

Université de Montréal

**Inactivation de la MAP kinase atypique ERK4 via la délétion du gène *Mapk4*  
murin**

par

Justine Rousseau

Département de biologie moléculaire et Institut de  
Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC)

Faculté des Etudes Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Etudes Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en biologie moléculaire

Mai 2005

© Justine Rousseau, 2005



QH  
506  
U54  
2005  
v.028

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Etudes Supérieures

Ce mémoire est intitulé :  
**Inactivation de la MAP kinase atypique ERK4 via la délétion du gène *Mapk4*  
murin**

Présentée par :  
Justine Rousseau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Philippe Gratton  
Président-rapporteur  
Sylvain Meloche  
Directeur de recherche  
Nathalie Labrecque  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Les MAP kinases font partie des enzymes les plus étudiées en signalisation cellulaire car elles jouent un rôle clé dans le contrôle de plusieurs réponses cellulaires telles la prolifération, la différenciation, la réponse aux stress et l'apoptose. ERK4 est une MAP kinase atypique qui contrairement aux MAP kinases classiques ERK1/2, JNK et p38, possède un motif SEG plutôt que le très conservé TXY dans sa boucle d'activation. Aucune kinase activatrice, ni aucun substrat n'ont été identifiés pour ERK4. De plus, la fonction de cette enzyme demeure inconnue. Nous avons d'abord analysé la séquence de ERK4 humain. Le séquençage du cDNA initialement cloné a révélé la présence de 5 nucléotides supplémentaires ce qui entraîne un changement au niveau du cadre de lecture de la protéine. Nous présentons ici une séquence révisée de la forme humaine de la protéine ERK4. Nous avons ensuite analysé la structure du gène *Mapk4* murin. Les résultats ont démontré que le gène *Mapk4* murin est composé de 6 exons répartis sur 140 kb. Finalement, l'objectif principal de notre projet était de développer une stratégie de délétion causant l'inactivation du gène *Mapk4* dans les cellules ES dans le but de générer des souris dont la fonction de ERK4 est inactive. Cette délétion est causée par l'insertion du gène de la GFP dans le 2<sup>e</sup> exon, permettant dans un même temps d'analyser le profil d'expression spatio-temporel du gène *Mapk4*. De plus, le gène de la RFP a été utilisé dans la construction du vecteur de ciblage comme marqueur de sélection négatif. Suite au criblage de 300 clones, nous avons identifié trois clones présentant le profil de l'allèle muté. Le clone 148 a été sélectionné pour l'injection de blastocystes de souris. Par conséquent, la première étape dans la génération de souris dont le gène *Mapk4* est inactivé a été franchie avec succès. La création de ce modèle animal nous renseignera grandement sur les fonctions jusqu'ici inconnues de cette MAP kinase atypique.

Mots clés : *Mapk4*, ERK4, étude de fonction, stratégie d'inactivation, construction de ciblage, délétion génique, gène rapporteur, criblage, cellules ES, analyse de séquences.

## SUMMARY

MAP kinases are among the most studied enzymes in cell signalling because of the key role they play in controlling many cellular responses such as proliferation, differentiation, stress response and apoptosis. Contrarily to classical MAP kinases such as ERK1/2, JNKs and p38 family members, ERK4 is an atypical MAP kinase that contains an SEG sequence instead of the well conserved TXY motif in its activation loop. No upstream kinase nor substrates have been identified for ERK4. Furthermore, ERK4 function remains unknown. We first analysed the human ERK4 sequence. Sequencing of the initially cloned cDNA revealed 5 additional nucleotides that shift the open reading frame of the protein. Here we propose a revised sequence for the human form of ERK4 protein. Next, we analysed the structure of the mouse *Mapk4* gene that is composed of 6 exons spanning over 140 kb. Finally, the main objective of our project was to develop a strategy to inactivate *Mapk4* (*Erk4*) gene in ES cell in an attempt to generate ERK4 knockout mice. The gene for GFP was inserted in the inactivation cassette, thus allowing spatio-temporal analysis of *Mapk4* gene expression. Moreover, the RFP gene was used in the targeting vector as a negative selection marker. Among 300 clones screened, 3 positive clones that displayed a correctly targeted allele were identified. Clone 148 was selected for mouse blastocyst injection. This animal model will be of invaluable value in establishing the yet unknown functions of the atypical MAP kinase ERK4.

