie ERK. De plus, MKP-3 est localisée dans le cytoplasme (109, 110). Elle se lie au domaine N-terminal de ERK, ce qui stimule 30 fois son activité phosphatase pour ERK (109). D'autres phosphatases comme PP1 (proteïn phosphatase 1) et PP2A (phosphoprotéin phosphatase 2A), à spécificité sérine/thréonine, viennent également contrôler la voie MAPK^{ERK} mais cette fois en déphosphorylant MEK et Raf activés (140).

1.6.3 AUTRES RÉCEPTEURS CAPABLES D'ACTIVER LA VOIE MAPK^{ERK}

Les récepteurs à activité tyrosine kinase ne sont pas les seuls à être capables d'activer la voie MAPK^{ERK}. On retrouve aussi des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase, comme le récepteur TGF-β1 (transforming growth factor-β1) qui active PKC et stimule la voie MAPK^{ERK} (12, 128). On retrouve également des

récepteurs ne possédant aucune activité tyrosine kinase comme les récepteurs des cytokines. Parmi ceux-ci, nous retrouvons le récepteur CD28 qui appartient aux cellules T ainsi que le récepteur sur les cellules B (2, 177). Ils activent la voie ERK par l'intermédiaire de tyrosines kinases de la famille Src, comme Yes, Syk, Lyn, Lck ou Fyn. Ces dernières permettent la phosphorylation en tyrosine des récepteurs et de Shc. Il s'en suit, comme pour les récepteurs à activité tyrosine kinase, le recrutement de Grb2/SOS suivi de l'échange de GDP pour du GTP sur Ras et finalement, l'activation de la voie MAPK^{ERK} (2, 177). D'autres récepteurs à cytokines activent la voie MAPK^{ERK} via un mécanisme différent, soit par l'activation des JAKs (Janus kinase-1, -2, -3 et Tyk 2) qui en plus de phosphoryler STAT peuvent phosphoryler Shc. En retour, ERK1 et ERK2 peuvent phosphoryler et contrôler l'activité de STAT (177).

Les récepteurs couplés aux protéines G activent également la voie MAPK^{ERK}. Dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G_i, leur sous-unité βγ permet l'accumulation de Ras actif et stimule la phosphorylation en tyrosine de Shc (2, 157, 177) par un mécanisme dépendant de PI-3 kinase (31). Ainsi, les complexes Shc-Grb2 connectent le signal des récepteurs couplés aux protéines G à ERK. Pour les récepteurs couplés aux protéines G_{αq/11}, le mécanisme est indépendant de PI-3 kinase γ mais dépendant de la stimulation des protéines G_{αq/11} et de l'activation de la phospholipase C-β (157, 165). Par conséquent, le calcium intracellulaire active Pyk2, une tyrosine kinase riche en prolines, qui active à son tour soit Shc en la phosphorylant en tyrosines ou permet le recrutement de complexes Grb2/SOS de la même façon que pour les récepteurs tyrosine kinases, activant ainsi Ras (2, 177). En ce qui a trait aux récepteurs couplés aux protéines G_{sα}, la signalisation jusqu'à ERK est dépendante de la protéine kinase A qui implique la participation de deux autres protéines, Rap1 et B-Raf mais non Ras (173).

Finalement, les intégrines peuvent aussi activer la voie MAPK^{ERK}. Ces récepteurs transmembranaires se lient à des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, le collagène et la vitronectine permettant ainsi la formation de points d'adhésions focaux qui relient les intégrines aux fibres d'actines. Cette liaison d'intégrines est relayée en partie par Rho qui active la voie MAPK^{ERK} (2, 25, 177).

1.6.4 RÉGULATION DE LA VOIE ERK PAR LES PROTÉINES ADAPTATRICES

Des protéines adaptatrices entrent également en jeu pour faciliter le passage rapide d'un signal dans une cascade MAP kinase. Les protéines 14-3-3 sont des dimères qui s'attachent, entre autres, à Raf-1 lorsqu'il est phosphorylé en sérines et en thréonines. Ainsi Raf-1 se trouve protégé contre sa déphosphorylation et peut demeurer actif plus longtemps. KSR (kinase suppressor of Ras) et MP1 lient toutes les deux ERK et MEK1 (2, 78, 139, 176, 196). Elles facilitent l'activation de ERK par MEK. Si KSR semble jouer un rôle positif dans la signalisation entre MEK et ERK, il ne demeure pas moins que cette protéine adaptatrice puisse empêcher ERK activé de phosphoryler un de ses substrats, Elk-1, sans affecter l'activité kinase de ERK dans les cellules de mammifères (158). Ceci pourrait expliquer comment différentes réponses physiologiques sont générées à partir de l'activation d'un ensemble commun de kinases. KSR pourrait permettre à la voie MAPK^{ERK} de moduler une réponse cellulaire différente en affectant certains substrats de ERK sans affecter la phosphorylation de d'autres substrats (158).

1.6.5 RÉGULATION CROISÉE ENTRE LA VOIE MAPK^{ERK} ET D'AUTRES VOIES DE SIGNALISATION

Les mécanismes de signalisation sont compliqués par l'existence de phénomène de régulation croisée. Par exemple, Rac 1 et Cdc42 hs, de petites protéines G de la famille Rho qui activent la voie MAPK^{JNK}, coopère aussi avec Raf-1 pour activer la voie MAPK^{ERK} par le biais de PAK1 (p21-activated kinase). PAK1 phosphoryle MEK sur deux sites, la sérine 298 et la thréonine 292, nécessaires à la liaison entre Raf-1 et MEK in vivo. Ainsi, la phosphorylation de MEK permet son association avec Raf-1, qui en retour augmente l'activité de MEK (49). La voie MAPK^{ERK} module également l'activité des JAKs qui, non seulement permettent l'activation des STATs, mais agissent aussi en aval de Ras pour activer la voie MAPK^{ERK}. Par conséquent, la coopération qui existe entre la voie MAPK^{JNK} et la voie MAPK^{ERK}, permet de maximiser la transcription de gènes comme c-fos grâce à l'activation de facteurs de transcription qui se lient aux sites SIE (Sis-inducible element) et à SRE (serum response element) dans le promoteur (156, 179). La régulation croisée peut être aussi induite par PKC δ . La phospholipase C, PI-3 kinase et d'autres molécules produisent divers métabolites lipidiques qui activent ensuite PKC δ . Cette dernière active la voie MAPK^{ERK} via Raf (167). Chez les cellules PC12 et les neurones de

l'hippocampe, le calcium Ca^{2+} permet la transcription des gènes médiés par CRE (AMP cyclic response element). Cette transcription est rendue possible grâce à PKA (protéine kinase A) qui active indirectement ERK. PKA pourrait permettre la formation de dimères de ERKs ou encore faciliter le transport nucléaire de ceux-ci. L'activation persistante de ERK amène donc à l'activation de Rsk2 et tous deux sont relocalisés au noyau. Ils phosphorylent et activent CREB (AMP cyclic response element binding protein) permettant ainsi l'expression des gènes médiés par CRE (AMP cyclic response element) (72).

1.7 LES MEMBRES DE LA FAMILLE MKK

La famille des MAP kinase kinases comprend 7 membres de MEK1 à MEK7. MEK1/2 activent ERK1/2, MEK3/6 activent p38, MEK4 et MEK7 activent JNK/SAPK et finalement, MEK5 active ERK5 (80, 132, 198). La spécificité des enzymes MEK est très fine et il n'existe pas d'activation croisée entre les diverses MAP kinases.

En ce qui concerne les MAPK kinases de la voie ERK, MEK1 se lie préférentiellement à A-Raf alors que Raf-1 active autant MEK1 que MEK2 (184). En ce qui a trait à B-Raf, il se lie à MEK1 et MEK2 mais il active mieux MEK1 que MEK2 (131). Le choix de l'isoforme de Raf qui activera MEK est en partie déterminé par les niveaux d'AMP cyclique. En effet, une concentration intracellulaire élevée d'AMP cyclique inhibe sélectivement Raf-1 dans les cellules fibroblastes Rat-1, possiblement par la phosphorylation directe de Raf-1 par PKA (34, 147, 183). A-Raf et B-Raf ne sont pas les seules MKKK capables d'activer MEK. MEK1 et MEK2 peuvent aussi être activées par MEKK-1, MEKK-2, MEKK-3 tous de la voie JNK, par MKKK^{mos} produit du protooncogène c-Mos des œufs et oocytes de *Xenopus* et par MKKK^{tp12} (14, 85, 89, 96, 114, 123, 137, 140, 177, 187).

1.7.1 EXPRESSION DE MKK^{MEK1/MEK2}

MEK1 et MEK2 sont deux enzymes ubiquitaires, mais leurs niveaux d'expression diffèrent selon les tissus et les stades de développement. Par exemple, l'expression de MEK2 est très élevée dans la rate et les intestins mais elle est plus faible dans le cœur et le cerveau adulte. Par contre, son expression est 5 fois plus élevée dans le cerveau néonatal (19). MEK1 montre une plus forte expression dans le cerveau adulte mais les niveaux de protéines sont faibles dans le cœur (19).

L'expression de MEK1 est vitale pour le développement embryonnaire. MEK2 ne compenserait pas pour l'absence de MEK1. Des embryons de souris dont le gène MEK1 a été inactivé par mutagénèse meurent après 10,5 jours de gestation. Les résultats ont permis de démontrer l'implication du gène MEK1 dans la signalisation de la fibronectine qui permet aux fibroblastes de migrer et d'assurer la vascularisation de la région labyrinthine du placenta (55).

1.7.2 STRUCTURE DE MKK^{MEK1/MEK2}

Raf-1, c-Mos et les MAPKKs phosphorylent MEK1 et MEK2 sur leurs résidus sérines 218 et sérine 222. Ces deux sérines sont localisées dans la boucle d'activation entre les sous-domaines VII et VIII (33, 118, 129). Les MAPKKs phosphorylent d'abord la sérine 218 qui se trouve à être l'étape limitante. La sérine 222 est ensuite phosphorylée rapidement. Raf-1, quant à lui, semble phosphoryler les deux sérines de façon approximativement égale (8,189). Les séquences de MEK1 et MEK2 sont 85% identiques, leurs différences se situent dans le domaine N-terminal et dans une région riche en prolines, située entre les domaines IX et X. Les prolines de cette région sont, par contre, bien conservées entre MEK1 et MEK2 (19, 33, 187).

1.7.3 INSERTION RICHE EN PROLINES DE MKK^{MEK1/MEK2}

Cette région riche en prolines ne se retrouve nulle part ailleurs chez les autres membre de la famille MAPKK de la levure à l'humain (24, 41, 133, 188). Elle jouerait donc une fonction unique pour la voie MAPK^{ERK}. En effet, la délétion de la région riche en prolines de MEK1 empêche celle-ci de s'associer aux membres de la famille Raf en plus de diminuer son activation in vivo suite à la stimulation par des facteurs de croissance (24, 33, 41, 140). La substitution en alanine de résidus dans cette région n'affecte pas l'activité enzymatique alors que l'introduction de prolines dans l'insert augmente l'activité kinase de MEK1 (95).

MEK1 possède dans cette région, une thréonine en position 292 qui n'a pas été conservée chez MEK2 (24). Cette thréonine, une fois phosphorylée, permet la formation d'un complexe ternaire entre MEK1-Raf-Ras-GTP qui rend MEK1 active plus longtemps que MEK2 par l'association prolongée ou répétée de MEK1 avec Raf

(24, 77). Bien que la phosphorylation de sites comme la thréonine 292 dans la région riche en prolines de MEK1 module le couplage entre MEK et Raf, cette région n'est pas le site de liaison à Raf-1 (41). La région riche en prolines peut être phosphorylée aussi par les ERKs, Cdk 2 et PAK 1 in vitro (24, 41, 49). En plus de la thréonine 292, MEK1 possède une autre thréonine en position 286 qui est également phosphorylée in vitro et in vivo (158). Ces deux thréonines font partie d'un site consensus de phosphorylation pour p34^{CDC2}, une protéine sérine / thréonine kinase qui règle la division cellulaire. Cette enzyme catalyse la phosphorylation in vitro des deux thréonines, ce qui diminue l'activité enzymatique de MEK1 (11, 134).

Il est à noter que la région riche en prolines contient un nombre d'éléments similaires aux domaines SH3 et que l'un de ces éléments est entouré de sites de phosphorylation spécifiques à MEK1. Toutefois, aucun de ces éléments n'a d'identité avec les domaines SH3 connus (25). Malgré cela, ces éléments pourraient être impliqués dans la spécificité des interactions protéine-protéine de MEK1 et MEK2 avec leurs activateurs, leurs substrats ou les protéines adaptatrices et régulatrices (19).

ERK1 et ERK2 une fois activés par MEK1 et MEK2 sont capables de phosphoryler les deux MEKs près de leur extrémité C-terminale sur la séquence consensus PX (S/T)P. Cette phosphorylation a pour effet de diminuer l'activité kinase des MEKs. MEK1 possède deux de ces séquences consensus, soit PRTP entre les résidus 290 et 293 ainsi que PSTP entre les résidus 384 à 388. MEK2, quant à elle, possède une séquence PGTP entre les résidus 392 à 395. Cette séquence correspond à la deuxième séquence consensus de MEK1 (19, 33, 198).

1.7.3.1 SÉQUENCE D'EXPORTATION NUCLÉAIRE DE MKK^{MEK1/MEK2}

Suite à une stimulation par un agoniste, MEK1 et MEK2 sont massivement relocalisées au noyau d'où elles vont ressortir aussi rapidement grâce à une séquence d'exportation nucléaire communément appelée la NES (nuclear export signal) (50, 74, 82, 133, 140). Cette séquence, riche en leucines, se situe entre les acides aminés 32 à 44 dans la région N-terminale de MEK (50). Elle fait en sorte que les deux isoformes de MEK se retrouvent dans le cytoplasme des cellules (74, 133). De plus, la NES servirait d'ancre à ERK qui se lie au domaine N-terminal de MEK

dans le cytoplasme (50, 140). En effet, des mutants de MEK avec une NES dysfonctionnelle ont été incapables de retenir ERK dans le cytoplasme. Par conséquent, la distribution de MEK et de ERK est uniforme dans le cytoplasme et dans le noyau (50). L'importation de MEK au noyau dépend de l'incorporation de phosphate ou de la présence de résidus chargés négativement sur la boucle d'activation. Elle est totalement indépendante de l'activité de l'enzyme (163).

1.7.4 RÔLES DE MKK^{MEK1/MEK2} DANS LE NOYAU

Ce n'est que lors de la prophase que les deux isoformes de MEK subissent une importante relocalisation nucléaire et ce, malgré la présence de leur séquence NES (149, 163). Il existe donc un mécanisme qui retarderait l'exportation de MEK et qui stabiliserait les MEKs et les ERKs activés dans le noyau, afin de promouvoir l'entrée en phase M des cellules somatiques (163). Tout comme ERK, MEK activé se situe aux fuseaux mitotiques lors de la métaphase et de l'anaphase. Cependant, MEK activé est totalement exclu des chromosomes et apparaît plus diffus dans les cellules en métaphase (148, 197). En plus de se retrouver dans le noyau, MEK1 serait requise pour la fragmentation du Golgi durant la mitose (4).

MEK n'est pas uniquement impliquée dans le contrôle de l'entrée en phase M de cellules. Une activation prolongée des MEKs et des ERKs ainsi que la rétention des ERKs dans le noyau est requise pour la transition G₀/G₁ (20) et pour l'induction de la transcription du gène cycline D1 (29, 88). Cette induction de la transcription du gène cycline D1 amène à une transition G₁/S. Suite à la stimulation de cellules NIH 3T3 par du CSF-1 (colony-stimulating factor-1), MEK1 coopère avec d'autres signaux en provenance du récepteur CSF-1 pour induire l'expression de c-Myc et permettre l'entrée en phase S (27). Le cycle cellulaire est de plus contrôlé par l'activation de MEK2 qui est essentielle aux cellules endommagées par la radiation ionisante. Suite à l'arrêt en phase G₂/M qui est nécessaire à la réparation adéquate de l'ADN, MEK2 permet aux cellules de progresser dans le cycle, grâce à l'activation de ERK et à sa localisation aux centres organisateurs de microtubules (1).

1.8 IMPLICATION POSSIBLE DE LA VOIE MAPK^{ERK} DANS DIVERSES PATHOLOGIES

Le rôle des voies MAPK et plus particulièrement la voie MAPK^{ERK} dans la progression du cycle cellulaire, la migration, la croissance, la différenciation cellulaire et la sénescence suggère que ces voies peuvent être impliquées dans la pathogénèse de certaines maladies.

1.8.1 LE SYNDROME DE L'IMMUNITÉ DÉFICIENTE ACQUISE

Le virus de type HIV-1 induit une dérégulation du système immunitaire. En se liant aux récepteurs CD4, il active la voie MEK/ERK kinase, stimule l'expression de facteurs nucléaires comme AP-1, NF- κ B et C/EBP ce qui amène à l'expression aberrante des gènes de l'inflammation (121). L'infection de cellules hôtes par le HIV-1 requiert la collaboration de ERK pour la phosphorylation de son complexe de transcription inverse. Ce dernier est alors relocalisé au noyau afin de permettre la synthèse d'acides nucléiques viraux (75). ERK phosphoryle également une protéine virale, Vif, qui est nécessaire à la réplication du virus et à l'infection de cellules hôtes (190). Toutefois, l'activation de ERK permet aussi d'augmenter le taux de réplication du virus et l'infection dans certaines lignées cellulaires qui ne requièrent pas la fonction de Vif. Ceci suggère que d'autres protéines virales comme Rev, Tat, p17(Gag), et Nef pourraient être des substrats potentiels de ERK (191).

1.8.2 RÔLES DES PROTÉINES DE LA VOIE MAPK^{ERK} DANS LE DÉVELOPPEMENT DU CANCER

Plusieurs protéines sérine/thréonine kinases sont impliquées dans la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Les transformations malignes sont souvent initiées par des mutations sur ces protéines ce qui permet d'amplifier les signaux provenant de ces proto-oncogènes. Par exemple, Ras oncogénique induit la transformation en activant la voie Raf-1/MEK/ERK (81) et en augmentant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire (48). Les mutations des protéines sérine/thréonine kinases sont également responsables des changements dans l'expression génique, dans l'architecture du cytosquelette, dans les interactions entre les cellules ainsi que dans le métabolisme (172).

Ainsi, la substitution des deux sérines régulatrices de MEK1, les sérines 218 et 222, par deux acides aspartique ou par deux acides glutamique induit la transformation morphologique des cellules comme les NIH 3T3 (36). Les NIH 3T3 deviennent plus petites, plus rondes et plus réfractiles (7). Ces mêmes mutations entraînent l'activation de la transcription de AP-1, la perte d'encrage et le développement des tumeurs solides chez les souris nues (96, 98). D'ailleurs, la délétion des acides aminés 32-52 du domaine N-terminal de MEK1 augmente la capacité de MEK1 à pouvoir transformer les cellules de rongeurs (20) en plus de permettre l'entrée en phase S de cellules Swiss 3T3 (59).

Alors que des lignées de cellules tumorales provenant du cerveau, de l'œsophage, de l'estomac, du foie ou d'une origine hématopoïétique montrent une activation limitée des ERKs, des lignées de cellules tumorales isolées du pancréas, du colon, du poumon, des ovaires et des reins montrent une activation constitutive des ERKs qui est associée à l'activation des MEKs (69, 112). Bien que MEK soit activée dans des lignées de cellules tumorales du poumon, sur 37 lignées de cancer du poumon étudiées, aucune mutation changeant la séquence en acides aminés de MEK1 ou MEK2 n'a été détectée (13). L'activation de MEK peut être due à des mutations dans le gène Ras, Raf-1 ou toute autre molécule en amont de Ras comme la surexpression du récepteur EGF (69).

MEK pourrait aussi participer au développement, à la progression (107) et au caractère envahissant des tumeurs activées par la sécrétion autocrine et/ou paracrine de facteurs de croissance. Par exemple, UM-SCC-1 et MDA-TU-138, deux lignées de cellules carcinomes squameuses qui sécrètent très avidement l'activateur du plasminogène (151).

1.8.2.1 CHANGEMENT DANS L'EXPRESSION DES PROTÉINES DE LA VOIE MAPK^{ERK}

Des changements au niveau de l'expression de protéines peuvent également jouer un rôle dans le processus tumoral. Par exemple, la surexpression et l'autophosphorylation du récepteur ErbB2/Neu qui permet le couplage de Ras à la voie MEK/ERK kinase, augmentent considérablement l'activité de ERK dans des lignées de cellules du cancer du sein (9, 76). Le récepteur ErbB2 est surexprimé

dans 20 à 30% des cancers du sein. Il jouerait un rôle important dans le développement et dans la progression des tumeurs (152). Le récepteur EGF reconnu pour activer la voie MAPK^{ERK} est lui aussi surexprimé dans approximativement 40% des carcinomes du sein (22). La protéine CR-1 qui appartient à la famille des facteurs de croissance épidermiques et qui est différentiellement exprimée, active la voie Ras/Raf/MEK/MAPK chez plusieurs lignées différentes de cellules du cancer du sein humain (79).

MEK1 est également surexprimée dans plusieurs types de tumeurs (117). Sur 25 tumeurs de carcinomes rénaux humains, il y en a 13 qui ont montré une surexpression de MEK. Cette surexpression est associée de très près à l'augmentation de l'activité de ERK et de Raf-1 (117). Pour la première fois, la hausse de l'expression et de l'activité (103) de MEK1 et MEK2 a été démontrée dans 23 lignées de cancer du sein humain (136).

1.8.2.2 ACTIONS DES CARCINOGENES ET DES HORMONES STÉROÏDIENNES

Certains agents cancéreux ciblent la voie MAPK^{ERK} pour exercer leur effet. Entre autres, les esters de phorbol, des agents promoteurs de tumeurs, activent la PKC qui, à son tour, phosphoryle Raf-1 pour activer la voie ERK (94). Le BHTOOH (butylated hydroxytoluene hydroperoxide), un agent promoteur de tumeurs de la peau, stimule très rapidement l'activation de la voie MAPK^{ERK} in vivo et dans des kératinocytes de souris (63). La nicotine active la voie MAPK^{ERK} dans des cellules du cancer du poumon, et plus particulièrement ERK2, ce qui résulte en l'augmentation de l'expression de la protéine bcl-2 et l'inhibition de l'apoptose de ces cellules. Elle active aussi la voie PKC mais celle-ci n'est pas responsable de l'activation de ERK2. De plus, la nicotine prévient l'inhibition de PKC et de ERK2 par des agents anticancéreux, comme les dérivés opioïdes thérapeutiques (68).