Key words : *Mapk4*, ERK4, function studies, inactivation strategy, gene targeting, knock out, knock in, ES cells, sequence analysis.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1. INTRODUCTION .....                                     | p | 1  |
| 1.1 Considérations générales .....                        | p | 1  |
| 1.2 Les MAP kinases classiques : ERK1/2, JNK et p38 ..... | p | 2  |
| 1.2.1 Identification .....                                | p | 2  |
| 1.2.2 Identité protéique .....                            | p | 3  |
| 1.2.3 Structure protéique .....                           | p | 3  |
| 1.2.4 Profil d'expression .....                           | p | 5  |
| 1.2.5 Voies de signalisation .....                        | p | 5  |
| 1.2.5.1 Stimuli et récepteurs .....                       | p | 6  |
| 1.2.5.2 Module kinase .....                               | p | 7  |
| 1.2.5.3 Substrats et fonctions .....                      | p | 8  |
| 1.2.6 Régulation .....                                    | p | 10 |
| 1.2.6.1 Phosphorylation/Déphosphorylation .....           | p | 10 |
| 1.2.6.2 Protéines d'échafaudage .....                     | p | 11 |
| 1.3 La MAP kinase ERK5 .....                              | p | 12 |
| 1.3.1 Identification et particularités .....              | p | 12 |
| 1.3.2 Profil d'expression .....                           | p | 13 |
| 1.3.3 La voie de signalisation ERK5 .....                 | p | 13 |
| 1.4 Les MAP kinases atypiques ERK3/ERK4 .....             | p | 14 |

|         |   |      |
|---------|---|------|
| 1.4.1   | Identification .....  | p 14 |
| 1.4.2   | Identité protéique et particularités .....                        | p 15 |
| 1.4.3   | Caractéristiques géniques .....                                   | p 16 |
| 1.4.4   | Profil d'expression .....   | p 17 |
| 1.4.5   | Module kinase et activité kinase .....                            | p 18 |
| 1.4.6   | Substrats et fonctions .....                                      | p 18 |
| 1.4.7   | Régulation .....  | p 20 |
| 1.4.7.1 | Dégradation protéique .....                                       | p 20 |
| 1.4.7.2 | Localisation subcellulaire .....                                  | p 20 |
| 1.5     | Les autres MAP kinases ERK7 et NLK .....                          | p 22 |
| 1.5.1   | ERK7 .....  | p 22 |
| 1.5.2   | NLK .....   | p 22 |
| 1.6     | Étude de fonction via l'inactivation du g <sup>énique</sup> ..... | p 23 |
| 1.6.1   | La souris : un modèle expérimental unique .....                   | p 23 |
| 1.6.2   | Génération de souris nulles (Knock out) .....                     | p 24 |
| 1.6.2.1 | Principes généraux .....  | p 24 |
| 1.6.2.2 | Vecteurs de ciblage .....   | p 26 |
| 1.6.2.3 | Marqueurs de sélection .....                                      | p 28 |
| 1.6.2.4 | Criblage des cellules ES recombinantes .....                      | p 29 |
| 1.6.3   | Génération de souris nulles conditionnelles .....                 | p 29 |