Les hormones stéroïdiennes qui contrôlent la différenciation et la prolifération de différents types de cellules, sont aussi impliquées dans le développement de tumeurs. Dans les cellules COS, l'estradiol active la voie MAPK^{ERK} via son récepteur qui active c-src. Dans les cellules MCF-7, l'estradiol active la voie MAPK^{ERK} avec des cinétiques similaires à ceux des peptides mitogéniques (105). Des hormones pituitaires sont capables, elles aussi, d'induire et de favoriser la progression de tu-

meurs mammaires. La prolactine, en se liant à son récepteur, active rapidement et de façon transitoire la voie Raf-MEK-ERK dans des cellules de cancer du sein humain (T47D) (42). De plus, la présence du récepteur à prolactine a été démontrée dans 70% des biopsies du cancer du sein humain (16). Le rôle de MEK dans la promotion du développement tumoral est, de plus, renforcé par son implication dans des mécanismes anti-apoptotiques. Notamment, par l'induction de l'expression de FLIP qui inhibe l'initiation de la mort cellulaire en prévenant le recrutement de FADD (Fas-associated death domain protein) par FAS (CD95 ou Apo1), une protéine transmembranaire dans les cellules normales et transformées (194).

1.8.2.3 EFFETS DES RADIATIONS, DE LA DÉPRIVATION DE GLUCOSE ET DES AGENTS GÉNOTOXIQUES

Les radiations ionisantes activent la voie MAPK^{ERK} dans les cellules du cancer du sein MDA-MB 231 (161). La déprivation en glucose à des cellules de carcinomes de sein humaines résistantes aux drogues, les MCF-7/ADR, provoque une forte stimulation des ERKs et augmente plus de 3 fois l'activité de MEK, Raf, Ras et PKC (62). Les agents génotoxiques, comme certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), inhibent la communication intracellulaire GJIC (Gap-junction intracellular communication) et induisent la phosphorylation de ERK1 et ERK2. Les cellules peuvent alors proliférer sans la présence des mécanismes supresseurs de la croissance et activer des événements mitogéniques (135).

1.9 MEK1, UNE NOUVELLE CIBLE DANS LE DÉVELOPPEMENT DE MÉDICAMENTS CONTRE LE CANCER

Les MEKs jouent donc un rôle central dans la signalisation cellulaire et la transformation. Des mutants activés des gènes MEK peuvent devenir de véritables oncogènes dominants. Cela explique pourquoi MEK1 est aujourd'hui une cible de choix dans le développement de nouvelles thérapies contre le cancer. D'ailleurs, le PD184352, un nouvel inhibiteur sélectif de MEK, montre un très haut degré d'efficacité anti-tumoral in vitro et in vivo. Cet inhibiteur prévient l'activation des ERKs dans un grand nombre de cellules carcinomes du colon, du col de l'utérus, du pancréas et du sein en plus de renverser le phénotype de cellules transformées vers un phénotype sauvage (44). L'inhibition de la signalisation MEK/ERK vient donc inhiber la croissance de tumeurs du colon in vivo non seulement en interférant avec la transmission de signaux prolifératifs mais aussi en bloquant la perte de contact

entre les cellules, la mobilité requise pour l'invasion des tumeurs et la formation des métastases (142). Le PD184352 rejoint maintenant une liste croissante d'agents qui sont cytostatiques pour la croissance des tumeurs comme les inhibiteurs de la farnesyl transférase et les inhibiteurs de l'angiogénèse (142).

À la lumière de ces informations, il s'avère crucial de comprendre les mécanismes de régulation de l'activité des enzymes MEK1 et MEK2. Le réseau des connections entre les voies de signalisation est très complexe et il varie en fonction du type cellulaire, du ligand, du récepteur ciblé et des effecteurs présents. La compréhension de ce réseau ne pourra être complète que lorsque le contrôle qui s'exerce sur l'activité des enzymes, soit par le biais de phosphatases, par des mécanismes de rétro-inhibition, de rétro-activation ou encore par des mécanismes d'auto-régulation interne aura été étudié.

Dans cette étude, nous avons construit une série de mutants des enzymes MEK1 et MEK2. Ces mutations visaient à perturber des sites possibles de phosphorylation ou d'interactions protéine-protéine dans le but de mieux comprendre leur régulation. Nos résultats ont permis de démontrer qu'une sérine en position 212, juste en aval des deux sérines activatrices de MEK1, soit les sérines 218 et 222, jouerait un rôle dans la régulation négative de l'activité des deux isoformes de MEK. L'activité kinase du mutant S212A, où la sérine en position 212 a été remplacée par une alanine, est 5 fois plus élevée que la forme sauvage de MEK dans les cellules 293. Des études de marquage *in vivo* de MEK1 ainsi que l'analyse des phosphopeptides et des phosphoaminoacides suggèrent que la sérine en position 212 est phosphorylée *in vivo*. Ces résultats montrent pour la première fois l'existence d'un mécanisme d'auto-régulation négative des MAP kinase kinases possiblement par autophosphorylation. Ainsi, lorsque seules les sérines 218 et 222 sont phosphorylées, les MEKs ont un niveau d'activité enzymatique maximale, mais lorsque s'ajoute la phosphorylation de la sérine 212, l'activité de MEK1 et MEK2 se trouve inhibée.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIAUX

Les milieux pour la culture cellulaire ont été achetés chez Life Technologies (Bethesda, MD). L'acide phosphorique [^{32}P] pour le marquage in vivo et l'ATP [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] pour les essais kinases ont été obtenus par Amersham Corp. (Arlington Heights, IL). Les inhibiteurs de protéases, le MBP (myelin basic protein) et l'orthovanadate de sodium ont été achetés chez Sigma (St.Louis, MO). La protéine glutathione S-transférase recombinante (GST)-ERK1 a été exprimée par transformation dans *Escherichia coli* avec le plasmide pGST-ERK1 puis absorbée sur des billes de glutathione-agarose. La protéine recombinante ERK1 est purifiée suite au clivage de la protéine de fusion GST-ERK1 avec la thrombine directement sur les billes. Les billes de protéine A-Sépharose ont été achetées chez Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ).

L'anticorps monoclonal 12CA5 et l'anti-corps GMP-HRP anti-immunoglobuline G de souris couplé à la peroxydase de raifort sont un cadeau de Michael Dennis. Le ECL (enhanced chemiluminescence) provient de Amersham Pharmacia Biothech et les membranes de nitrocellulose Hybond-C proviennent de Amersham Life Sciences. La mutagénèse a été rendue possible grâce au système de mutagénèse dirigée par site modifié de Promega. Le vecteur pRC-CMV a été acheté chez Invitrogen (La Jollo, CA), le gène MEK1 vient du laboratoire de Sylvain Meloche (103) et l'ADN complémentaire de MEK2 1,4-Kb est un cadeau du Dr. Kun Liang Guan, de l'Université du Michigan.

2.2 SOUS-CLONAGE ET MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE

Le fragment du gène MEK1 humain coupé franc au nucléotide 56 par Bst U1 et cohésif au nucléotide 1717 par Sph1 a d'abord été sous-cloné dans pAlter-1 puis dans pGEX-KG par la digestion Sac1/HindIII. La digestion Xba1/Hind III de pGEX-KG a permis de libérer un fragment contenant MEK1 qui a été réintroduit dans le vecteur pAlter-1 (Promega).

Quant au fragment du gène MEK2 humain coupé EcoR1 à la position 1 et PVU II à la position 1354, il a été sous-cloné directement dans le vecteur pAlter-1 (Promega) préalablement coupé EcoR1/Sma1.

Les gènes MEK1 et MEK2 ainsi sous-clonés dans le vecteur pALTER-1 ont pu être mutés grâce au système de mutagénèse dirigée par site modifié (Promega) selon les instructions du manufacturier. Des oligonucléotides synthétiques contenant les nucléotides mutés ont servi à la mutagénèse. Les mutations ont été vérifiées par le séquençage.

2.3 EXPRESSION DES MUTANTS MEK1

Le gène MEK1 humain sous sa forme sauvage de la position 76 à 1671 avec l'épitope hémagglutinine (HA) positionné en N-terminal du fragment avait déjà été introduit dans le vecteur pBluescript (-) entre les sites Hind III(689) et Xba1 (731) (Cadeau de Johanne Pellerin). La digestion Hind III/Xba1 a permis de sous-cloner le gène MEK1 et l'épitope HA dans le vecteur pRC-CMV.

Tous les mutants MEK1 dans pALTER-1 obtenus par la mutagénèse dirigée puis vérifiés par le séquençage ont d'abord été digérés par Hpa1/Bgl II. Les inserts MEK1 mutés ainsi libérés ont été sous-clonés dans pBluescript qui contenait déjà l'épitope HA et le gène MEK1 sauvage. La digestion Hpa1/Bgl II a permis de remplacer le gène MEK1 sauvage par le gène MEK1 muté dans pBluescript. Par conséquent, la digestion Hind III/Xba1 a permis d'introduire les fragments contenant l'épitope HA et les gènes mutés dans le vecteur pRC-CMV.

2.4 EXPRESSION DES MUTANTS MEK2

Le fragment du gène MEK2 contenu dans le vecteur pAlter-1 a d'abord été modifié pour introduire deux nouveaux sites par mutagénèse dirigée. Un site EcoR1 en position 82 dans le gène MEK2 puis un site Not 1 sur le vecteur pALTER-1 détruisant ainsi les sites Xba 1 (32) et Sal 1 (38). Par conséquent, la digestion EcoR1/Not 1 a permis de sous-cloner le fragment MEK2 sauvage dans le vecteur pBluescript auquel avait été ajouté l'épitope hémagglutinine entre les sites Hind III (689) et EcoR1 (701) du vecteur. Par conséquent, la digestion Hind III/Not 1 de

pBluescript a sorti un fragment contenant le gène MEK2 sauvage et l'épitope HA positionné en N-terminal du gène MEK2. Ce fragment a été introduit dans le vecteur pRC-CMV.

Les mutants MEK2 dans pALTER-1 obtenus par la mutagenèse dirigée puis vérifiés par le séquençage ont d'abord été digérés par BstB1/Xba1. Les inserts ainsi libérés ont été sous-clonés dans le vecteur pBluescript. Ce dernier contenait déjà l'épitope HA et le gène MEK2 sauvage. Par conséquent, la digestion Hind III/Not1 a permis d'introduire le fragment contenant l'épitope HA et le gène MEK2 muté dans le vecteur pRC-CMV.

2.5 CARACTÉRISATION DES LIGNÉES CELLULAIRES

Les cellules 293 de reins humains ont été cultivées dans le milieu essentiel minimum (MEM) de Gibco auquel a été ajouté 10% de sérum foetal bovin et d'antibiotiques. Les cellules en phase exponentielle ont été réétalées lorsque leur population a atteint 80 à 90 % de confluence. Les transfections transitoires ont été faites à 50% de confluence des cellules avec 2 µg d'ADN et 8 µg de vecteur seul. Les cellules 293 exprimant les mutants MEK1 ou MEK2 (MEK sauvage, S212D, DDD, AA, AAA, ADD, AEE, K97A, K101A, DD, EE, T286A, T292A) ont été obtenues par la transformation transitoire des plasmides pCR-CMV contenant le gène MEK1 ou MEK2 à l'aide du phosphate de calcium. 24 heures après le début des transfections, le milieu de culture dans lequel incubaient les cellules a été changé soit pour le même (MEM avec du sérum foetal bovin et des antibiotiques) dans le cas des cellules qui demeuraient en phase exponentielle ou soit pour le milieu STOP (DMEM⁺ F-12) dans le cas des cellules quiescentes. 24 heures plus tard, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS (phosphate-buffered-saline) froid puis congelées dans de l'azote liquide pour être conservées à -80°C.

2.6 IMMUNOPRÉCIPITATION

Suite à la congélation des cellules 293 transfectées avec les mutants MEK1 et MEK2, les cellules sont lysées pendant 30 minutes dans 0,9 ml de tampon de lyse Triton X-100 froid [50 mM tris (hydroxy-méthyl) aminométhane – HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 0,1 µM phénylméthyl sulfonyl fluoride, 1mg/µl

leupeptine, 1 μ M pepstatine A, 200 μ M orthovanadate de sodium, 1% Triton X100 M, 40 mM β -glycérophosphate]. Les lysats de cellules ont ensuite été transférés dans des tubes de 1,5 ml afin d'être centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 10,000g (54).

2.7 IMMUNOBUVARDAGE

Une concentration de 50 μ g de protéines des lysats fut mélangée avec du SB (sample buffer) 5x puis chauffée 5 minutes à 95°C. Les protéines solubilisées sont ensuite chargées et séparées par un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide (sodium dodecyl sulphate) contenant 10% d'acrylamide. Par la suite, elles ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham Life Science) et hybridées avec l'anticorps monoclonal 12CA5 de souris. L'anticorps est dilué 1 :10 000 et l'hybridation se fait à température ambiante durant une heure. Par la suite, la membrane a été réhybridée une heure de plus avec l'anticorps dirigé contre les IgG de souris couplés à la peroxydase de raifort (GMP-HRP). Les protéines ont été finalement visualisées à l'aide de la chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

2.8 LES ESSAIS PROTÉINE-KINASE

L'activité enzymatique des isoformes de MEK a été déterminée en mesurant leur habileté à augmenter l'activité kinase envers MBP de ERK 1 recombinant in vitro. Les lysats de cellules ont été préparés tel que décrit (53) et 250 μ g de protéines de ces lysats ont été incubés pendant 4 heures à 4°C avec 5 μ l d'antisérum 12CA5 préabsorbé sur des billes de protéine A-Sépharose. Les complexes immuns ont été lavés 3 fois avec du tampon de lyse et une fois avec un tampon kinase (20 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7,4). Ils ont été ensuite resuspendus dans le même tampon kinase auquel nous avons ajouté 50 μ M ATP, 5 μ ci [³²P] ATP et 300 μ g de ERK1 recombinant. Suite à une incubation de 30 minutes à 30°C, le MBP bovin (0.25 mg/ml) a été ajouté et l'incubation s'est poursuivie pendant 10 minutes additionnelles. La réaction a été arrêtée avec l'ajout du tampon 2X Laemmli's sample buffer. Les échantillons ont été analysés par une électrophorèse gel-SDS 12% acrylamide. Les bandes MBP ont été excisées du gel puis elles ont été comptées dans un compteur à liquide scintillant.

2.9 IMMUNOPRÉCIPITATION ET MARQUAGE ^{32}P IN VIVO

Les cellules 293 transfectées et cultivées dans des pétris de 10 cm ont été privées de sérum pendant 30 minutes. Par la suite, elles ont été marquées métaboliquement durant 5 heures à 37°C avec 0.5 mCi/ml [^{32}P] – acide phosphorique dans un milieu MEM Hepes tamponné dépourvu de phosphate et de bicarbonate. Les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon PBS puis les lysats ont été préparés tel que décrit (54). Ces lysats ont subi une prédéplétion d'une heure avec 5mg de sérum de lapin NRS (normal rabbit serum) puis incubés 4 heures à 4°C avec 20 ml de 12CA5 préabsorbés sur des billes de protéines A-Sépharose. Les complexes immuns ont ensuite été lavés 3 fois avec du tampon de lyse. Les complexes de protéines ont été élués à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon Laemmli sample buffer puis analysés par une électrophorèse gel SDS-polyacrylamide 10 % acrylamide. Les protéines ont été finalement transférées sur une membrane polyvinylidène-difluorure (PVDF) (Millipore, Bedford, MA) dans 25 mM Tris, 192 mM glycine et 20% de méthanol pour être visualisées par phosphorimager.

2.10 ANALYSE DES PHOSPHOAMINOACIDES

Les bandes marquées correspondante à MEK1 ont été excisées de la membrane PVDF et soumises à une hydrolyse acide partielle dans 5,7 M HCl pour une heure à 110°C. Les phosphoaminoacides résultants ont été résolus avec des standards non marqués par une électrophorèse sur couche mince à une dimension en utilisant un tampon optimal à pH 2.5 (77). Les standards ont été visualisés par coloration à la ninhydrine et les phosphoaminoacides ont été visualisés par l'analyse au phosphorimager.

3. RÉSULTATS

3.1 ALIGNEMENT DES SÉQUENCES DE MEK1 ET CHOIX DE SES MUTANTS

La mutagénèse dirigée nous a permis d'influencer le degré d'activité de MEK1 et MEK2 en remplaçant soigneusement certains acides aminés dont des sérines, des thréonines et une lysine par un acide aspartique ou un acide glutamique. Le remplacement par une alanine a pour effet d'abolir le rôle joué par l'acide aminé remplacé en empêchant la phosphorylation sur ce site. Le remplacement par un acide aspartique ou glutamique a pour effet de mimer la phosphorylation en augmentant la charge négative à cette position (7, 24, 74, 78, 137, 189).

Les nombreuses mutations faites sur ces deux protéines ont été sélectionnées à partir d'informations connues au sujet de résidus critiques et de régions régulatrices importantes déterminées chez d'autres protéines kinases, en particulier chez celles appartenant à la cascade MAPK^{ERK} (figure 2).

Puisque la phosphorylation régulatrice des MEKs se fait sur deux sérines, en position 218 et 222 (5, 23, 38, 57, 87, 113, 144, 181), nous avons décidé de muter ces deux sérines soit en deux acides aspartiques (DD) ou en deux acides glutamiques (EE), de façon à mimer la charge négative apportée par la phosphorylation (7, 24, 74, 78, 137, 189). Par conséquent, nous obtenons une forme d'enzyme constitutivement active (7, 74, 78, 137, 163). Ces deux même résidus ont été de plus mutés en deux alanines (AA) de façon à bloquer l'activation. Dû à la proximité d'un autre résidu sérine en position 212, nous avons décidé de muter celui-ci en alanine (S212A) et en acide aspartique (S212D) afin de mesurer son implication possible dans la régulation des MEKs. De cette même façon, nous avons réalisé des triples mutations soit en changeant les trois sérines par trois alanines (AAA) ou par trois acides aspartiques (DDD). Nous ajoutons à ceci les triples mutations ADD et AEE où la sérine 212 a été substituée par une alanine et où les sérines 218 et 222 ont été mutées en deux aspartates ou deux glutamates (figures 3 et 4).

MKK1	211	GWK-YANLKDRIETLGILGEGAGGSSVSKCKLNGSKIFALKVINTLNTDPEYQKQIFREL
MKK2	204	AWR-FGHLKDEITTEGILGEGAGGSSVAKCRLKNGKKVFALKTINTMNTDSEYQKQIFREL
BYR1	56	AWI-SDLONSSLEVVRHLGEGNGGAVSLVKHR--NIFMARKTVYVGS-DSKLQKQILREL
STE7	181	SNG-NYIQLODLVQLGKIGAGNSGTVVKALHVPDSKIVAKKTIPTVEQNNSTIINQLVREL
WIS1	310	GSS-FRINMSEIIKLEELGKGNYGVVYKALHQP TGVTMALKEIRLSLEEATF-NQIIMEL
PBS2	351	SSS--RITLDELEFLDELGHGNYGNVSKVLHKPTNVMATKEVRLELDEAKF-RQILMEL
MEK1	57	KQKVGELKDDDFEKISELGAGNGGVVFKVSHKPSGLVMARKLIHLET-KPAIRNQIIREL
		I II III
MKK1	270	QFNRSFQS-EYIVRYYGMFDTDE-NSSIIYIAMEYMGGRSLDAIYKNLLE-----RG
MKK2	263	QFNKSFKS-DYIVQYYGMFTDEQ-SSSIYIAMEYMGGSLEATYKNLK-----RG
BYR1	112	GVLHHCRS-PYIVGFYGFYQYK---NNISLCMEYDCCGSLDAI-----LR-----
STE7	240	SIVKRVKPHENIITFYGAYNQHINNEIIILMEYSDCGSLDKILSVYKRFVQRGTVSSKK
WIS1	368	DILHKAVS-PYIVDFYGAFF---VEGSVFCMEYMDAGSMDKLYAG-----GIK-
PBS2	408	EVLHKCNS-PYIVDFYGAFF---IEGAVYMCMEYMDGGS�DKIYDE-----SSEI
MEK1	116	QVLHECNS-PYIVGFYGFYSD---GEISICMEHMDGGSLDQV---LK-----KA
		IV V
MKK1	319	GRISEKVLGKIAEAVLRGLSYLHEK-KVIHRDIKPNILLNEN-GQVKLCDFGVSGEAVN
MKK2	312	GRISERVIGKIAESVLRGLSYLHER-KVIHRDIKPNILLNEK-GEIKLACDFGVSGEAVN
BYR1	155	GP I P L D I L G K I I N S M V K G L I Y L Y N V L H I I H R D L K P S N V V V N S R - G E I X L C D F G V S G E L V N
STE7	300	TWFNELTISKIAYGVINGLDHLYRQYKIIHRDIKPSNVLINSK-GQIKLACDFGVSKLIN
WIS1	413	---DEGVLARTAYAVVQGLKTLKEEHNI IHRDVKPTNVLVNSN-GQVKLCDFGVSGNLVA
PBS2	454	GGIDEPQLAFTANAVIHGLKELKEQHNI IHRDVKPTNII LCSANQGTVKLACDFGVSGNLVA
MEK1	159	GRIPQILGKVSIAVIKGLTYLREKHKIMHROVKPSNII VNSR-GEIKLACDFGVSGQLID
		VI VII
MKK1	377	SLATFTTGT SFYMAPERIQG-----Q--PYSVTSDVWSLGLTILEVANGKFP CSSEKMAA
MKK2	370	SLAMTFTGT SFYMAPERIQG-----Q--PYSVTCDVWSLGLTILEVAGGRFPFESDKITO
BYR1	214	SVACTFVGTSTYMSPERIRG-----G--KYTVKSDIWSLGISIIELATQELPWS----FS
STE7	359	SIADTFVGTSTYMSPERIQG-----N--VYSIKGDVWSLGLMIIELVTGEFFLG----GH
WIS1	469	SISKTNIGCQSYMAPERIRVGGPTNGVLTYYTVQADVWSLGLTILEMAGAYPYP----P-
PBS2	514	SLAKTNIGCQSYMAPERIKSLNPDRA--TYTVQSDIWSLGLSILEMAGRYYPYP----P-
MEK1	218	SMANSFVGTRSYMSPERLOG-----T--HYSVQSDIWSMGLSLVEMAVGRYPTP----PP
		VIII IX
MKK1	430	NIA-----PFELLMWILFTTPELKDEPE
MKK2	423	NVA-----PIELLTMLTFFSPOLKDEPE
BYR1	263	NID-----DSIGILDLLHCIVQZEPPLRP
STE7	408	NDT-----PDGILDLLQRIVNEPSPRLP
WIS1	524	-ES-----YTSIFAQLSAICDGDPPSLP
PBS2	567	-ET-----YDNIFSQLSAIVDGPPLRP
MEK1	267	DAKELELLFGCHVEGDAAETPPRPRTPGRPLSSYGMDSRPPMAIFELLDYIVNEPFPKLP
		X
MKK1	453	SNIIWSPSFKSFIDYCLKKDSRERPSPRQMINHPWIKGQ--MKKQVNM.../508
MKK2	446	LDISWSKTFRSFIDYCLKKDARERPSPRQMLKHPWIVGQ--MKKKVNM.../506
BYR1	287	SS--FPEDLRLFVDACLHKDPTLRASPOQLCAMFYFOQA--LMINVDL.../340
STE7	431	KDRIYSKEMTDFVNRCCIKNERERSSIHLLHHDLMKYVSPSKD-DK.../515
WIS1	546	-DS-FSPEARDFVNKCLNKNPSLRPDYHELANHPWLLKY--QNADVDM.../604
PBS2	569	SDK-FSSDAQDFVSLCLQKIPERRPTYAALTEHPWLVKY--RNQOVHM.../704
MEK1	327	SG-VFSLEFQDFVNKCLIKNPAERADLQMLVHAFIKRS--DAEEVDF.../393
		XI

Figure 2 : Comparaison des séquences de MEK1 avec MKK1, MKK2, STE7, Byr1, PBS2 et Wis1.

Les acides aminés identiques, dont la sérine 212, sont encadrés dans des boîtes ombrées. Les numéros romains sous les séquences réfèrent aux sous-domaines conservés chez toutes les protéines kinases.

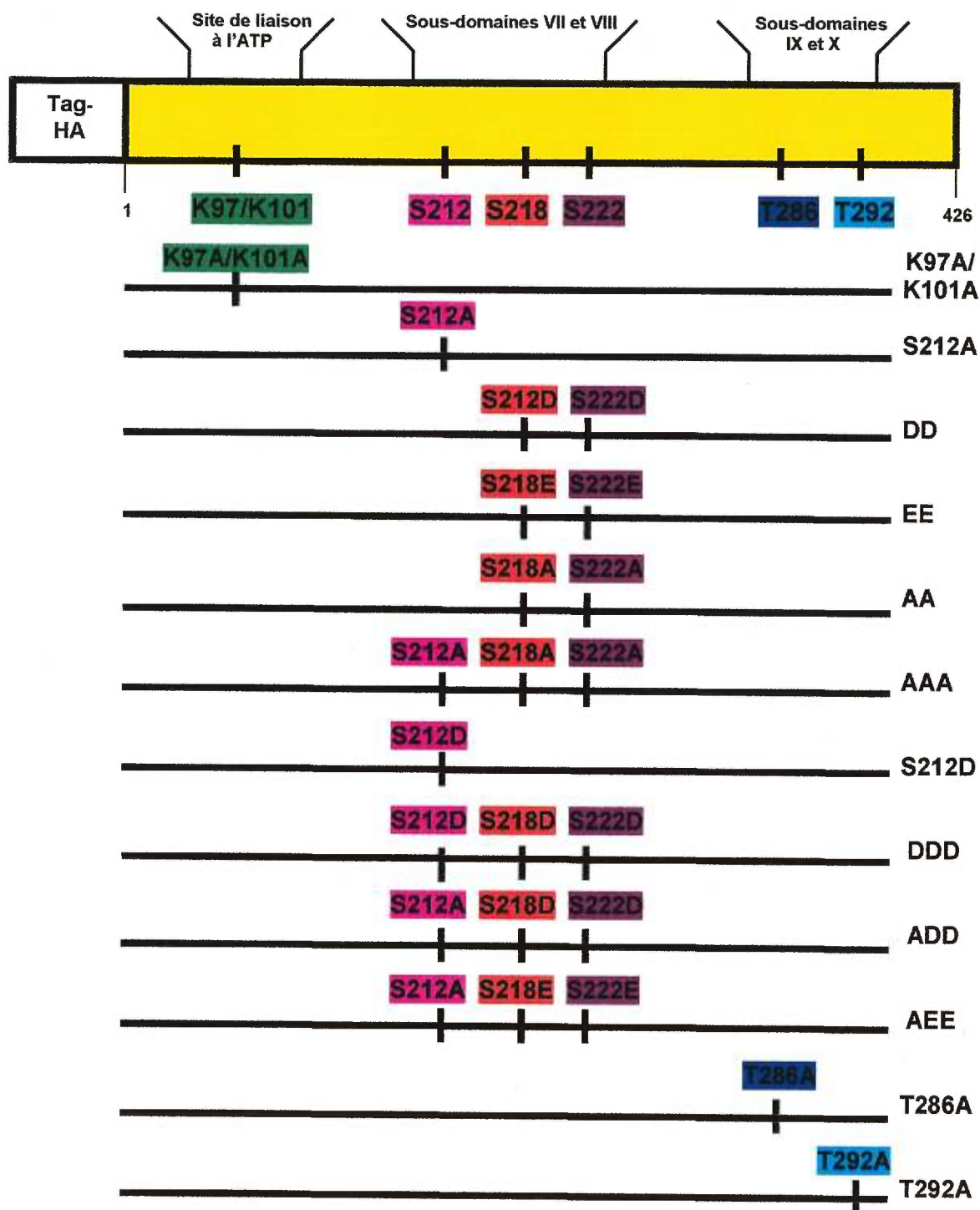


Figure 3 : Représentation schématique des mutants de MEK1 et MEK2 humains.

Le mutant K97A est un mutant de MEK1 alors que le mutant K101A est pour MEK2.

Les numéros correspondent à la position des acides aminés de MEK1 et MEK2.

La lysine en position 97 de MEK1 et celle en position 101 de MEK2 correspondent à la sérine critique trouvée dans le site de liaison à l'ATP d'autres protéines kinases (122). Celles-ci ont été mutées chacune en alanine (K97A, K101A) de façon à rendre ces mutants constitutivement inactifs (143, 199).

Les thréonines 286 et 292 de MEK1 font partie d'une région riche en prolines située dans le domaine C-terminal de MEK1. Cette région est reconnue comme étant essentielle à l'association de MEK1 à Raf (11, 23, 33, 41, 49, 53, 70, 77, 108, 134, 140, 159, 168). Ces thréonines, à l'intérieur de la région riche en prolines, sont comprises dans un site consensus de phosphorylation pour p34^{cdc2} qui règle la division cellulaire (11, 134). Chacune d'elle a été mutée séparément en alanine (T286A, T292A) afin de mesurer leur degré d'implication dans la régulation de MEK1 (figures 3). Ces deux thréonines sont absentes chez MEK2. Cela explique pourquoi nous ne pouvions pas réaliser les mutants MEK2 T286A et T292A.

3.2 EXPRESSION DE MEK1, MEK2 ET DE LEURS MUTANTS DANS LES CELLULES 293

La manipulation des niveaux d'expression tant d'une enzyme sauvage que de ses mutants dont l'activité biologique a été augmentée ou diminuée est devenu un outil puissant dans l'élucidation des mécanismes de signalisation (79). Par conséquent, nous avons surexprimé les enzymes MEK1 et MEK2 sauvages ainsi que leurs mutants dans les cellules 293.

À chacune de ces constructions (figures 3), nous avons juxtaposé en 5' du gène muté, l'épitope HA. Les constructions ont été exprimées dans les cellules 293, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Tel que montré aux figures 4, 5, 6 et 7, les constructions de MEK1 et de MEK2 contenant l'épitope HA ont été exprimées de façon similaire à l'exception du contrôle négatif (vecteur seul sans épitope HA) et des mutants AA et AAA de MEK1. Puisque les niveaux d'expression des protéines mutantes se ressemblent, nous avons pu comparer directement l'activité enzymatique des mutants avec les formes sauvages de MEK1 et MEK2.

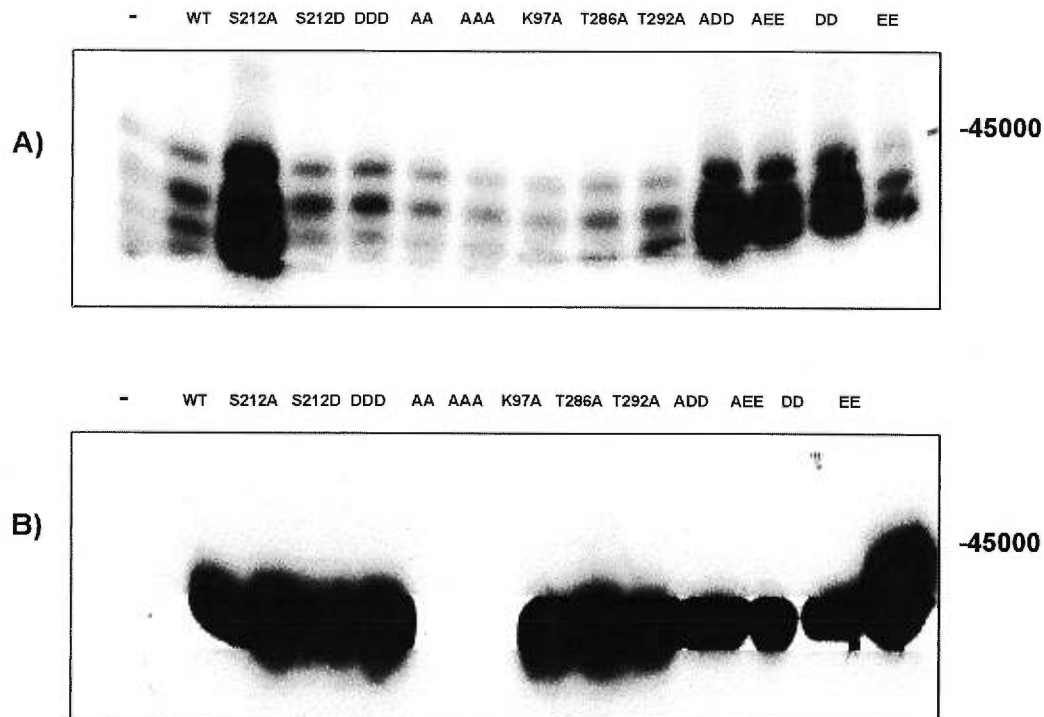


Figure 4: Activité enzymatique et expression de MEK1 sauvage et de ses mutants dans les 293 en phase exponentielle.

Des cellules 293 exprimant la forme sauvage de MEK1 ou de ses mutants ont été cultivées en phase exponentielle tel que décrit dans la section matériel et méthode. Les extraits ont été préparés tel que décrit dans la section matériel et méthode.

A) HA-MEK1 sauvage, ses mutants et le vecteur pRC-CMV (-) ont été immunoprécipités avec l'anticorps dirigé contre l'épitope hémagglutinine (HA). Leur activité a été déterminée à partir de la mesure de leur habileté à augmenter l'activité kinase MBP de ERK1 recombinant in vitro.

B) Une fraction de ces extraits (50 μ g de protéines) a été soumise à un test d'immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA afin d'évaluer le niveau d'expression des protéines.

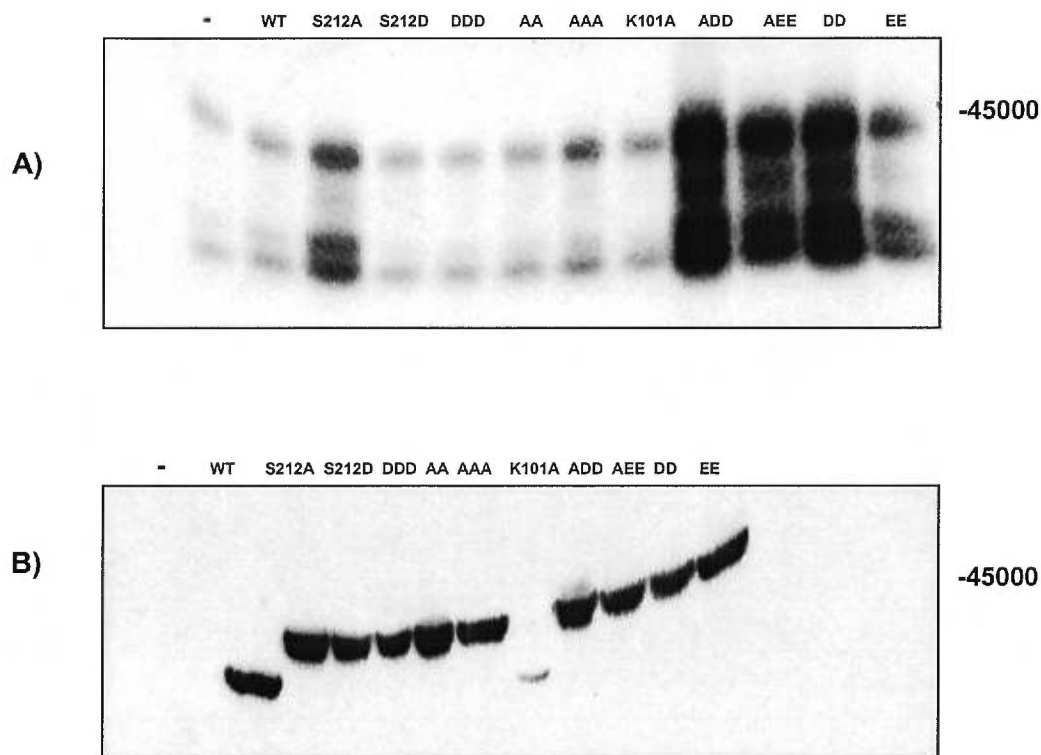


Figure 5: Activité enzymatique et expression de MEK2 sauvage et de ses mutants dans les 293 en phase exponentielle.

Des cellules 293 exprimant MEK2 sauvage, ses mutants ou le vecteur pRC-CMV ont été cultivées en phase exponentielle tel que décrit dans la section matériel et méthode. Les extraits ont été préparés tel que décrit dans la section matériel et méthode.

A) HA-MEK2 sauvage et ses mutants ont été immunoprécipités avec l'anticorps dirigé contre l'épitope hémagglutinine (HA). Leur activité a été déterminée en mesurant leur habileté à augmenter l'activité kinase MBP de ERK1 recombinant in vitro.

B) Une fraction de ces extraits (50 μ g de protéines) a été soumise à un test d'immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA afin d'évaluer le niveau d'expression des protéines.

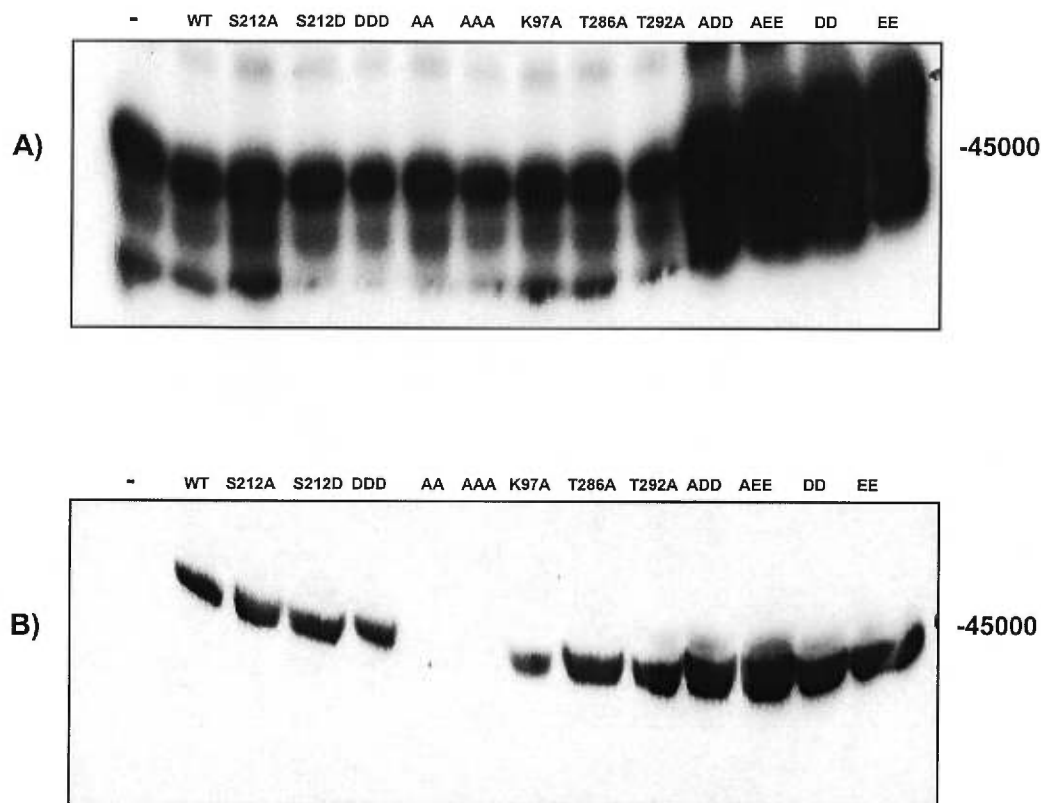


Figure 6: Activité enzymatique et expression de MEK1 sauvage et de ses mutants dans les 293 quiescentes.

Des cellules 293 exprimant MEK1 sauvage, ses mutants ou le vecteur pRC-CMV (-) ont été arrêtées en G_0 tel que décrit dans la section matériel et méthode. Les extraits ont été préparés tel que décrit dans la section matériel et méthode.

A) HA-MEK1 sauvage et ses mutants ont été immunoprecipités avec l'anticorps dirigé contre l'épitope hémagglutinine (HA). Leur activité a été déterminée en mesurant leur habileté à augmenter l'activité kinase MBP de ERK1 recombinant in vitro.

B) Une fraction de ces extraits (50µg de protéines) a été soumise à un test d'immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA afin d'évaluer le niveau d'expression des protéine.

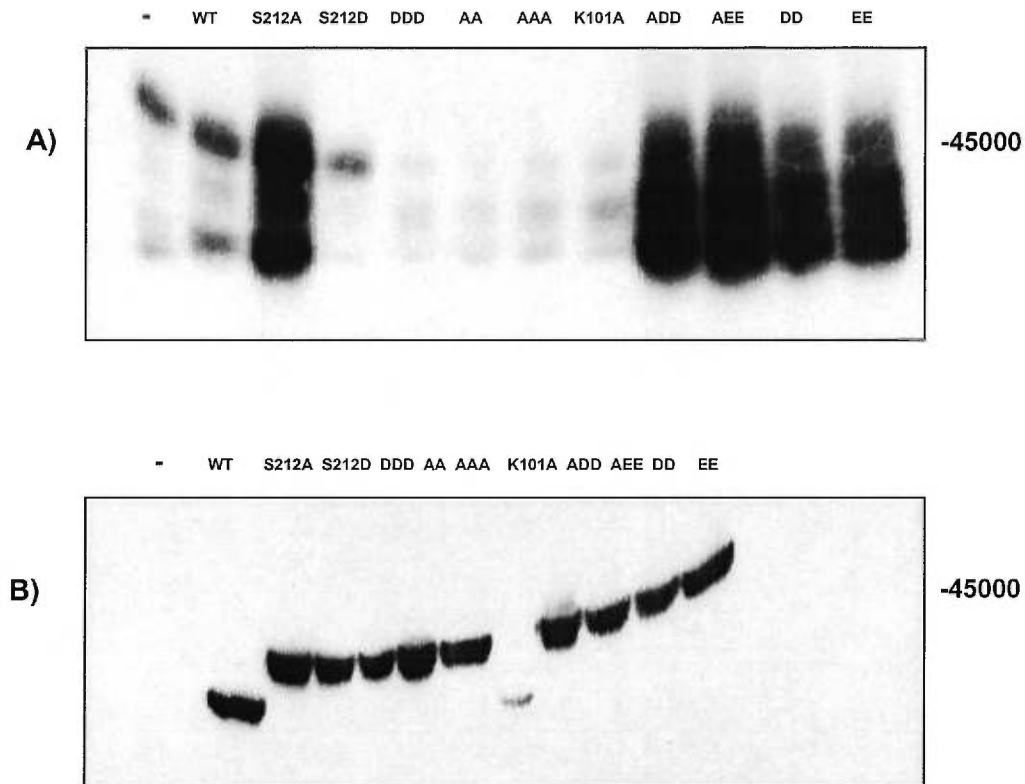


Figure 7: Activité enzymatique et expression de MEK2 sauvage et de ses mutants dans les 293 quiescentes.

Des cellules 293 exprimant MEK2 sauvage, ses mutants ou le vecteur pRC-CMV ont été arrêtée en G_0 tel que décrit dans la section matériel et méthode. Les extraits ont été préparés tel que décrit dans la section matériel et méthode.

A) HA-MEK2 sauvage et ses mutants ont été immunoprécipités avec l'anticorps dirigé contre l'épitope hémagglutinine (HA). Leur activité a été déterminée en mesurant leur habileté à augmenter l'activité kinase MBP de ERK1 recombinant in vitro.

B) Une fraction de ces extraits (50 μ g de protéines) a été soumise à un test d'immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA afin d'évaluer le niveau d'expression des protéines.

3.3 ACTIVITÉ DES MEKS ET DE LEURS MUTANTS DANS LES CELLULES 293

Bien que les mutants des MEKs peuvent être activés de façon transitoire suite à une stimulation par du sérum, il ne demeure pas moins que l'on puisse détecter une activité enzymatique dans des cellules non stimulées et dans des cellules quiescentes. Les mutations T286A et T292A de MEK1 ne semblent pas influencer beaucoup l'activité enzymatique puisque celle-ci est, elle aussi, comparable à celle de l'enzyme sauvage soit 0,09 fois à 2 fois inférieures à MEK1 dans les cellules exponentielles. Dans les 293 quiescentes, l'activité enzymatique est 1 à 2 fois supérieure à MEK1 (figures 4,6). Les thréonines 286 et 292, lorsque phosphorylées, n'interfèrent pas avec la catalyse *in vitro*. Ceci est corroboré par le groupe Mansour et al. (97). Cependant, la hausse de leur activité enzymatique dans les cellules 293 quiescentes comparativement aux 293 en phase exponentielle s'explique par le fait que MEK et ERK sont activés de façon répétée durant la phase G1.

Le rôle de la thréonine en position 292 n'a pas encore été précisé. La thréonine 292 est phosphorylée par ERK puisqu'elle se trouve dans une séquence consensus ProX (Ser/thr)Pro reconnue par ERK. Elle peut être aussi phosphorylée par PAK1 qui permet à MEK1 de s'associer à Raf-1. Ainsi MEK1 demeure active plus longtemps (49). Jelinek et al. (77) soutiennent que le mutant MEK1 T292A inhibe l'association de MEK1 avec le complexe Ras-Raf. Catling et al. (24) en arrivent à la même conclusion. Cependant, lorsque les thréonines 286 et 292 sont phosphorylées par p34^{cdc2}, MEK1 devient inactive (134). Le groupe de Dang et al. affirme que la délétion de l'insert riche en prolines dans le domaine C-terminal de MEK, qui contient la thréonine 292, n'affecte pas la liaison entre MEK1 et Raf-1 (41). De plus, selon eux, la délétion de ce même insert ne réduit pas l'activation de MEK par le EGF ou par Raf activé ce qui est contraire à ce que Catling et al. (24) affirment.

Il est intéressant de noter que la séquence ProProArg-Pro₂₉₀ se trouve à proximité de la thréonine 292. Cette séquence permet la liaison à des protéines ayant des domaines SH3. Ces domaines sont reconnus pour diriger des protéines vers le bon compartiment cellulaire. Puisque la thréonine 292 est à côté de cette séquence, nous pouvons spéculer que sa phosphorylation par ERK empêcherait

MEK de former des complexes avec d'autres protéines une fois que la cascade MAPK^{ERK} est activée. Ainsi, MEK et ERK peuvent se réassocier dans le cytoplasme en attente d'une nouvelle stimulation (74, 133). Cependant, lorsque la thréonine 292 est phosphorylée par PAK1, MEK1 peut s'associer à Raf-1 ce qui augmente l'activité de MEK1 (49).

Les résultats obtenus avec les mutants K97A de MEK1 et K101A de MEK2, considérés comme étant constitutivement inactifs (73, 143, 163, 199), démontrent que ces formes sont également moins actives que les enzymes sauvages, soit 0,6 à 2 fois inférieures à MEK1 et MEK2 sauvages tant dans les 293 exponentielles que dans les 293 quiescentes. La faible quantité de MBP phosphorylé lors des essais kinases serait attribuée à l'autophosphorylation de ERK1 sauvage recombinant (figures 4,5,6,7). Ces résultats confirment, comme l'ont démontré d'autres groupes (143, 199) que les lysines 97 et 101 sont bien le site de liaison à l'ATP.

Les mutations AA et AAA de MEK2 montrent, elles aussi, une diminution de l'activité enzymatique par rapport aux MEKs sauvages (figures 4,5,6,7). Il faut mentionner cependant que nous sommes incapables de voir l'expression de MEK1 AA et MEK1 AAA transfectés dans les 293 en condition transitoire (figures 4,6). Quant à leur expression en condition stable, elle provoque la mort cellulaire (résultats non montrés). L'activité enzymatique calculée viendrait donc de MEK1 endogène. Cette activité enzymatique pour les mutants AA et AAA de MEK2 est 0,2 à 2 fois inférieures à MEK2 sauvage dans les 293 exponentielles et les 293 quiescentes (figures 5,7).

Les résultats aux figures 4,5,6 et 7 démontrent que les mutants DD, EE, ADD et AEE de MEK1 et MEK2 ont une activité enzymatique qui est 2 à 9 fois plus grande que la forme sauvage des MEKs tant dans les cellules en phase exponentielles que dans les cellules quiescentes. D'ailleurs, les mutants ADD et AEE possèdent une activité enzymatique qui est 2 fois supérieure à celle du mutant EE. Catling et al. (24) ont démontré que le mutant DD de MEK1 ainsi qu'un mutant DD ayant subi une délétion des acides aminés 270 à 307 dans la région riche en prolines deviennent constitutivement actifs. Ces résultats suggèrent que la délétion de la séquence riche en prolines n'inactive pas la fonction catalytique de MEK1.

Le mutant S212A de MEK1 et de MEK2 montre une augmentation de l'activité enzymatique de 2 à 5 fois plus grande que les enzymes sauvages tant dans les 293 exponentielles que dans les 293 quiescentes (figures 4,5,6,7). Cette augmentation n'est peut-être pas aussi marquée que celle des mutants DD, EE, ADD et AEE mais suggère que la sérine 212 pourrait influencer de façon négative l'activité des MEKs. Ce rôle pour la sérine 212 est de plus confirmé par les mutants S212D et DDD. Les résultats démontrent une activité enzymatique presque comparable à celle des cellules qui ne contiennent que du vecteur seul. Soit 1 à 2 fois inférieures à MEK1 et MEK2 sauvages dans les 293 exponentielles et les 293 quiescentes (figures 4,5,6,7) (Tableaux I, II, III, IV).

Puisque les sérines 218 et 222 des MEKs sont reconnues jusqu'à maintenant comme étant les deux seules sérines importantes dans la régulation de l'activité et que nous ayons obtenu des résultats montrant qu'une troisième sérine, celle en position 212, puisse également être impliquée dans la régulation de l'activité, nous avons décidé d'avancer les recherches au-delà des études in vitro.

3.4 PHOSPHORYLATION IN VIVO DE MEK1

Afin de démontrer la phosphorylation in vivo de la sérine 212 de MEK1, nous avons analysé les sites de phosphorylation de MEK1 sauvage, des mutants MEK1 S212A, MEK1 DD, MEK1 ADD, MEK2 AA et MEK2 AAA.

3.4.1 ANALYSE DES PHOSPHOAMINOACIDES TOTAUX DE MEK1

MEK1 sauvage et MEK1 S212A ne seraient phosphorylées qu'en sérine et en thréonine mais pas en tyrosine tant dans les cellules 293 exponentielles que dans les cellules 293 quiescentes ou stimulées (figure 8). Malheureusement, le mutant MEK1 S212A en comparaison à MEK1 sauvage ne nous a pas permis de démontrer la phosphorylation de la sérine 212 in vivo puisque cette sérine se retrouve sur le même fragment que les sérines 218 et 222 (figure 9). Nous avons donc réalisé une nouvelle analyse des phosphoaminoacides de MEK grâce aux autres mutants de MEK1.

Série 1			Série 2		
Mutants de MEK1	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Mutants de MEK1	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
pRC-CMV	1940	0,1168	pRC-CMV	3898	0,2347
sauvage	5872	0,3536	sauvage	10 033	0,6042
S212A	76 184	4,5878	S212A	63 049	3,7969
S212D	3792	0,2284	S212D	7474	0,4500
DDD	3385	0,2038	DDD	7409	0,4462
AA	11 494	0,6922	AA	5126	0,3087
AAA	9873	0,5946	AAA	4721	0,2843
K97A	11 307	0,6809	K97A	3959	0,2384
T286A	10 626	0,6399	T286A	5070	0,3053
T292A	1951	0,1175	T292A	6875	0,4140
ADD	143 506	8,6420	ADD	23 544	1,4178
AEE	50 894	3,0649	AEE	18 680	1,1249
DD	160 538	9,6677	DD	21 187	1,2759
EE	13 118	0,7900	EE	7486	0,4508

Tableau I : Activité enzymatique des mutants MEK1 dans les cellules 293 en phase exponentielle

La série 1 et 2 correspondent à deux séries d'expériences.
Le calcul de l'activité spécifique se trouve à l'Annexe I.

Série 1			Série 2		
Mutants de MEK1	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Mutants de MEK1	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
pRC-CMV	12 571	0,5663	pRC-CMV	6572	0,2960
sauvage	10 546	0,4750	sauvage	8251	0,3717
S212A	17 582	0,7920	S212A	20927	0,9427
S212D	10 629	0,4788	S212D	9094	0,4096
DDD	6842	0,3082	DDD	6516	0,2935
AA	10 930	0,4923	AA	8862	0,3992
AAA	8645	0,3894	AAA	8426	0,3795
K97A	11 478	0,5170	K97A	7631	0,3437
T286A	12 831	0,5780	T286A	14896	0,6710
T292A	12 406	0,5588	T292A	11343	0,5109
ADD	113 973	5,1339	ADD	105536	4,7539
AEE	131 187	5,9093	AEE	40078	1,8053
DD	125 685	5,6615	DD	96575	4,3502
EE	54 083	2,4362	EE	63585	2,8642

Tableau II : Activité enzymatique des mutants MEK1 dans les cellules 293 quiescentes

La série 1 et 2 correspondent à deux séries d'expériences.
Le calcul de l'activité spécifique se trouve à l'Annexe I.

Série 1			Série 2		
Mutants de MEK2	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Mutants de MEK2	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
pRC-CMV	7746	0,4665	pRC-CMV	6863	0,4133
sauvage	21 012	1,2654	sauvage	9158	0,5515
S212A	17 935	1,0801	S212A	26 708	1,6084
S212D	40 466	2,4369	S212D	7400	0,4456
DDD	11 498	0,6924	DDD	7214	0,4344
AA	11 958	0,7201	AA	8970	0,5402
AAA	11 458	0,6900	AAA	13 002	0,7830
K101A	9787	0,5894	K101A	11 414	0,6874
ADD	161 197	9,7074	ADD	136 626	8,2277
AEE	104 834	6,3132	AEE	82 134	4,9462
DD	157 239	9,4690	DD	125 979	7,5865
EE	47 905	2,8849	EE	28 556	1,7197

Tableau III : Activité enzymatique des mutants MEK2 dans les cellules 293 en phase exponentielle

La série 1 et 2 correspondent à deux séries d'expériences.
Le calcul de l'activité spécifique se trouve à l'Annexe I.

Série 1			Série 2		
Mutants de MEK2	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Mutants de MEK2	Nombre de CPMA comptes par minutes	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
pRC-CMV	2176	1,2314	pRC-CMV	853	0,4827
sauvage	3126	1,7690	sauvage	1330	0,7526
S212A	13 770	7,7923	S212A	6246	3,5346
S212D	1549	0,8766	S212D	915	0,5178
DDD	1034	0,5851	DDD	702	0,3973
AA	894	0,5059	AA	789	0,4465
AAA	1200	0,6791	AAA	1149	0,6502
K101A	1580	0,8941	K101A	1111	0,6287
ADD	15 770	8,9241	ADD	17 812	10,0797
AEE	19 905	11,2641	AEE	13 814	7,8172
DD	10 791	6,1065	DD	10 039	5,6810
EE	10 661	6,0047	EE	8026	4,5419

Tableau IV : Activité enzymatique des mutants de MEK2 dans les cellules 293 quiescentes

La série 1 et 2 correspondent à deux séries d'expériences.
Le calcul de l'activité spécifique se trouve à l'Annexe I.

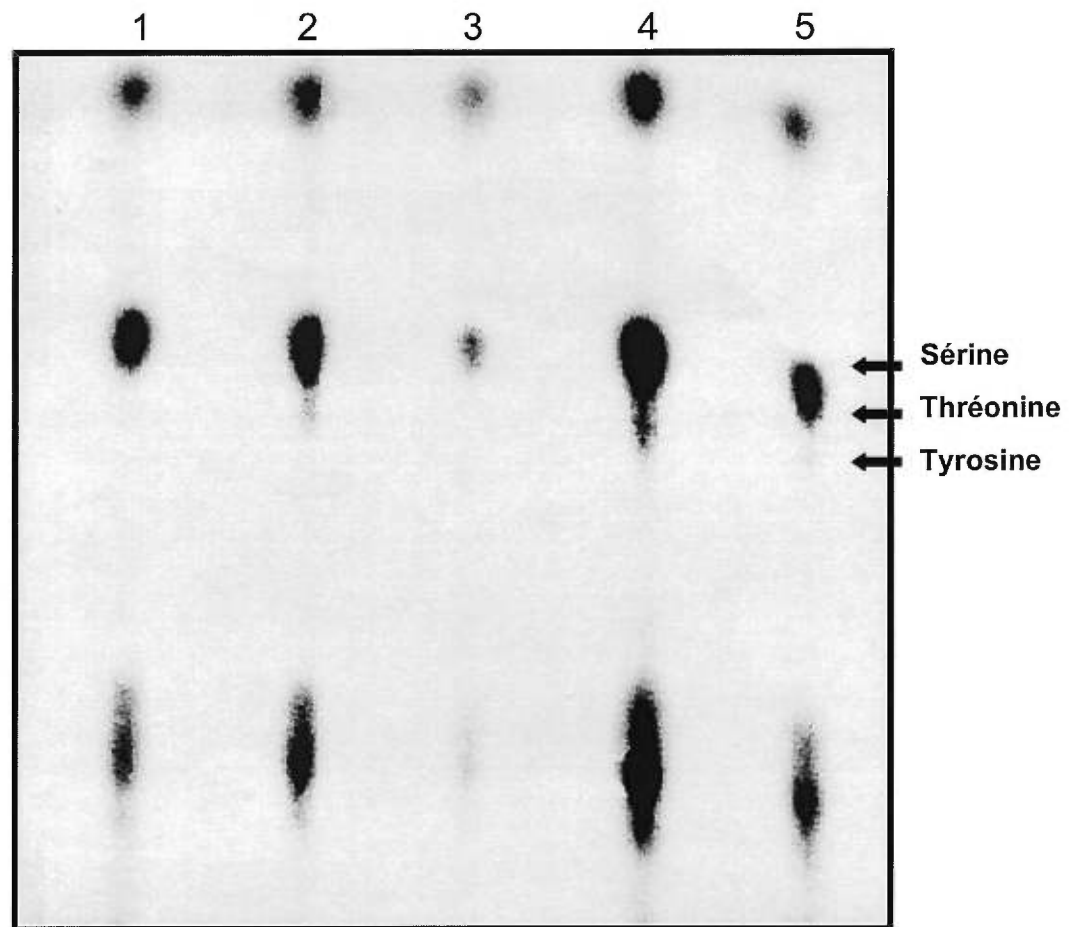


Figure 8: Analyse des phosphoaminoacides de MEK1.

1. MEK1 sauvage de cellules 293 en phase exponentielle
2. MEK1 sauvage de cellules 293 quiescentes
3. MEK1 S212A de cellules 293 en phase exponentielle
4. MEK1 sauvage de cellules 293 stimulées 5 minutes
5. MEK1 S212A de cellules 293 stimulées 5 minutes

HUMAN MEK-1 CT SEQUENCE

10 1234567890	20 1234567890	30 1234567890	40 1234567890	50 1234567890	
MPK K K PTPIQ	LNPAPDGSAV	NGTSSAETNL	EALQK K LEEL	ELDEQQR K R L	50
EAFLTQK QK V	GELK DDDFEK	ISELGAGNGG	VVFK VSHK PS	GLVMARK L IH	100
LEIK PAIR NQ	IIR ELQVLHE	CNSPYIVGFY	GAFYSDGEIS	ICMEHMDGGS	150
LDQVLK K AGR	IPEQILGK VS	IAVIK GLTYL	R EK HK IMHR D	VK PSNILVNS	200
R GEIK LCDFG	VSGQLIDSMA	NSFVGTR SYM	SPER LQGTHY	SVQSDIWSMG	250
LSLVEMAVGR	YPIPPDAK E	LELMFGCQVE	GDAAEPPR P	R TPGR PLSSY	300
GMSR PPMAI	FELLDYIVNE	PPPK LPSGVF	SLEFQDFVNK	CLIK NPAER A	350
DLK QLMVHAF	IK R SDAEEVD	FAGWLCSTIG	LNQPSTPTHA	AGV	393

LCDFGVSGQLIDSMANSFVGTR

Figure 9 : Sites de clivage de la trypsine sur l'enzyme MEK-1

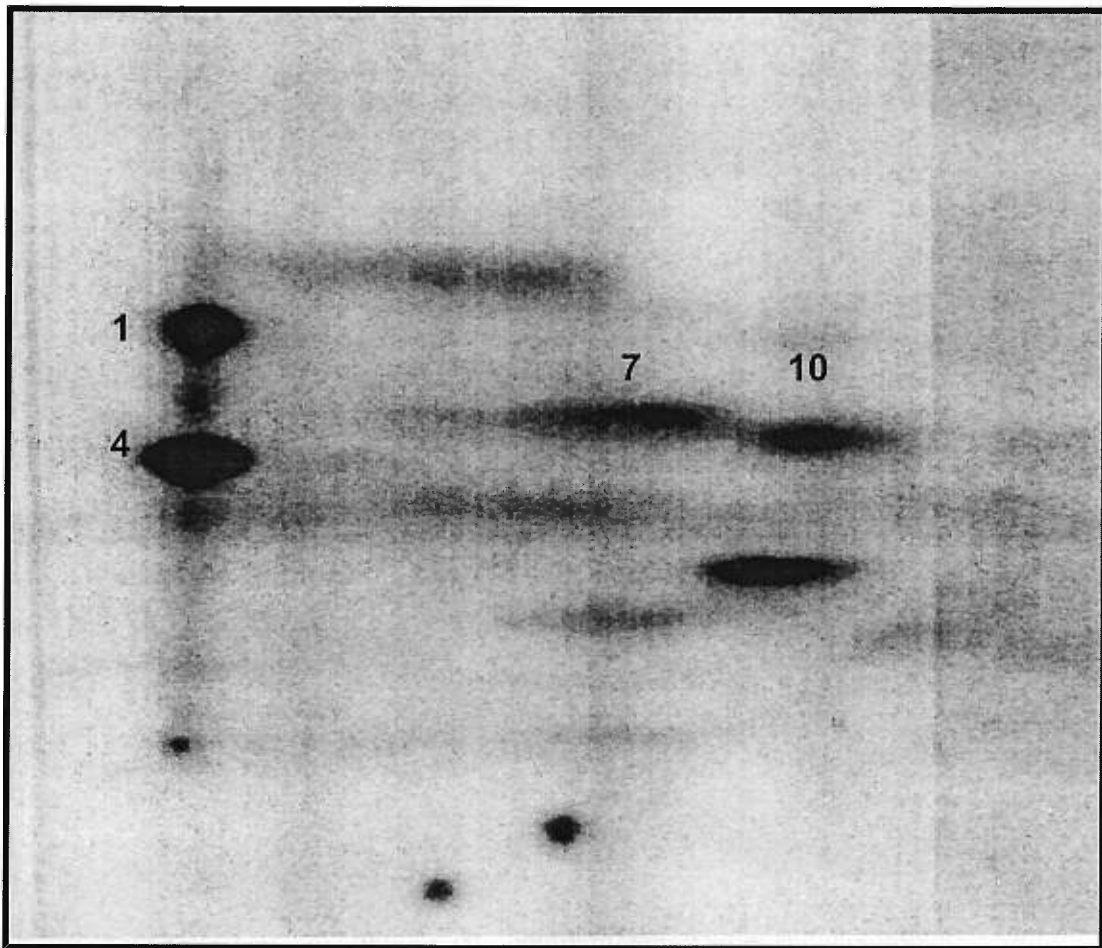


Figure 10: Analyse des phosphopeptides de MEK1 sauvage suite à une digestion par la trypsine. Autoradiogramme de la migration en deux dimensions des phosphopeptides de MEK1 sauvage.

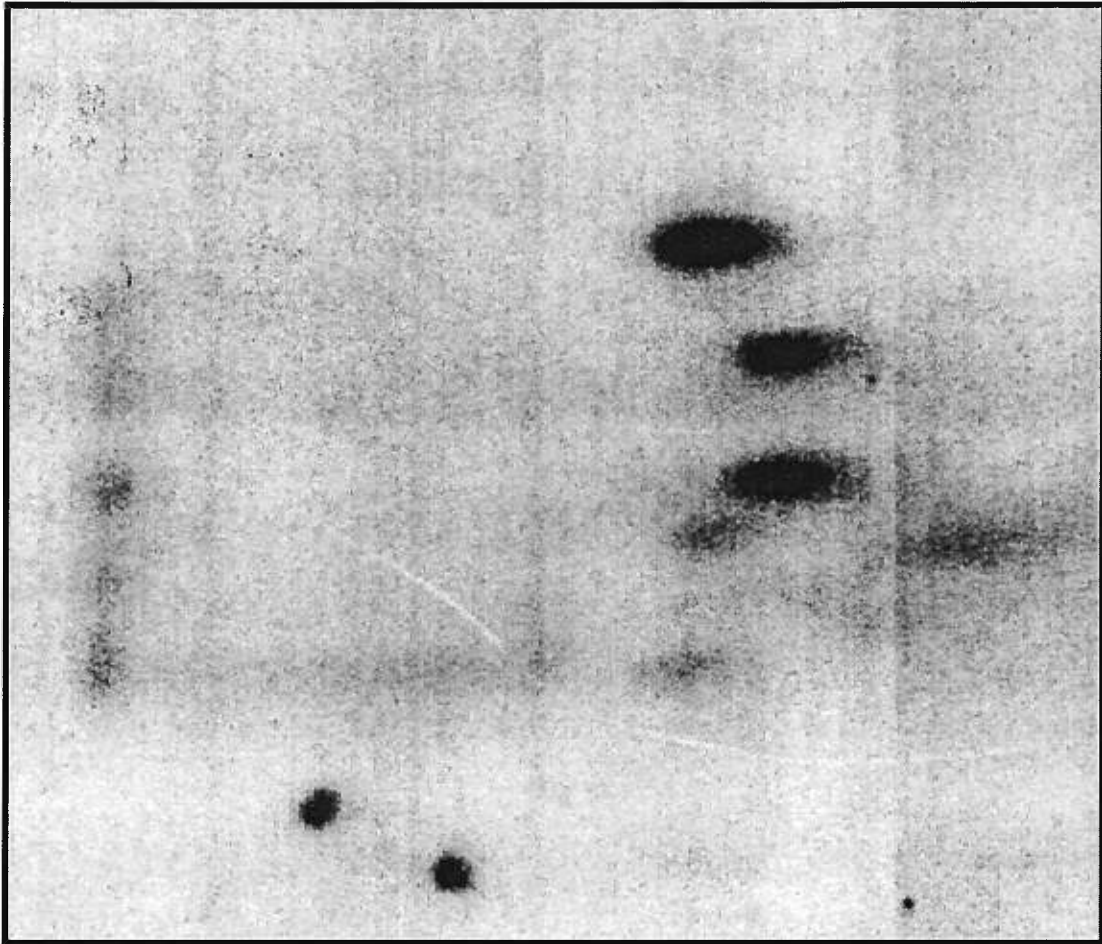


Figure 11: Analyse des phosphopeptides de MEK1 S212A suite à une digestion par la trypsine. Autoradiogramme de la migration en deux dimensions des phosphopeptides de MEK1 S212A.

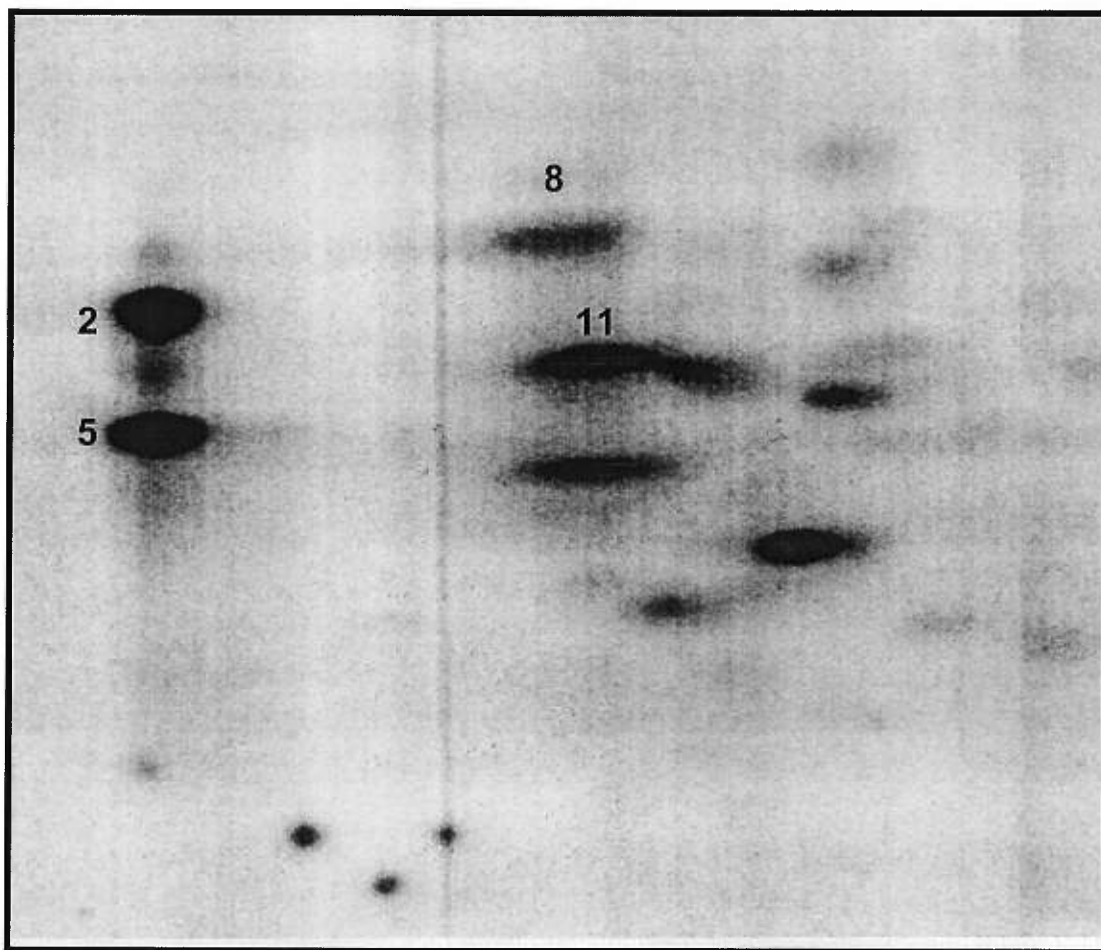


Figure 12: Analyse des phosphopeptides de MEK1 DD suite à une digestion par la trypsine. Autoradiogramme de la migration en deux dimensions des phosphopeptides de MEK1 DD.

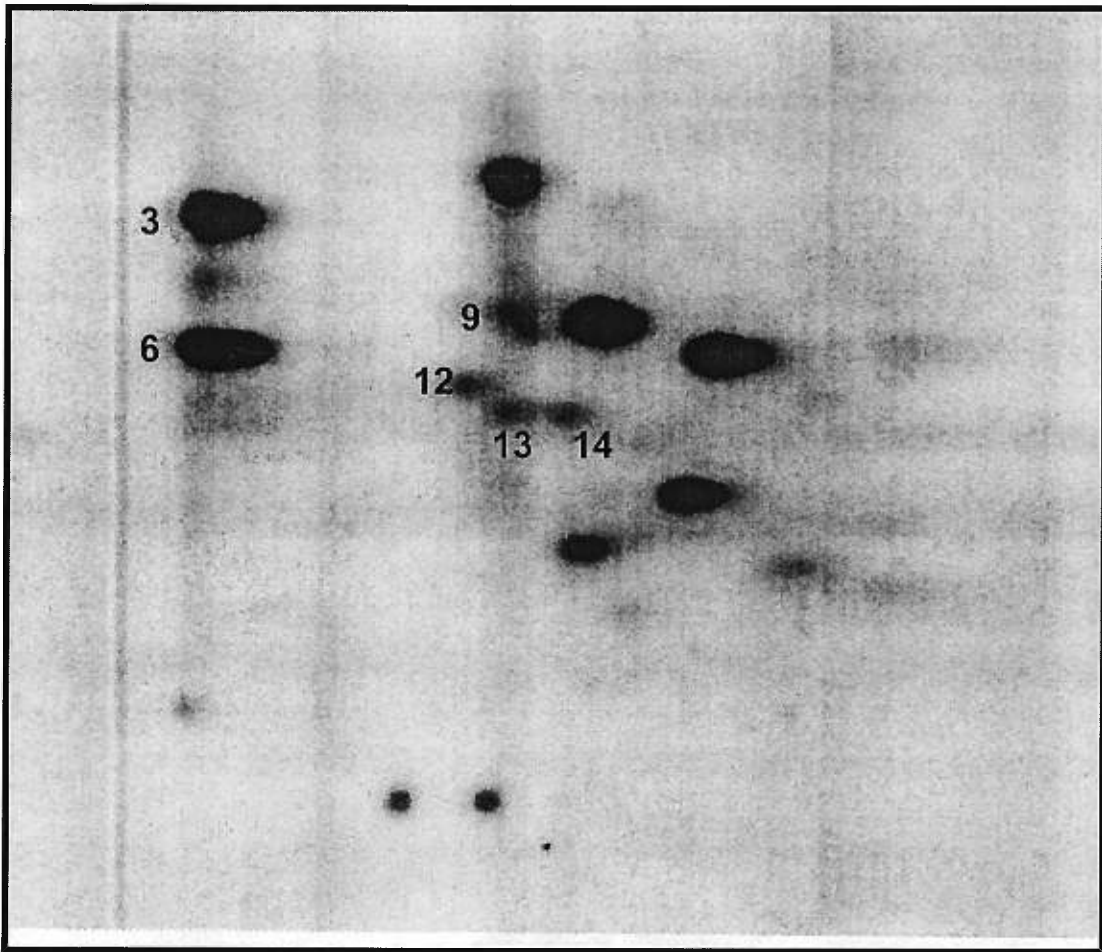


Figure 13: Analyse des phosphopeptides de MEK1 ADD suite à une digestion par la trypsine. Autoradiogramme de la migration en deux dimensions des phosphopeptides de MEK1 ADD.

La carte des phosphominoacides de chacun des mutants de MEK1 (S212A, DD, ADD) et MEK2 (AA et AAA) est présentée aux figures 10,11,12,13,14 et 15. Ces mutants présentent un patron de migration similaire à celui de MEK1 sauvage. Selon la carte théorique des mobilités prédites de MEK1 digérée à la trypsine (non montré), nous avons identifié les peptides 1 et 4 (MEK1 sauvage), 2 et 5 (MEK1 DD) ainsi que 3 et 6 (MEK1 ADD) comme étant ceux qui contiennent les sérines 212, 218 et 222. En théorie, nous aurions dû apercevoir qu'une seule tache, au lieu de deux, pour le peptide contenant les trois sérines. Ceci s'explique par le fait qu'il y a eu une digestion partielle avec la trypsine. Pour ce qui est des mutants AA et AAA, nous avons dû prendre ceux de MEK2 (figures 14, 15) puisque ces mutants chez MEK1 sont très difficilement exprimés (figures 4, 6). Les cartes de la seconde digestion avec l'endoprotéinase Glu-c (V8 protéase) des peptides tryptiques de chacun des mutants sont montrées à la figure 16. Malheureusement, le mutant MEK1 S212A n'a pas eu beaucoup d'expression. Nous n'avons donc pu soumettre ses phosphopeptides à une deuxième digestion avec l'endoprotéinase Glu-c.

En se référant à la figure 16, nous observons une perte de sites de phosphorylation, ainsi qu'un patron de migration différent entre les peptides 1 (MEK1 sauvage) et 2 (MEK1 DD). De même que pour les peptides 4 (MEK1 sauvage) et 5 (MEK1 DD). En ce qui a trait aux peptides 3 et 6 (MEK1 ADD), leur patron de migration est également différent des peptides 1 et 4 de MEK1 sauvage. Quant au peptide 15 (MEK2AA) et 16 (MEK2 AAA) nous ne voyons pratiquement pas de tache en comparaison à MEK1 sauvage. Les peptides 7 et 10 (MEK1 sauvage), 8 et 11 (MEK1 DD), 9,12,13 et 14 (MEK1 ADD) ne correspondent pas au peptide d'intérêt. La différence entre les patrons de migration et la perte des sites de phosphorylation ne nous permet pas d'affirmer mais suggère que la sérine 212 est phosphorylée *in vivo*.

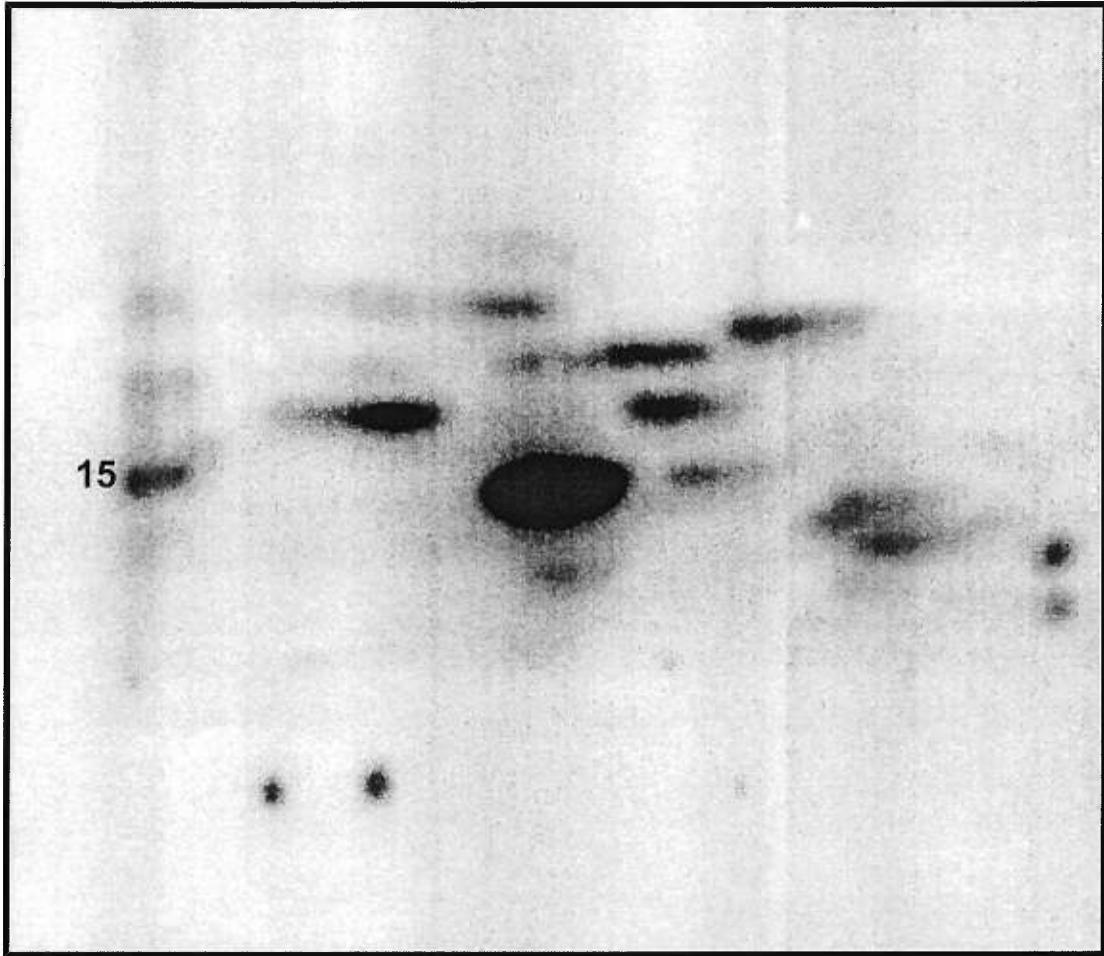


Figure 14: Analyse des phosphopeptides de MEK2 AA suite à une digestion par la trypsine. Autoradiogramme de la migration en deux dimensions des phosphopeptides de MEK2 AA.

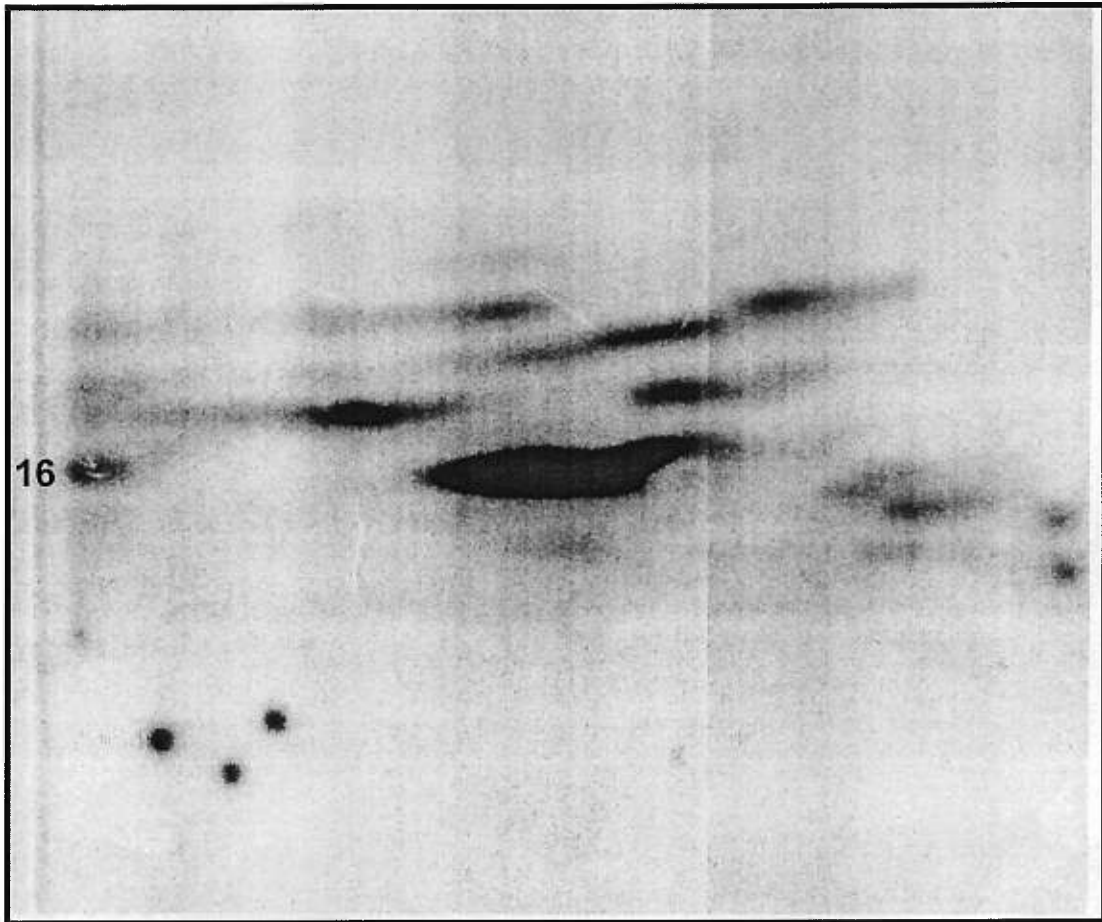


Figure 15: Analyse des phosphopeptides de MEK2 AAA suite à une digestion par la trypsine. Autoradiogramme de la migration en deux dimensions des phosphopeptides de MEK2 AAA.

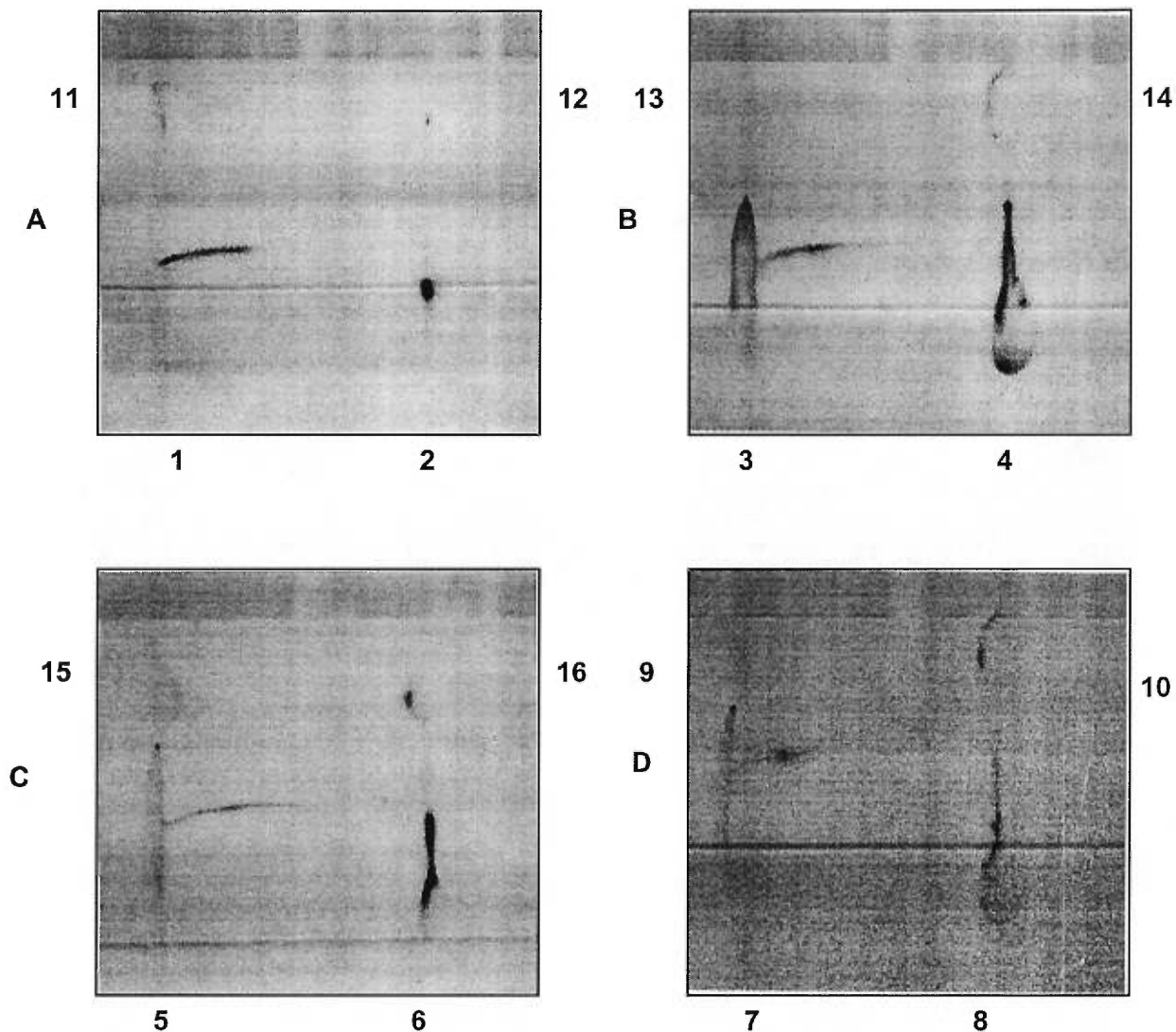


Figure 16: Analyse des phosphopeptides tryptiques de MEK1 clivés par l'endoprotéinase Glu-C (V8 protéase).

- A) Peptide 1 de MEK1 sauvage, peptide 2 et 11 de MEK1 DD, peptide 12 de MEK1 ADD
- B) Peptide 3 de MEK1 ADD, peptide 4 de MEK1 sauvage, peptides 13 et 14 de MEK1 ADD
- C) Peptide 5 de MEK1 DD, peptide 6 de MEK1 ADD, peptide 15 de MEK2 AA, peptide 16 de MEK2 AAA
- D) Peptide 7 et 10 de MEK1 sauvage, peptide 8 de MEK1 DD et peptide 9 de MEK1 ADD

4. DISCUSSION

Grâce à la mutagenèse des sites d'interactions protéine-protéine, du site de liaison à l'ATP et des sites régulateurs de l'activité de MEK1 et de MEK2, nous avons pu identifier un acide aminé impliqué dans la régulation négative de l'activité des deux enzymes.

4.1 MKK^{MEK1/MEK2} À TRAVERS L'ÉVOLUTION

Cet acide aminé, la sérine 212, a été conservée tout comme les deux sérines régulatrices de l'activité (sérines 218 et 222) de la levure à l'humain, c'est à dire chez tous les membres de la famille MEK incluant les mammifères, le xenopus, la drosophile, STE7, MKK1, MKK2, PBS2 de *S. cerevisiae* ainsi que byr 1 et wis 1 de *Schizosaccharomyces pombe* (figure 2) (5, 8, 11, 38, 58, 73, 85, 101, 118, 146, 174, 181, 193, 199). Ceci suggère que la cascade MAPKK/MAP kinase fonctionne universellement chez tous les eucaryotes.

Elle contribue à la prolifération et à la différenciation cellulaire chez les mammifères, à la réponse aux phéromones, à la transduction du signal auxin-like chez les cellules de plantes, à l'osmolarité au glycérol et à l'intégrité de la paroi cellulaire chez la levure à bourgeonnement, à l'induction du photorécepteur et l'expression du gène gap chez la drosophile ainsi qu'à l'induction vulvaire chez *C. elegans* (45, 67, 85, 106, 120).

4.2 APPROCHES UTILISÉES

La mutagenèse dirigée nous a permis de créer différents mutants de MEK1 et MEK2. Un épitope hémagglutinine (HA) a été juxtaposé à l'extrémité N-terminale du gène MEK nouvellement muté. Cet insert a ensuite été introduit dans un vecteur d'expression ayant un promoteur CMV, le vecteur pRC-CMV. Les mutants ont été par la suite transfectés dans les cellules de reins humains, les 293. Suite aux essais kinases réalisés avec chacun des mutants, nous avons pu mesurer et comparer l'activité enzymatique de chaque mutant avec la forme sauvage de MEK1 et MEK2.

4.3 EXPRESSION ET ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MUTANTS MEK1 ET MEK2

4.3.1 EXPRESSION DES MUTANTS MEK1 ET MEK2

L'expression des mutants MEK1 et MEK2 en transitoire est élevée à l'exception des mutants AA et AAA de MEK1 qui ne sont pas ou difficilement exprimés (figures 4,5,6,7). En condition stable, l'expression des mutants MEK1 et MEK2 diffère à l'exception du mutant S212A qui présente une expression aussi élevée chez MEK1 que chez MEK2. Pour les mutants ADD, AEE, DD et EE, considérés comme étant constitutivement actifs, ils présentent une forte expression pour MEK1 qui ne se retrouve pas pour MEK2. Quant au mutant DDD, considéré comme étant constitutivement inactif, il présente une expression faible chez MEK1 qui est contraire à l'expression retrouvée chez MEK2. Le « knockout » de MEK2 pourrait peut-être permettre d'expliquer ces résultats contradictoires à savoir si MEK1, plus que MEK2 est essentielle à la viabilité des cellules et à leur bon fonctionnement.

4.3.2 ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MUTANTS MEK1 ET MEK2

Les mesures de l'activité enzymatique des différents mutants de MEK1 et MEK2 nous ont permis de mieux définir le rôle joué par la sérine 212 dans la régulation de l'activité enzymatique de MEK. Ce sont les mutants créés à partir de la substitution de sérines sur la boucle d'activation de MEK1 et MEK2 qui ont permis de mieux comprendre la régulation de ces deux enzymes. Les sérines en position 218 et 222 sont les deux acides aminés clé pour l'activation de MEK1. Une fois phosphorylées par Raf-1, c-mos ou les MEK kinases, ces deux sérines permettent de stabiliser les interactions entre la boucle d'activation et les résidus impliqués dans la liaison à ERK.

Le rôle joué par la sérine 212 est jusqu'à maintenant inconnu. Cependant, de grands intérêts sont portés vers elle puisqu'elle est, elle aussi, située sur la boucle d'activation et de surcroît, très près des sérines 218 et 222 régulatrices de l'activité des MEKs. La substitution de la sérine 212 en alanine a permis la création d'un mutant où l'on empêche la phosphorylation sur ce site. Contre toute attente, l'activité enzymatique des mutants MEK1 S212A et MEK2 S212A est supérieure aux enzymes sauvages. Nos résultats suggèrent donc que la sérine en position 212, au lieu

de coopérer avec les sérines 218 et 222 pour augmenter l'activité kinase de MEK, permettrait plutôt d'inhiber l'activité de cette dernière.

Selon les essais kinase réalisés par Zheng et al. (199) à partir de protéines GST-MEK1 et du mutant GST-MEK1 S212A qu'ils ont activés 45 minutes avec des lysats de cellules Swiss 3T3 ou avec c-Raf, le mutant a une activité plus faible que la forme sauvage. Pourtant, leurs essais sur l'activité basale de ces mêmes protéines recombinantes leur révèlent que le mutant S212A a une activité 3 à 4 fois plus grande que la forme sauvage. Nous pouvons spéculer qu'une protéine recombinante puisse ne pas être correctement repliée, mais que lorsqu'elle serait activée, elle pourrait adopter sa bonne conformation. Les résultats sont contradictoires car le mutant GST-MEK1 S212A qui a eu une activité plus forte que la forme sauvage est celui qui n'a pas été stimulé. Pourtant, notre mutant pRC-CMV/HA-MEK1 S212A transfecté dans des cellules 293 quiescentes et exponentielles donnent toujours une phosphorylation du MBP plus grande que la forme sauvage.

D'autres évidences viennent supporter le rôle inhibiteur de la sérine 212. Notamment les mutants ADD et AEE qui, dans la plupart des cas, possèdent une activité enzymatique plus élevée que les mutants DD et EE (tableaux I à IV), surtout en ce qui concerne le mutant AEE versus le mutant EE. Il semblerait que l'action de la sérine 212 soit supérieure à celle des sérines 218-222. Les résultats les plus spectaculaires que nous ayons obtenu ont été ceux du mutant DDD, où les sérines 212, 218 et 222 ont été mutées en acides aspartique. À l'inverse du mutant AAA où la mutation de la sérine 212 en alanine n'a pas permis d'augmenter l'activité enzymatique, le mutant DDD possède une activité enzymatique plus faible que les enzymes sauvages malgré la substitution des sérines 218 et 222 en aspartates (figures 4,5,6,7). Ces résultats viennent supporter le rôle de la sérine 212 dans la régulation négative de l'activité enzymatique de MEK1 et MEK2. Ainsi, lorsque les sérines 218 et 222 sont phosphorylées, l'activité kinase de MEK envers ERK augmente considérablement. Lorsque s'ajoute la phosphorylation de la sérine 212, l'activité kinase de MEK se trouve inhibée.

Il existe cependant des évidences qui supportent plus ou moins le rôle inhibiteur de la sérine 212. Comme dans le cas du mutant ADD qui présente une activité enzymatique semblable à celle du mutant DD. De plus, nous retrouvons le mutant AAA qui possède une activité enzymatique aussi faible que celle du mutant AA. Quant au mutant S212D, son activité enzymatique est plus ou moins faible en comparaison à celle de l'enzyme sauvage. Bien que les essais kinases aient permis de démontrer une hausse de l'activité enzymatique pour les mutants MEK1 S212A, MEK2 S212A et une baisse de l'activité enzymatique pour les mutants MEK1 S212D, MEK2 S212D, MEK1 DDD et MEK2 DDD, cela ne démontrait pas la phosphorylation *in vivo* de ces sérines.

4.4 MARQUAGE IN VIVO

L'analyse des phosphoaminoacides totaux suite à la digestion tryptique de l'enzyme sauvage MEK1 et du mutant MEK1 S212A révèle une phosphorylation en sérine et en thréonine (figure 8) (4) mais pas en tyrosine. La phosphorylation en tyrosine a cependant été démontrée par Crews et al. (39) ainsi que par Gardner et al. (53). Cependant, il faut dire que leur analyse des phosphoaminoacides totaux de MEK1 a été faite *in vitro* et non *in vivo*. De plus, ces études *in vitro* manquent de spécificité puisqu'ils ont utilisé une protéine recombinante de MEK1 qui se fait phosphorylée soit par elle-même, soit par MEKK, par Raf ou par ERK. La cascade de signalisation MAPK^{ERK} a été détruite puisqu'il n'y a plus d'intervention du récepteur EGF ni des autres récepteurs, ni de Shc, de Src, GrB2, de SOS et de Ras. De plus, la régulation croisée entre les voies et la participation de protéines adaptatrices dans la signalisation cellulaire ont été abolies. Rien ne garantit que leurs protéines recombinantes soient correctement repliées. La protéine recombinante MEK1 se retrouve ainsi totalement exposée à Raf, à MEKK, à ERK ainsi qu'à elle-même ce qui lui permettrait d'être phosphorylée en tyrosine, chose qui dans des conditions normales ne se passerait peut-être pas.

Quant à l'analyse des phosphoaminoacides provenant de la digestion tryptique de MEK1 sauvage et du mutant pRC-CMV/HA-MEK1 S212A, il a été impossible de démontrer s'il y avait phosphorylation de la sérine en position 212 *in vivo* (résultats non montrés). Il s'avère que le fragment digéré par la trypsine contenant la sérine en position 212 contient aussi les sérines en position 218 et 222 en plus d'une

thréonine (figure 9). Ceci pose un problème majeur puisque les sérines 218 et 222 sont phosphorylées *in vivo*. L'endoprotéinase Glu-c a permis de couper le phosphopeptide tryptique contenant les trois sérines et une thréonine en deux fragments dont un qui ne contiendrait que la thréonine et la sérine 212. Cette enzyme coupe après un résidu glutamate et après un résidu aspartate. Malheureusement, les deux fragments générés ont un patron de migration similaire ce qui nous empêche de démontrer hors de tout doute la phosphorylation de la sérine 212 (figure 16).

Zheng et al. (199) ont également analysés la migration des phosphopeptides en deux dimensions de GST-MEK1, GST-MEK1 S212A, GST-MEK1 S218A et du mutant GST-MEK1 S222A qu'ils ont préalablement activés *in vitro* avec c-Raf puis digérés avec la trypsine. Leurs cartes en deux dimensions migrées à pH8,9 ne ressemblent en rien aux nôtres. La résolution des peptides à pH1,9 que nous avons obtenu était supérieure à la résolution au pH8,9 (résultats non montrés). Tel que mentionné précédemment, leur phosphorylation de MEK s'est fait *in vitro*. Ceci cause des différences majeures puisqu'il y a une perte totale de l'intégrité cellulaire. Il va sans dire que leur protocole diffère également du nôtre sur plusieurs points, entre autre pour le temps de digestion avec la trypsine qui est de 12 heures au lieu de 24 heures. Il est incompréhensible qu'ils aient réussi à séparer sur 2 peptides différents les sérines 218 et 222 et ce, seulement à l'aide de la digestion tryptique. Comment est-ce possible que la trypsine qui ne coupe seulement qu'après une lysine ou une arginine, ait pu séparer la sérine 218 de la sérine 222, alors qu'il n'y a aucune lysine ou arginine entre les sérines 212, 218 et 222. De plus, ils n'ont pu déterminer s'il y avait phosphorylation de la sérine 212. Leurs explications, tirées à partir de leurs résultats, sont nébuleuses puisque pour nous, démontrer la phosphorylation *in vivo* d'un peptide ne contenant que la sérine 212 demeure complexe.

Il faudrait éventuellement observer à l'aide du mutant S212A des MEKs la sénescence de cellules WI38 et observer un changement de morphologie dans les cellules NIH3T3. Il serait également souhaitable de réaliser une cinétique à partir des Rat-1 stables et de créer un mutant S212A chez la levure. Cette dernière permettrait de voir si le rôle joué par la sérine 212 de MEK humain a été conservé à travers l'évolution.

4.5 AUTRES SITES DE RÉGULATION DES MAPKK DE LA LEVURE AUX MAMMIFÈRES

Surgiura et al. (159) ont identifié une nouvelle MAPKK, Pek1. Celle-ci fait partie de la cascade Mkh1/Pek1/Pmk1 qui contrôle l'intégrité cellulaire et, avec la phosphatase calcineurine, antagonise l'homéostasie au chlore chez la levure à fission. Ils concluent que l'état de phosphorylation de Pek-1 détermine si celui-ci est un activateur ou un inhibiteur de Pmk1. Lorsque Pek-1 se fait phosphoryler sur une sérine en position 234 et une thréonine en position 238 (correspondant aux sérines 218 et 222 de MEK1 et MEK2), il devient actif et phosphoryle à son tour Pmk1. À l'inverse, lorsque ces deux résidus sont non phosphorylés, Pek-1 s'associe à Pmk1 et cette association inhibe ce dernier. Surgiura et al. (159) n'ont pas regardé l'état de la phosphorylation de la sérine 228 qui correspond à la sérine 212 de MEK1 et MEK2. La construction d'un mutant où la sérine 228 aurait été substituée par une alanine permettrait de démontrer suite à un essai kinase s'il y a une hausse ou non de l'activité enzymatique. Il est fort à parier que cette sérine pourrait être phosphorylée *in vivo* et que sa phosphorylation serait responsable de l'inhibition de l'activité de Pek1.

L'équipe de Zheng et al. (199) ont muté en alanine le gène STE7 de la levure *S. cerevisiae* sur les sérines 353 et 359 et une thréonine en position 363. Ces résidus correspondent aux trois sérines 212-218-222 de MEK1 et MEK2. Ils ont testé ces mutants dans la lignée de levure E929-6C-18 qui ne possède pas de gène STE7 fonctionnel mais qui contient un gène LacZ sous le contrôle du promoteur FUS1. Ils concluent que le mutant S353A (S212A de MEK1) n'a pas d'activité basale malgré que leur mutant S212A de MEK1 en ait et qu'il n'a pas induit de façon significative le gène LacZ lorsque les levures ont été stimulées avec des phéromones. Premièrement, selon leurs résultats, sans une induction avec des phéromones, l'enzyme sauvage STE7 ainsi que le mutant S353A n'ont aucune activité basale. Il va sans dire que la cascade n'est activée que lorsqu'il y a une stimulation de la voie. De plus, STE7 n'est pas capable de s'autophosphoryler, ce qui ne permet pas de conclure sur le rôle joué par la sérine 353. Deuxièmement, il y a eu quand même une induction du LacZ par le mutant S353A qui est supérieur de 1,6 fois à l'enzyme sauvage. Ceci montre que la sérine 353 pourrait jouer ici aussi sur l'activité de STE7 en diminuant son activité mais peut-être pas autant que la sérine 212 de MEK1 et MEK2.

4.6 PERSPECTIVES

4.6.1 KINASE DE LA SÉRINE 212

L'enzyme la plus susceptible de pouvoir jouer un rôle dans la phosphorylation de la sérine 212 est sans équivoque la kinase Raf-1. Ce dernier étant lui-même la MKKK de la voie MAPK^{ERK}. Cela impliquerait cependant un mécanisme à deux temps. En premier lieu, Raf-1 phosphorylerait les sérines 218 et 222, ce qui activerait MEK. En deuxième lieu, Raf-1 phosphorylerait la sérine 212, ce qui permettrait de désactiver MEK. Malheureusement, non seulement les cinétiques enzymatiques sont inconnues mais aussi Raf-1 n'est pas actif dans les cellules quiescentes. Il faut alors trouver une sérine kinase qui serait active en conditions quiescentes.

Il existe une autre sérine kinase qui serait susceptible de phosphoryler la sérine 212, la CK2 α (casein kinase 2 α). Contrairement à Raf-1, CK2 α est constitutivement active. Cette enzyme, dont la fonction est obscure, est une sérine/thréonine kinase qui se lie à la phosphatase PP2A in vitro et dans des cellules dépourvues d'agents mitogènes. Lorsqu'elle est surexprimée, MEK est désactivée (65). Ceci suggère que la liaison de CK2 α à PP2A pourrait augmenter l'activité de la phosphatase envers MEK. CK2 α inhibe en plus l'activité transformante de Ras oncogénique sans changer celle de MEK constitutivement activée (65, 91). De plus, lorsque Raf-1 devient actif, il brise l'association entre CK2 α et PP2A qui est nécessaire pour l'activation maximale de la voie MAPK^{ERK} par Raf-1 (65). Ainsi, une fois Raf-1 désactivé, PP2A se réassocie à CK2 α qui pourrait alors phosphoryler la sérine 212 ce qui permettrait à PP2A de déphosphoryler MEK. Il faut cependant mentionner que les cinétiques sont inconnues.

4.6.2 PHOSPHATASE DE LA SÉRINE 212

La désactivation temporelle des cascades de signalisation est cruciale pour le contrôle normal de la signalisation cellulaire. Jusqu'à présent, aucune phosphatase n'a été reconnue pour déphosphoryler MEK1 et MEK2 in vivo. Des résultats montrent que la protéine phosphatase 2A (PP2A) pourrait être une candidate de choix. D'abord, parce qu'elle est capable de déphosphoryler MEK in vitro (71), parce qu'elle fonctionne en aval de Ras1 dans la cascade de signalisation du récepteur

Sevenless tyrosine kinase impliquée dans le développement de l'œil de la *Drosophila* (175) et parce qu'elle se fait inactiver par le petit antigène de tumeur encodé par SV40 ce qui a pour effet d'élever l'activité de ERK et de MEK sans affecter l'activité de Raf (154) dans les cellules CV-1 de reins de singe.

Afin de démontrer la déphosphorylation de la sérine 212 de MEK *in vivo*, il faudrait réaliser une cinétique *in vivo* avec MEK en présence ou en absence de l'acide okadaïque, un inhibiteur de PP2A. Il suffirait ensuite d'immunoprécipiter MEK puis la transférer afin d'hybrider celle-ci avec un anti-corps phosphospécifique contre la sérine 212.

4.6.3 STRUCTURE CRISTALLINE DE MEK, RÔLE DE LA SÉRINE 212

Les analyses cristallographiques de la cAPK (cyclic AMP-dependent kinase) et de d'autres protéines kinases ont permis de définir un noyau commun à toutes les protéines kinases. Le noyau a deux domaines. Le site actif se trouve à l'interface des domaines. L'ATP se lie dans un creux du site actif. Le résidu P+1 du substrat se lie à la surface d'une poche dans le domaine C-terminal. Plusieurs protéines kinases ont des sites de phosphorylation sur la boucle d'activation qui est contiguë au site P+1 (178).

Les sérines 212, 218 et 222 de MEK situées sur la boucle d'activation ont été conservées de la levure à l'humain. Ces sérines sont localisées entre les motifs conservés « DFG » et « A/SPE » des sous-domaines VII et VIII. La phosphorylation de résidus dans ces sous-domaines est de plus responsable de l'activation de d'autres kinases comme ERK. Le remplacement des sérines 218 et 222, de la méthionine 219 et de l'asparagine 221 en quatre acides aspartique augmente dramatiquement l'activité enzymatique de MEK1 (95). Ces résultats démontrent l'importance de ce petit groupe d'acides aminés, 218 à 222, dans l'activation de l'enzyme. D'ailleurs, la délétion des acides aminés 44 à 51 dans le domaine N-terminal ou l'introduction de prolines dans ce domaine, permet d'activer MEK en perturbant sa structure secondaire. Les acides aminés 44 à 51 stabiliseraient donc la conformation inactive de MEK, en diminuant les perturbations de sa structure secondaire. La perturbation de la boucle d'activation dans le noyau sérine 218 / sérine 222 permettrait de plus grands mouvements du côté C-terminal alors que les résidus en N-

terminal sont plus contraints. Ce sont les réarrangements structuraux de diverses régions de MEK qui coopèrent pour changer l'état de l'enzyme de la forme inactive à la forme active et non des contacts spécifiques entre les chaînes de la région N-terminale et le reste de l'enzyme. Ainsi, l'activation enzymatique peut-être accomplie via deux mécanismes. Un qui implique l'augmentation de la charge négative sur la boucle d'activation et l'autre qui implique des perturbations dans la structure secondaire du N-terminal au noyau catalytique (95).

Nous savons que les mutants S212D et DDD ont une activité enzymatique qui est très inférieure à l'enzyme sauvage. Par conséquent, nous pouvons spéculer que la phosphorylation de la sérine 212 perturberait la structure secondaire de la boucle d'activation à un point tel qu'elle tuerait l'activité enzymatique de MEK malgré le fait que sa boucle d'activation soit phosphorylée et que l'enzyme ait subi un réarrangement dans sa structure secondaire. MEK ainsi complètement déstabilisée pourrait être la forme reconnue par des phosphatases qui la ramènerait sous sa forme inactive. Aucun mécanisme de désactivation par la phosphorylation d'un seul résidu n'a été trouvé pour toute autre enzyme. Ce serait donc une première en ce genre.

4.6.4 LA SÉRINE 212 DE MEK1, UNE NOUVELLE CIBLE THÉRAPEUTIQUE

La découverte de la régulation négative de l'activité de MEK par un seul acide aminé, soit la sérine 212, ouvre la porte à de nouveaux développements dans la thérapie contre le cancer. Si l'activation soutenue de la voie MAPK^{ERK} induit la sénescence de fibroblastes normaux, elle est également requise dans le processus de l'angiogénèse. Bien que la chimiothérapie comprenne déjà des inhibiteurs de l'angiogénèse, un moyen pour inhiber ce phénomène ainsi que bloquer la transmission des signaux prolifératifs, le contact entre les cellules, la mobilité requise pour l'invasion de tumeurs et la formation des métastases pourrait être la répression de MEK1 par la phosphorylation de la sérine 212.

Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait exprimer le mutant S212D de MEK1 dans des cellules cancéreuses à différents stades de développement de la maladie, afin de mesurer l'impact que causera ce mutant inactif sur la progression du cancer. Même si la séquence en acides aminés de MEK1 et MEK2 change rare-

ment (13), la surexpression du mutant S212D pourrait permettre de bloquer l'activation de ERK en empêchant Ras et Raf-1 oncogéniques ou toute autre molécule en aval de Ras, comme la surexpression d'un récepteur, d'activer de façon constitutive la voie MAPK^{ERK}.

Nous pourrions peut-être suractiver la kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 212 de MEK. Des recherches futures nous apprendront avec certitude, quant à l'identification de cette sérine kinase, son mode d'activation et les cinétiques entourant son activité envers MEK. Il serait intéressant d'exprimer un mutant constitutivement actif de cette sérine kinase dans des cellules cancéreuses, afin d'évaluer son impact sur la phosphorylation de MEK et de ce fait, sur l'angiogénèse, le développement des cellules cancéreuses et la progression du processus tumoral. Pourrions-nous espérer un renversement du phénotype de ces cellules cancéreuses vers un phénotype sauvage? Cela nous permettrait de développer non pas un inhibiteur, mais plutôt un activateur de cette sérine kinase impliquée dans la phosphorylation de la sérine 212 de MEK1.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abbott D.W., J.T. Holt.** *Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G₂/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation.* J. Biol. Chem, 274 : 2732-2749, 1999.
2. **Abe J., M. Kusuvara, R.J. Ulevitch, B.C.Berk, J.D. Lee.** *Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase.* J. Biol.Chem. 271 : 16586-16590, 1996.
3. **Abe M.K., W.L. Kuo, M.B. Herhenson, M.R. Rosner.** *Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth.* Mol. Cell. Biol., 19 : 1301-1312, 1999.
4. **Acharya U., A. Mallabiabarrena, J.K. Acharya, V. Malhotra.** *Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis.* Cell, 92 : 183-192, 1998.
5. **Ahn N.G., J.S. Campbell, R. Seger, A.L. Jensen, L.M. Graves, E.G. Krebs.** *Metabolic labeling of mitogen-activated protein kinase kinase in A 431 cells demonstrates phosphorylation on serine and threonine residues.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 5143-5147, 1993.
6. **Ahn N.G., S. Seger, R.L. Bratlien, C.D. Diltz, N.K. Tonks, E.G. Krebs.** *Multiple components in an epidermal growth factor stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase.* J. Biol. Chem., 266 : 4220-4227, 1991.
7. **Alessandrini A., H. Greulich, W. Huang, and R.L. Erikson.** *MEK1 phosphorylation site mutants activate Raf-1 in NIH3T3 Cells.* J. Biol. Chem., 271 : 31612-31618, 1996.
8. **Alessi D.R., Y. Saito, D.G. Campbell, P. Cohen, G. Sithamandam, U. Rapp, A. Ashworth, C.J. Marshall, S. Cowley.** *Identification of the sites in MAP kinase kinase - 1 phosphorylated by 74^{raf-1}.* EMBO, 13 : 1610-1619, 1994.
9. **Amundadottir L.T., P. Leder.** *Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes.* Oncogene, 16 : 737-746, 1998.
10. **Anderson N.G., J.L. Maller, N.K Tonks, T.W. Sturgill.** *Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase.* Nature, 343 : 651-653, 1990.
11. **Ashworth A., S. Nakielny, P. Cohen, C. Marshall.** *The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase.* Oncogene, 7 : 2555-2556, 1992.

12. **Axmann A., D. Seidel, T. Reimann, U. Hempel, K. Wolfgang Wenzel.** *Transforming growth factor β_1 induced activation of the Raf-Mek-MAPK signaling pathway in Rat lung fibroblasts via a PKC dependent mechanism.* Biochem. Biophys. Res. comm., 249 : 456-460, 1998.
13. **Bansal A., R.D. Ramirez, J.D. Minna.** *Mutation analysis of the coding sequences of MEK1 and MEK2 genes in human lung cancer cell lines.* Oncogene, 14 : 1231-1234, 1997.
14. **Barik S.** *Protein phosphorylation and signal transduction.* Subcellular Biochemistry, 26 (B.B. Biswas and S. Biswas, ed.) : 115-164, Plenum Press, New York, 1996.
15. **Bokemeyer D., A. Sorokin, M.J. Dunn.** *Multiple MAP kinase signaling cascades.* Kidney Int., 49 : 1187-1198, 1995.
16. **Bonneterre J., J.P. Peyrat, B. Vandewalle, R. Beuscart, M.C. Vie, P. Cappelaere.** *Prolactin receptors in human breast cancer.* Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 18 : 1157-1162, 1982.
17. **Bornfeldt K.E., E.W. Raines, L.M. Graves, M.P. Skinner, E.G. Krebs, R. Ross.** *Platelet derived growth factor. Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation.* Anal. Acad. Sci., 766 : 416-430, 1995.
18. **Boulton T.G., S.H. Nye, D.J. Robbins, N.Y. Ip, E. Radziejewska, S.D. Morgenbesser, R.A. DePinho, N. Panayotatos, M.H. Cobb, G.D. Yancopoulos.** *ERKs : a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.* Cell, 65 : 663-675, 1991.
19. **Brott B.K., A. Alessandrini, D.A. Largeaspada, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, C.M. Crews and R.L. Erikson.** *MEK2 is a kinase related to MEK1 and is differentially expressed in murine tissues.* Cell Growth & Differ., 4 : 921-929, 1993.
20. **Brunet A., G. Pagès, J. Pouysségur.** *Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed fibroblasts.* Oncogene, 9 : 3379-3387, 1994.
21. **Camps M., A. Nichols, C. Gillieron, B. Atonsson, M. Muda, C. Chabert, U. Boschert, S. Arkinstall.** *Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK-2 mitogen-activated protein kinase.* Science, 280 : 1262-1265, 1998.
22. **Cance W.G., E.T. Liu.** *Protein kinase in human breast cancer.* Breast Cancer Res. Treat., 35 : 105-114, 1995.

23. **Catling A.D., C. W. Reuter, M.E. Cox, S.J. Parsons, M.J. Weber.** *Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf associated activity.* J. Biol. Chem., 269 : 30014-30021, 1994.
24. **Catling A.D., H.J. Schaeffer, C.W.M. Reuter, G.R. Reddy and M.J. Weber.** *A proline rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for Raf binding and regulates MEK function.* Mol. and Cell. Biol., 15 : 5214-5225, 1995.
25. **Chen Q., T.H. Lin, C.J. Der, R.L. Juliano.** *Integrin-mediated activation of mitogen-activated protein (MAP) or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) and kinase is independent of Ras.* J. Biol. Chem., 271 : 18122-18127, 1996.
26. **Cheng M. T.G. Boulton, M.H. Cobb.** *ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase.* J. Biol. Chem., 271 : 8951-8958, 1996.
27. **Cheng M., D. Wang, M.F. Roussel.** *Expression of c-Myc in response to colony-stimulating factor-1 requires mitogen-activated protein kinase kinase-1.* J. Biol. Chem., 274 : 6553-6558, 1999.
28. **Cheng M., E. Zhen, M.J. Robinson, D. Ebert, E. Goldsmith, M.H. Cobb.** *Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3.* J. Biol. Chem., 271 : 12057-12062, 1996.
29. **Cheng M., V. Sexl, C.J. Sherr, M.F. Roussel.** *Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p 27^{Kip1} regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1).* Proc. Natl. Acad. Sci., 95 : 1091-1096, 1998.
30. **Cheng P., H. Xie, M.C. Sekar, K. Gupta, A. Wells.** *Epidermal growth factor receptor mediated cell motility : phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement.* J. Cell. Biol., 127 : 847-857, 1994.
31. **Choudhury G.G., C. Karamitsos, J. Hernandez, A. Gentilini, J. Bardgette, H.E. Abboud.** *P1-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF.* Am. J. Physiol., 273 : F931-938, 1997.
32. **Clark R., M. Stewart, W.K. Wiskimins, R. Wiskimins.** *Involvement of MAP kinase in the cyclic AMP induction of myelin basic protein gene expression.* Int. J. Dev. Neurosci., 16 : 323-331, 1998.
33. **Cobb M.H., S. Xu, M. Cheng, D. Ebert, D. Robbins, E. Goldsmith, M. Robinson.** *Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP Kinase regulatory pathways.* Advances in Pharmacology, 36 (H. Hidaka and A.C. Nairn, ed.) : 49-65, Academic Press, San Diego, 1996.

34. **Cook S.J., F. Mc Cormick.** *Inhibition by cAMP of Ras- dependent activation of Raf.* Science ,262 : 1069-1072, 1993.
35. **Coulombe P., Pellerin J., Gopalbhal K., Meloche S.** *Implicataion de la MAP kinase ERK3 dans les processus de croissance et de différenciation cellulaire.* Résultats non publiés.
36. **Cowley S., H. Paterson, P. Kemp, C.J. Marshall.** *Activation of MAP kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cell.* Cell, 77 : 841-852, 1994.
37. **Creedon D.J., E.M. Johnson, J.C. Lawrence.** *Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival.* J. Biol. Chem., 271 : 20713-20718, 1996.
38. **Crews C.M., A. Alessandrini, R.L. Erikson.** *The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product.* Science, 258 : 478-480, 1992.
39. **Crews C.M., R.L. Erikson.** *Purification of a murine protein tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene products : relationship to the fission yeast byr 1 gene product.* Science, 258 : 478-480, 1992.
40. **Cuvillier O., G. Pirianov, B. Kleuser, P.G. Vanek, O.A. Coso, S. Gutkind, S. Spiegel.** *Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by spingosine-1-phosphate.* Nature, 381 : 800-803, 1996.
41. **Dang A., J.A. Frost and M.H. Cobb.** *The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK 2 in mammalian cells.* J. Biol. Chem., 273 : 19909-19913, 1998.
42. **Das R., B.K. Vonderhaar.** *Activated of raf-1, MEK, and MAP kinase in prolactin responsive mammary cells.* Breast Cancer Res. And Treat. 40 : 141-149, 1996.
43. **Diaz B., D. Barnard, A. Filson, S. Macdonald, A. King, M. Marshall.** *Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling.* Mol. Cell. Biol. 17 : 4509-4516, 1997.
44. **Duesbery N.S., C.P. Webb, G.F. Vande Woude.** *MEK wars, a new front in the battle against cancer.* Nature Med., 5 : 736-737, 1999.
45. **Eisenmann D.M., S.K. Kim.** *Signal transduction and cell fate specification during Caenor habditis elegans vulval developpement.* Curr. Opin. Genet. Dev., 4 : 508-516, 1994.
46. **Englaro W., C. Bertolotto, R. Busca, A. Brunet, G. Pagès, J.P. Ortonne, R. Ballotti.** *Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation.* J. Biol. Chem., 273 : 9966-9970, 1998.

47. **English J.M., Pearson G., Hockenberry T., Shivakumar L., White M.A., Cobb M.H.** *Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control.* J. Biol. Chem., 274 : 31588-31592, 1999.
48. **Finco T.S., J.K. Westwick, J.L. Norris, A.A. Beg, C.J. Der, A.S. Baldwin, Jr.** *Oncogenic HA-Ras-induced signaling activates NF- κ B transcriptional activity, which is required for cellular transformation.* J. Biol. Chem., 272 : 24113-24116, 1997.
49. **Frost J.A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P.E. Shaw, M.H. Cobb.** *Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins.* EMBO, 16 : 6426-6438, 1997.
50. **Fukuda M., I. Gotoh, Y. Goto, E. Nishida.** *Cytoplasmic localisation of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal.* J. Biol. Chem., 271 : 20024-20028, 1996.
51. **Fukuda M., Y. Gotoh, E. Nishida.** *Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase : it's possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase.* EMBO J., 16 : 1901-1908, 1997.
52. **Gaochao Z., Z.Q. Bao, J.E. Dixon.** *Components of a new human protein kinase signal transduction pathway.* J. Biol. Chem., 270 : 12665-12669, 1995.
53. **Gardner A.M., R.R. Vaillancourt, C.A. Lange-Carter, G.L. Johnson.** *MEK1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase : analysis of phosphopeptides and regulation of activity.* Mol. Biol. Cell, 5 : 193-201, 1994.
54. **Giasson E., S. Meloche.** *Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells.* J. Biol. Chem., 270 : 5225-5231, 1995.
55. **Giroux S., M. Tremblay, D. Bernard, J.-F. Cadrin-Girard, S. Aubry, L. Larouche, S. Rousseau, J. Huot, J. Landry, L. Jeannotte, J. Charron.** *Embryonic death of MEK1 deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta.* Curr. Biol., 9 : 369-372, 1999.
56. **Goetze S., X.P. Xi, Y. Kawano, H. Kawano, E. Fleck, W.A. Hsuek, R.E. Law.** *TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent.* Hypertension, 33 : 183-189, 1999.
57. **Gomez N., P. Cohen.** *Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activated MAP kinase.* Nature, 353 : 170-173, 1991.
58. **Gomez N., S. Traverse, P. Cohen.** *Identification of a MAP kinase kinase kinase in phaeochromocytoma (PC12) cells.* FEBS Lett., 314 : 461-465, 1992.

59. **Gotoh I., M. Fukuda, M. Adachi, E. Nishida.** *Control of the cell morphology and the S phase entry by mitogen-activated protein kinase kinase.* J. Biol. Chem., 274 : 11874-11880, 1999.
60. **Graf K., X.P. Xi, D. Yang, E. Fleck, W.A. Hsueh, R.E. Law.** *Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet- derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells.* Hypertension, 29 : 334-339, 1997.
61. **Grammer T.C., J. Blenis.** *Evidence for MEK independent pathway regulating the prolonged activation of ERK MAP kinases.* Oncogene, 14 : 1635-1642, 1997.
62. **Gupta A.K., Y.L. Lee, S.S. Galoforo, C.M. Berns, A.A. Martinez, P.M. Corry, X. Wu, K.L. Guan.** *Differential effect of glucose deprivation on MAPK activation in drug sensitive human breast carcinoma MCF-7 and multidrug resistant MCF-7/ADR cells.* Mol. Cell. Biochem., 170 : 23-30, 1997.
63. **Guyton K.Z., M. Gorospe, T.W. Kensler, N.J. Holbrook.** *Mitogen activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide : implications for cellular survival and tumor promotion.* Cancer Res., 56 : 3480-3485, 1996.
64. **Haneda M., T. Sugimoto, R. Kikkawa.** *Mitogen-activated protein kinase phosphatase : a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade.* Eur. J. Pharmacol., 365 : 1-7, 1999.
65. **Hériché J.K., F. Lebrin, T. Rabilloud, D. Leroy, E.M. Chambaz, Y Goldberg.** *Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α .* Science, 276 : 952-955, 1997.
66. **Herrera R.** *Modulation of hepatocyte growth factor-induced scattering of HT29 colon carcinoma cells. Involvement of the MAPK pathway.* J. Cell. Sci., 111 : 1039-1049, 1998.
67. **Herskowitz I.** *MAP kinase pathways in yeast : for mating and more.* Cell, 80 : 187-197, 1995.
68. **Heusch W.L., R. Maneckjee.** *Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells.* Carcinogenesis, 19 : 551-556, 1998.
69. **Hoshino R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, S. Ari-i, H. Wada, J. Fujimoto, M. Kohno.** *Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.* Oncogene, 18 : 813-822, 1999.
70. **Huang W., A. Alessandrini, C.M. Crews, R.L. Erikson.** *Raf-1 forms a stable complex with MEK1 and activates MEK1 by serine phosphorylation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 10947-10951, 1993.

71. **Hunter T.** *Protein kinase and phosphatases : the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling.* Cell, 80 : 225-236, 1995.
72. **Impey S., K. Obrietan, S.T. Wong, S. Poser, S. Yano, G. Wayman, J.C. Deloulme, G. Chan, D.R. Storm.** *Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription of ERK nuclear translocation.* Neuron, 21 : 869-883, 1998.
73. **Irie K., M. Takase, K.S. Lee, D.E. Levin, H. Araki, K. Matsumoto, Y. Oshima.** *MKK1 and MKK2, which encode saccharomyces cerevisiae mitogen-activated protein kinase kinase homologs function in the pathway mediated by protein kinase C.* Mol. Cell. Biol., 13 : 3076-3083, 1993.
74. **Jaaro H. H. Rubinfeld, T. Hanoch, R. Seger.** *Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation.* Proc. Natl. Acad. Sci., 94 : 3742-3747, 1997.
75. **Jacque J.M., A. Mann, H. Enslin, N. Sharova, B. Brichacek, R.J. Davis, M. Stevenson.** *Modulation of HIV-1 infectivity by MAPK, a virion-associated kinase.* EMBO J., 17 : 2607-2618, 1998.
76. **Janes P.W., R.J. Daly, A. Defazio, R.L. Sutherland.** *Activation of the ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erb B-2.* Oncogene, 9 : 3601-3608, 1994.
77. **Jelinek T., A.D. Catling, C.W. Reuter, S.A. Moodie, A. Wolfman, M.J. Weber.** *Ras and Raf-1 form a signalling complex with MEK1 but not MEK2.* Mol. Cell. Biol., 14 : 8212-8218, 1994.
78. **Joneson T., J.A. Fulton, D.J. Volle, O.V. Chaika, D. Bar-Sagi, R.E. Lewis.** *Kinase suppressor of Ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated Ras, and Ras effectors.* J. Biol. Chem., 273 : 7743-7748, 1998.
79. **Kannan S., M. De Santis, M. Lohmeyer, D.J. Riese II, G.H. Smith, N. Hynes, M. Seno, R. Brandt, C. Bianco, G. Persico, N. Normano, I. Martinez-Lacaci, F. Ciardiello, D.F. Stern, W.J. Gullick and D.S. Salomon.** *Cripto enhances the tyrosine phosphorylation of Shc and activates Mitogen-activated protein kinase (MAPK) in mammary epithelial cells.* J. Biol. Chem., 272 : 3330-3335, 1997.
80. **Khokhlatchev A., S. Xu, J. English, P. Wu, E. Schaefer, M.H. Cobb.** *Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria.* J. Biol. Chem., 272 : 11057-11062, 1997.
81. **Khosravi-Far R., M.A. White, J.K. Westwick, P.A. Soliski, M. Chrzanowska-Wodnicka, L.V. Aelst, M.H. Wigler and C.J. Der.** *Oncogenic Ras activation of Raf/Mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation.* Mol. Cell. Biol., 16 : 3923-3933, 1996.

82. **Kim S.J., C.R. Kahn.** *Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus : a possible role in the regulation of gene expression.* Biochem. J., 323 : 621-627, 1997.
83. **King A.J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bragodia, M.S. Marshall.** *The protein kinase Pak 3 positively regulate Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338.* Nature, 396 : 180-183, 1998.
84. **Kleme R.L., S. Cai, A.L. Giannini, P.J. Gallagher, P. de Lanerolle, D.A. Cheresh.** *Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase.* J. Cell. Biol., 137 : 481-492, 1997.
85. **Kosako H., E. Nishida, Y. Gotoh.** *cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeast to vertebrates.* EMBO J., 12 : 787-794, 1993.
86. **Kundra V., B. Anand-Apte, L.A. Feig, B.R. Zetter.** *The chemotactic response to PDGF-BB : evidence of a role for Ras.* J. Cell. Biol., 130 : 725-731, 1995.
87. **Kyriakis J.M., H. App, X.-F. Zhang, P. Banerjee, D.L. Brautigan, V.R. Rapp, J. Avruch.** *Raf-1 activates MAP kinase-kinase.* Nature, 358 : 417-421, 1992.
88. **Ladha M.H., K.Y. Lee, T.M. Upton, M.F. Reed, M.E. Ewen.** *Regulation of exit from quiescence by p27 and cyclin D1-CDK 4.* Mol. Cell. Biol., 18 : 6605-6615, 1998.
89. **Lange-Carter C.A., C.M. Pleiman, A.M. Gardner, K.J. Blumer, G.L. Johnson.** *A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf.* Science, 260 : 315-319, 1993.
90. **Lavoie J., N.G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller, J. Pouyssegur.** *Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44 MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway.* J. Biol. Chem., 271 : 20608-20616, 1996.
91. **Lebrin F., L. Bianchini, T. Rabilloud, E.M. Chambaz, Y. Goldberg.** *CK2 α protein phosphatase 2A molecular complex : possible interaction with the MAP kinase pathway.* Mol. Cell. Biol., 191 : 207-212, 1999.
92. **Lessor T., J.Y. Yoo, M. Davis, A.W. Hamburger.** *Regulation of Heregulin beta 1-induced differentiation in a human breast carcinoma cell line by the extracellular regulated kinase (ERK) pathway.* J. Cell. Biochem., 70 : 587-595, 1998.
93. **Lin A.W., M. Barradas, J.C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano, S.W. Lowe.** *Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signalling.* Genes Dev., 12 : 3008-3019, 1998.

94. **Luo W., T.R. Sharif, P.J. Houghton, M. Sharif.** *CGP 41251 and Tamoxifen selectively inhibit mitogen-activated protein kinase activation and c-Fos phosphoprotein induction by substance P in human astrocytoma cells.* *Cell Growth & Diff.*, 8 : 1225-1240, 1997.
95. **Mansour S.J., J.M. Candia, J.E. Matsuura, M.C. Manning, N.G. Ahn.** *Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1.* *Biochemistry*, 35 : 15529-15536, 1996.
96. **Mansour S.J., J.M. Candia, K.K. Gloor, N.G. Ahn.** *Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate similar transcriptional and morphological responses.* *Cell Growth & Diff.*, 7 : 243-250, 1996.
97. **Mansour S.J., K.A. Resing, J.M. Candi, A.S. Hermann, J.W. Gloor, K.R. Herskind, M. Wartmann, R.J. Davis, N.G. Ahn.** *Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase : determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site directed mutagenesis.* *J. Biol. Chem.*, 116 : 304-314, 1994.
98. **Mansour S.J., W.T. Matten, A.S. Hermann, J.M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G.F. Woude, N.G. Ahn.** *Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase.* *Science*, 265 : 966-970, 1994.
99. **Margolis B., O. Silvennoinen, F. Comoglio, C. Roonprapunt, E. Skolnik, A. Ullrich, J. Schlessinger.** *High efficiency expression/cloning of epidermal growth factor – receptor – binding proteins with Src homology 2 domains.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89 : 8894-8898, 1992.
100. **Marshall C.J.** *Specificity of receptor tyrosine kinase signalling : transient versus sustained extracellular signal regulated kinase activation.* *Cell*, 80 : 179-185, 1995.
101. **Matsuda S., Y. Gotoh, E. Nishida.** *Phosphorylation of Xenopus mitogen activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase and MAP kinase.* *J. Biol. Chem.*, 268 : 3277-3281, 1993.
102. **Meloche S.** *Cell cycle reentry of mammalian fibroblast is accompanied by the sustained activation of p 44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition.* *J. Cell. Physio.*, 163 : 577-588, 1995.
103. **Meloche S., K Gopalbhai, B.G. Beatty, S. Scherer, J. Pellerin.** *Chromosomal loci of the human MAP kinase kinase MEK1 and MEK2 genes.* Résultats non publiés.
104. **Meloche S., K. Sweden, G. Pagès, J. Pouysségur.** *Biphasic and synergistic activation of p44 mapk (ERK1) by growth factors : correlation between late phase activation and mitogenicity.* *Mol. Endocrino.*, 6 : 845-854, 1992.

105. **Migliaccio A., M. Di Domenico, G. Castoria, A. de Falco, P. Bontempo, E. Nola, F. Auricchio.** *Tyrosine kinase /p21^{ras}/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells.* EMBO J., 15 : 1292-1300, 1996.
106. **Mizoguchi T., Y. Gotoh, E. Nishida, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida, T. Iwasaki, H. Kawada, K. Shinozaki.** *Characterization of two cDNAs that encode MAP kinases in Arabidopsis thaliana and the role of auxin in activating such kinases in plants.* Plant J., 5 : 111-122, 1994.
107. **Montesano R., J.V. Soriano, G. Hosseini, M.S. Pepper, H. Schramek.** *Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase, MEK 1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells.* Cell Growth & Diff., 10 : 317-332, 1999.
108. **Moodie S.A., B.M. Willumsen, M.J. Weber, A. Wolfman.** *Complexes of RAS : GTP with RAF-1 and mitogen-activated protein kinase kinase.* Science 260 : 1658-1661, 1993.
109. **Muda M., A. Theodosiou, N. Rodrigues, V. Boschert, M. Camps, C. Gillieron, K. Davies A. Ashworth, S. Arkininstall.** *The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases.* J. Biol. Chem., 271 : 27205-27208, 1996.
110. **Muda M., U. Boschert, R. Dickinson, J.C. Martinou, I. Martinou, M. Camps, W. Schlegel, S. Arkininstall.** *MKP-3, a novel cytosolic protein tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphate.* J. Biol. Chem., 271 : 4319-4326, 1996.
111. **Murga C., S. Fukuhara, J.S. Gutkind.** *Novel molecular mediators in the pathway connecting G-protein-coupled receptors to MAP kinase cascades.* TEM 10 : 122-127, 1999.
112. **Muszynski K.W., T. Ohashi, C. Hanson, S.K. Ruscetti.** *Both the Polycythemia-and Anemia-inducing strains of Friend Spleen Focus-Forming virus induce constitutive activation of the Raf-1/Mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.* J. Virol., 72 : 919-925, 1998.
113. **Nakielnny S. P. Cohen, J. Wu, T. Sturgill.** *MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase.* EMBO J., 11 : 2123-9, 1992.
114. **Nebreda A.R., C. Hill, N. Gomez, P. Cohen, T. Hunt.** *The protein kinase mos activates MAP kinase kinase in vitro and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells in vivo.* FEBS Lett., 333 : 183-187, 1993.

115. **Nelson P.R., S. Yamamura, L. Mureebe, H. Itoh, K.C. Kent.** *Smooth muscle cell migration and proliferation are mediated by distinct phases of activation of the intracellular messenger mitogen- activated protein kinase.* J. Vasc. Sur. 27 : 117-125, 1998.
116. **Obara Y., N. Nakahata, Y. Ohizumi.** *A new factor derived from 1321N1 human astrocytoma cells causes differentiation of PC-12 cells mediated through mitogen-activated protein kinase cascade.* Brain Res., 806 : 79-88, 1998.
117. **Oka H., Y. Chatani, R. Hoshino, O. Ogawa, Y. Hakehi, T. Terachi, Y. Okada, M. Kawaichi, M. Kohno, O. Yoshida.** *Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma.* Cancer Res., 55 : 4182-4187, 1995.
118. **Pagès G., A. Brunet, G. L'Allemain, J. Pouyssegur.** *Constitutive mutant and putative regulatory serine phosphorylation site of mammalian MAP kinase kinase (MEK1).* EMBO, 13 : 3003-3010, 1994.
119. **Pagès G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J.C. Chambard, S. Meloche, J. Pouyssegur.** *Mitogen-activated protein kinase p42^{mapk} and p44^{mapk} are required for fibroblast proliferation.* Proc. Natl. Acad. Sci., 90 : 8319-8323, 1993.
120. **Perrimon N., C. Desplan.** *Signal transduction in the early Drosophila embryo : when genetics meets biochemistry.* Trends Biochem. Sci., 19 : 439-518, 1994.
121. **Popik W., J.E. Hesselgesser, P.M. Pitha.** *Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR 4 Receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway.* J. Virol., 72 : 6400-6413, 1998.
122. **Posada J., J.A. Cooper.** *Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in Xenopus Oocytes.* Science, 255 : 212-215, 1992.
123. **Posada J., N. Yew, N.G. Ahn, G.F. Vande Woude, J.A. Cooper.** *Mos stimulates MAP kinase in Xenopus oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro.* Mol. Cell. Biol., 13 : 2546-2553, 1993.
124. **Pukac L., J. Huangpu, M.J. Karnovsky.** *Platelet derived growth factor-BB, insulin-like growth factor-1, and phorbol ester activate different signaling pathways for stimulation of vascular smooth muscle cell migration.* Exp.Cell Res., 242, 548-560, 1998.
125. **Qian Z., D. Okuhara, M.K. Abe, M.R. Rosner.** *Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel.* J. Biol. Chem., 274 : 1621-1627,1999.

126. **Rao G.N.** *Protein tyrosine kinase activity is required for oxidant-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation and c-fos and c-jun expression.* Cell. Signal., 9 : 181-187, 1997.
127. **Ray L.B., T.W. Sturgill.** *Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 3753-3757, 1988.
128. **Reimann T., U.Hempel, S. Krautwald, A. Axmann, R. Scheibe, D. Seidel, K.W. Wenzel.** *Transforming growth factor- β_1 , induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells.* FEBS, 403 : 51-60, 1997.
129. **Resing K.A., N.G. Ahn.** *Deuterium exchange mass spectrometry as a probe of protein kinase activation. Analysis of wild-type and constitutively active mutants of MAP kinase kinase-1.* Biochemistry, 37 : 463-475 : 1998.
130. **Reszka A.A., R. Seger, C.D. Diltz, E.G. Krebs, E.F. Fisher.** *Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton.* Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 92 : 8881-8885, 1995.
131. **Reuter C.W., A.D. Catling, T. Jelinek, M.J. Weber.** *Biochemical analysis of MEK activation in NIH 3T3 fibroblasts.* J. Biol. Chem., 270 : 7644-7655, 1995.
132. **Robinson M.J., M. Cheng, A. Khokhlatchev, D. Ebert, N.G. Ahn, K.L. Guan, B. Stein, E. Goldsmith, M.H. Cobb.** *Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity.* J. Biol. Chem., 271 : 29734-29739, 1996.
133. **Robinson M.J., M.H.Cobb.** *Mitogen-activated protein kinase pathways.* Curr. Opin. Cell Biol., 9 : 180-186, 1997.
134. **Rossomando A.J., P. Dent, T.W. Sturgill, D.R. Marshak.** *Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation.* Mol. Cell. Biol., 14 : 1594-1602, 1994.
135. **Rummel A.M., J.E. Trosko, M.R. Wilson, B.L. Upham.** *Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junction intracellular communication and stimulated MAPK activity.* Toxicol. Sci., 49 : 232-240, 1999.
136. **Sahl B., A. Marotta, C. Matthewson, M. Ahluwalia, J. Fliint, D. Owen, S. Pelech.** *Investigation of the MEK-MAP kinase – Rsk pathway in human breast cancer.* Anticancer Res., 19 : 731-740, 1999.
137. **Salmeron A., T.B. Ahmad, G.W. Carlile, D. Pappin, R.C. Narsimban, S.C. Ley.** *Activation of MEK1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase.* EMBO, 15 : 817-826, 1996.

138. **Sauma S. E. Friedman.** *Increased expression of protein kinase C β activates ERK3.* J. Biol. Chem., 271 : 11422-11426, 1996.
139. **Schaeffer H.J., A.D. Catling, S.T. Eblen, L.S. Collier, A. Krauss, M.J. Weber.** *MP1 : a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade.* Science, 281 : 1668-1674, 1998.
140. **Schaeffer H.J., N.J. Weber.** *Mitogen-activated protein kinase : specific messages from ubiquitous messengers.* Mol. Cell. Biol., 19 : 2435-2444, 1999.
141. **Schramek H., A. Sorokin, R.D. Watson, M.J. Dunn.** *Differential long term regulation of MEK and of p42 MAPK in rat glomerular mesangial cells.* Am. J. Physiol. 270 (Cell Physiol.39) : C40-C48, 1996.
142. **Sebolt-Leopold J.S., D.T. Dudley, R. Herrera, K. Van Becelaere, A. Wiland, R.C. Gowan, H. Tecle, S.D. Barrett, A. Bridges, S. Przybranski, W.R. Leopold, A.R. Saltiel.** *Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo.* Nature Med., 5 : 810-816, 1999.
143. **Seger R., D. Seger, A. A. Reszda, E.S. Munar, H. Eldar-Finkelman, G. Dobrowolska, A.M. Jenson, J.S. Campbell, E.H. Fischer, E.G. Krebs.** *Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells.* J. Biol. Chem., 269 : 25699-25709, 1994.
144. **Seger R., N.G. Ahn, J. Posada, E.S. Munar, A.M. Jensen, J.A. Cooper, M.H. Cobb, E.G. Krebs.** *Purification and characterization of mitogen activated protein kinase activator (s) from epidermal growth factor stimulated A 431 cells.* J. Biol. Chem., 267 : 14373-14381, 1992.
145. **Seger R., N.G. Ahn, T.G. Boulton, G.D. Yancopoulos, N. Panayotatos, E. Radziejewska, L. Ericsson, R.L. Bratlien, M.H. Cobb, E.H. Krebs.** *Microtubule associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues : implication for their mechanisms of activation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 6142-6146, 1991.
146. **Seger, R., D. Seger, F.J. Lozeman, N.G. Ahn, L.M. Graves, J.S. Campbell, L. Ericsson, M. Harrylock, A.M. Jensen, E.G. Krebs.** *Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinase are related to yeast signal transduction kinases.* J. Biol. Chem., 267 : 25628-25631, 1992.
147. **Sevetson B. R., X. Kong, J.J. Lawrence.** *Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 10305-10309, 1993.

148. **Shapiro P.S., E. Vaisberg, A.J. Hunt, N.S. Tolwinski, A.M. Whalen, J.R. McIntosh, N.G. Ahn.** *Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis : direct interactions of active ERK with kinetochore and regulation of mitotic 3F3/2 phosphoantigen.* J. Biol. Chem., 142 : 1533-1545, 1998.
149. **Shapiro P.S., N.G. Ahn.** *Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinases 1 and 2 by MAP kinase phosphatase – 1 (MKP-1).* J. Biol. Chem., 273 : 1788-1793, 1998.
150. **Sheng Z., K. Knowlton, J. Chen, M. Hoshijima, J.H. Brown, K.R. Chien.** *Cardiotropine 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway.* J. Biol. Chem., 272 : 5183-5193, 1997.
151. **Simon C., J. Juarez, G.L. Nicolson, D. Boyd.** *Effect of PD 098059, a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, on urokinase expression and in vitro invasion.* Cancer Res., 56 : 5369-5374, 1996.
152. **Slamon D.J., W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, M.F. Press.** *Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.* Science, 244 : 707-712, 1989.
153. **Song X., H.M. Sheppard, A.W. Norman, X. Liu.** *Mitogen-activated protein kinase is involved in the degradation of p53 protein in the bryostatin-1 induced differentiation of the acute promyelocytic leukemia NB4 cell line.* J. Biol. Chem., 274 : 1677-1682, 1999.
154. **Sontag E., Federoy, C. Kamibayashi, D. Robbins, M.H. Cobb, M. Mumby.** *The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation.* Cell, 75 : 887-897, 1993.
155. **Spiegel S., O. Cuvillier, L. Edsall, T. Kohama, R. Menzeleev, A. Olivera, D. Thomas, Z. Tu, J. Van Brocklyn, F.Wang.** *Roles of sphingosine-1-phosphate in cell growth, differentiation, and death.* Biochemistry, 63 : 69-73, 1998.
156. **Stancato L.F., M. Sakatsume, M. David, P. Dent, F. Dong, E.P. Petricoin, J.J. Krolewski, O. Silvennoinen, P. Saharinen, J. Pierce, C.J. Marshall, T. Sturgill, D.S. Finbloom and A.C. Lerner.** *Beta interferon and Oncostatin M activate Raf-1 and mitogen-activated protein kinase through a JAK1-dependent pathway.* Mol. Cell. Biol., 17 : 3833-3840, 1997.
157. **Sugden P.H., A. Clerk.** *Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors.* Cell signal. 9 : 337-351, 1997.

158. **Sugimoto T., S. Stewart, M. Han, K.L. Guan.** *The kinase suppressor of Ras (KSR) modulates growth factor and Ras signaling by uncoupling Elk-1 phosphorylation from MAP kinase activation.* EMBO J., 17 : 1717-1727, 1998.
159. **Sugiura R., T. Toda, S. Dhut, H. Shuntoh, T. Kuno.** *The MAP kinase Pek 1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch.* Nature, 399 : 479-483, 1999.
160. **Sun H., C.H. Charles, L.F. Lau, N.K. Tonks.** *MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo.* Cell, 75 : 487-493, 1993.
161. **Suy S., W.A. Anderson, P. Dent, E. Chang, V. Kasid.** *Association of Grb2 with Sos and Ras with Raf-1 upon gamma irradiation of breast cancer cells.* Oncogene, 15 : 53-61, 1997.
162. **Taupin K., D.K. Poldosky.** *Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation.* Gastroenterology, 116 : 1072-1080, 1999.
163. **Tolwinski N.S., P.S. Shapiro, S. Groveli, N.G. Ahn.** *Nuclear localisation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression.* J. Biol. Chem. 274 : 6168-6174, 1999.
164. **Tombes, R.M., K.L. Auer, R. Mikkelsen, K. Valerie, M.P. Wymann, C.J. Marshall, M. McMahon P. Dent.** *The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic.* Biochem. J., 330 : 1451-1460, 1998.
165. **Tsygankova O.M., M. Peng, J.A. Maloney, N. Hopkins, J.R. Williamson.** *Angiotensin II induces diverse signal transduction pathways via both Gq and Gi proteins in liver epithelial cells.* J. Cell. Biochem., 69 : 63-71, 1998.
166. **Turgeon B., Saba-EI-Leil M.K., Meloche S.** *Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa.* Biochem. J., 346 : 169-175, 2000.
167. **Ueda Y., S. Hirai, S. Osada, A. Suzuki, K. Minuzo, S. Ohno.** *Protein kinase C δ activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf.* J. Biol. Chem., 271 : 23512-23519, 1996.
168. **Van Aelst L., M. Barr, S. Marcus, A. Polverino, M. Wigler.** *Complex formation between RAS and RAF and other protein kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 6213-6217, 1993.

169. **Van Puijenbroek A.A., D.H. van Weering, C.E. van den Brink, J.L. Bos, P.T. van der Saag, S.W. de Laat, J. den Hertog.** *Cell scattering of SK-N-MC neuroepithelioma cells in response to Ret and FGF receptor tyrosine kinase activation is correlated with sustained ERK2 activation.* *Oncogene*, 14 : 1147-1157, 1997.
170. **Verheijen M.H., R.M. Wolthuis, J.L. Bos, L.H. Defize.** *The Ras/ERK pathway induces primitive endoderm but prevents parietal endoderm differentiation of F9 embryonal carcinoma cells.* *J. Biol. Chem.*, 274 : 1487-1494, 1999.
171. **Virdee K., A.M. Tolkovsky.** *Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor induced-survival of sympatic neurones.* *J. Neurochem.*, 67 : 1801-1805, 1996.
172. **Waldmann V., H.M. Rabes.** *What's new in Ras genes ? Physiological role of Ras genes in signal transduction and significance of Ras gene activation in tumorigenesis.* *Path. Res. Pract.*, 192 : 883-891, 1996.
173. **Wan Y. and X.Y. Huang.** *Analysis of the G_β/mitogen-activated protein kinase pathway in mutant S49 cells.* *J. Biol. Chem.*, 273 : 14533-14537, 1998.
174. **Warbrick E., P.A. Fantès.** *The wis 1 protein kinase is a dosage dependent regulator of mitosis in Schizosaccharomyces pombe.* *EMBO J.*, 10 : 4291-4299, 1991.
175. **Wassarman D.A., N.M. Solomon, H.C. Chang, F.D. Karim, M. Therrien, G.M. Rubin.** *Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1 mediated photoreceptor development in Drosophila.* *Genes Dev.*, 10 : 272-278, 1996.
176. **Whitmarsh A.J., R.J. Davis.** *Structural organization of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals.* *TIBS*, 23 : 481-485, 1998.
177. **Widmann C., S. Gibson, M.B. Jarpe, G.L. Johnson.** *Mitogen-activated protein kinase : Conservation of a three-kinase module from yeast to human.* *Physiol. Rev.*, 79 : 143-180, 1999.
178. **Wilsbacher J.L., E.J. Goldsmith, M.H. Cobb.** *Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases.* *J. Biol. Chem.*, 274 : 16988-16994, 1999.
179. **Winston L.A., T. Hunter.** *Putting JAKs on the kinase MAP.* *Curr. Biol.*, 6 : 668-671, 1996.

180. **Wu J., A.J. Rossomando, J.H. Her, R. Delvecchio, M.J. Weber, T.W. Sturgill.** *Autophosphorylation in vitro of recombinant 42 kilodalton mitogen activated protein kinase on tyrosine.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 9508-9512, 1991.
181. **Wu J., J.K. Harrison, L.A. Vincent, C. Haystead, T.A.J. Haystead, H. Michel, D.F. Hunt, K.R. Lynch, T.W. Sturgill.** *Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase : MAP kinase kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 173-177, 1993.
182. **Wu J., L.F. Lau, T.W. Sturgill.** *Rapid deactivation of MAP kinase in PC12 cells occur independently of induction of phosphatase MKP-1.* FEBS Lett. 353 : 9-12, 1994.
183. **Wu J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M.J. Weber, T.N. Sturgill.** *Inhibition of the EGF activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5' monophosphate.* Science, 262 : 1065-1069, 1993.
184. **Wu X., S.J. Noh, G. Zhou, J.E. Dixon, K.L. Guan.** *Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells.* J. Biol. Chem. 271 : 3265-3271, 1996.
185. **Xia Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, M.E. Greenberg.** *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis.* Science, 270 : 1326-1331, 1995.
186. **Xiao Y.Q., Minami, S. Mue, K. Ohuchi.** *Pharmacological analysis of protein kinases responsible for chemotaxis of rat peritoneal neutrophils.* Eur. J. Pharmacol., 360 : 195-204, 1998.
187. **Xu S., D. Robbins, J. Frost, A. Dang, C.L. Carter and M.H. Cobb.** *MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 : 6808-6812, 1995.
188. **Xu S., S. Khoo, A. Dang, S. Witt, V. Do, E. Zhen, E.M. Scheafer, M.H. Cobb.** *Differential regulation of mitogen-activated protein / ERK Kinase (MEK)1 and MEK2 and activation by a Ras-independant mechanism.* Mol. Endocrinol., 11 : 1618-1625, 1997.
189. **Yan M., D.J. Templeton.** *Identification of 2 serine residues of MEK1 that are differentially phosphorylated during activation by Raf and MEK kinase.* J. Biol. Chem., 269 :19067-19073, 1994.
190. **Yang X. D. Gabuzda.** *Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein.* J. Biol. Chem., 273 : 29879-29887, 1998.

191. **Yang X., D. Gabuzda.** *Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signalling pathway.* J. Virol., 73 : 3460-3466, 1999.
192. **Yarwood S.J., E.M. Sale, G.J. Sale, M.D. Houslay, E. Kilgour, N.G. Anderson.** *Growth hormone dependent differentiation of 3T3 F442A preadipocytes requires Janus kinase/signal transducer and activator of transcription but not mitogen-activated protein kinase or p 70 S6 kinase signaling.* J. Biol. Chem., 274- 8662-8668, 1999.
193. **Yashar B.M., C. Kelley, K. Yee, B. Errede, L.I. Zon.** *Novel members of the mitogen activated protein kinase activation family in Xenopus laevis.* Mol. Cell. Biol., 13 : 5738-5748, 1993.
194. **Yeh J.H., S.C. Hsu, S.H. Han, M.Z. Lai.** *Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized Fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE – inhibitory protein expression.* J. Exp. Med., 188 : 1795-1802, 1998.
195. **Yen A., M.S. Roberson, S. Varvayanis, A.T. Lee.** *Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal- regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest.* Cancer Res., 58 : 3163-3172, 1998.
196. **Yu W., W.J. Fantl, G. Harrowe, L.T. Williams.** *Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK.* Curr. Biol., 8 : 56-64, 1997.
197. **Zecevic M., A.D. Catling, S.T. Eblen, L. Renzi, J.C. Hittle, T.J. Yen, G.J. Gorbsky, M.J. Weber.** *Active MAP kinase in mitosis : localisation at kinetochores and association with the motor protein CENP-E.* J. Biol. Chem., 142 : 1547-1558, 1998.
198. **Zheng C.F. K.L. Guan.** *Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal regulated kinases.* J. Biol. Chem., 268 : 23933-23939, 1993.
199. **Zheng C.F., K.L. Guan.** *Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues.* EMBO J., 13 : 1123-1131, 1994.
200. **Zhu J., D. Woods, M. McMahon, J.M. Bishop.** *Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf.* Genes Dev., 12 :2997-3007, 1998.

ANNEXE I

CALCUL DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MUTANTS MEK1 ET MEK2

1. Evaluer la quantité d'ATP froid dans le volume final de la réaction.

Exemple : 100 μ M ATP froid pour 40 μ L
 100 μ M = 1L
 x mole = 40 μ L
 x = 4 \times 10⁻⁹ mole

2. Evaluer la quantité d'ATP chaud par mole d'ATP froid de la réaction.

Exemple : (5 μ Ci x 0,748) \div 4 \times 10⁻⁹ mole = 935 Ci/mole = 935 ρ Ci/ ρ mole
N.B. Multiplier cette valeur par le facteur de dégradation pour l'ATP selon la date de référence de l'ATP obtenu.

3. Convertir les comptes cpm de chacune des bandes MBP qui ont été excisées d'un gel puis comptées dans du liquide scintillant en ρ mole d'ATP incorporé.

Constante : 1 nCi = 2222 dpm = 2222 cpm
 1 ρ Ci = 2,222 cpm

Exemple : Si nous avons un compte de 21012 cpm pour une immunoprécipitation de 200 μ g de lysat de protéines (mutant MEK2 S212A dans les 293 en phase exponentielle).

$$\begin{array}{rcl} 1 \rho\text{Ci} & = & 2,222 \text{ cpm} \\ x & = & 21\ 012 \text{ cpm} \\ x & = & 9456,3456 \rho\text{Ci} \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 935 \rho\text{Ci} & = & 1 \rho\text{mole} \\ 9456,3456 \rho\text{Ci} & = & y \rho\text{mole} \\ y & = & 10,11 \rho\text{mole} \end{array}$$

4. Calcul de l'activité spécifique (ρ mole/min/mg).
 - A. Diviser la valeur du ρ mole d'ATP incorporé par la durée de la réaction (x minutes) afin d'obtenir le résultat de l'activité totale (ρ mole/min).
 - B. Multiplier par le facteur approprié afin d'obtenir l'activité selon le mg de protéines.

Exemple : A. 10,11 ρ mole \div 40 min = 0,2528 ρ mole/min
 B. 0,2528 ρ mole/min x (1000 μ g/ 200 μ g) = 1,264 mole/min/mg

REMERCIEMENTS

Au terme de ce projet de recherche, je tiens à remercier mon directeur de maîtrise, monsieur Sylvain Meloche pour ses précieux conseils et apport primordial à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à monsieur Kailesh Gopalbhai pour sa grande disponibilité, sa précieuse collaboration et ses nombreux conseils.

Je tiens à remercier également tous mes collègues de travail pour leur important appui et pour notre beau travail d'équipe.

Un merci spécial à mesdames Yolande Dagenais et Liliane Beauregard pour la mise en page et la présentation de ce document.

Enfin, un remerciement particulier à ma famille pour avoir permis la concrétisation de ce projet.