|   |      |
|---|------|
| 1.7 Fonctions des différentes MAP kinases suite à l'analyse du phénotype<br>engendré par la délétion génique chez la souris ..... | p 32 |
| 1.7.1 ERK1 et ERK2 .....  | p 32 |
| 1.7.2 JNK1, JNK2 et JNK3 .....  | p 33 |
| 1.7.3 p38 $\alpha$ .....  | p 34 |
| 1.7.4 ERK5 .....  | p 35 |
| 1.7.5 ERK3 .....  | p 35 |
| <br>  |      |
| 2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS .....   | p 36 |
| <br>  |      |
| 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....   | p 37 |
| 3.1 Matériel .....  | p 37 |
| 3.2 Méthodes .....  | p 37 |
| 3.2.1 Radiomarquage des sondes d'ADN .....  | p 37 |
| 3.2.2 Criblage de la banque d'ADN génomique<br>de phage $\lambda$ GEM12 de souris Sv 129 .....                                    | p 38 |
| 3.2.3 Construction du vecteur de ciblage .....  | p 39 |
| 3.2.4 Culture des cellules souches (ES) Sv 129 .....  | p 40 |
| 3.2.5 Électroporation des cellules ES et sélection .....  | p 40 |
| 3.2.6 Criblage des clones par Southern blot .....   | p 41 |
| 3.2.7 Expression de la construction dans les HEK 293 .....  | p 41 |
| 3.2.8 Séquençage du cDNA de ERK4 .....  | p 41 |
| <br>  |      |
| 4. RÉSULTATS .....  | p 42 |
| 4.1 Séquence révisée de ERK4 humain .....   | p 42 |

|   |      |
|---|------|
| 4.2 Le gène <i>Mapk4</i> ( <i>Erk4</i> ) murin contient 6 exons répartis sur 140 kb ..... | p 45 |
| 4.3 Inactivation du gène <i>Mapk4</i> murin .....   | p 46 |
| 4.3.1 Stratégie de délétion .....   | p 46 |
| 4.3.2 Construction du vecteur de ciblage .....  | p 47 |
| 4.3.3 Ciblage de l'allèle mutée dans les cellules souches (ES) murines .....              | p 50 |
| 5. DISCUSSION ET CONCLUSION .....   | p 54 |
| 5.1 Séquence révisée de ERK4 humain .....   | p 55 |
| 5.2 Le gène <i>Mapk4</i> (ERK4) murin contient 6 exons répartis sur 140 kb .....          | p 56 |
| 5.3 Stratégie d'inactivation et de criblage .....   | p 58 |
| 5.4 Suite du projet .....   | p 62 |
| 6. RÉFÉRENCES .....   | p 65 |

## LISTE DES FIGURES

|   |   |    |
|---|---|----|
| Figure 1 : Module kinase .....  | p | 2  |
| Figure 2 : Voie de signalisation ERK, JNK et p38 chez les mammifères .....  | p | 6  |
| Figure 3 : Procédure pour la génération de souris mutantes .....  | p | 25 |
| Figure 4 : Classification des vecteurs de ciblage .....   | p | 27 |
| Figure 5 : Recombinaison des sites <i>loxP</i> en cis .....   | p | 30 |
| Figure 6 : Induction de la Cre recombinase par le système<br>tétracycline(tet) classique .....  | p | 31 |
| Figure 7 : Séquence révisée du cDNA de ERK4 humain .....  | p | 43 |
| Figure 8 : Séquence révisée de la protéine ERK4 humaine .....   | p | 44 |
| Figure 9 : Structure du gène <i>Mapk4</i> murin .....   | p | 46 |
| Figure 10 : Stratégie de délétion gène <i>Mapk4</i> murin .....   | p | 47 |
| Figure 11: Construction du vecteur de ciblage .....   | p | 48 |
| Figure 12 : Expression de la RFP et de la GFP <i>in vivo</i> .....  | p | 49 |
| Figure 13 : Profil de digestion du locus <i>Mapk4</i> pour la détection des<br>fragments par southern blot .....                                  | p | 50 |
| Figure 14 : Criblage des clones ES par southern blot .....  | p | 51 |
| Figure 15 : Profil de digestion de l'allèle mutée du locus <i>Mapk4</i> pour la<br>détection des fragments par southern blot .....                | p | 52 |
| Figure 16 : Criblage des clones ES recombinants par southern blot .....   | p | 52 |
| Figure 17 : Chimères obtenues suite à la l'injection des cellules ES ERK4+/- de<br>souris Sv 129 dans le blastocyste de mères porteuses CD1 ..... | p | 53 |

## LISTE DES SIGLES

ARNm : acide ribonucléique messagé  
ASK : apoptosis signal regulating kinase  
ATP : adenosine triphosphate  
BMK1 : big MAP kinase 1  
cAMP : cyclic adenosine monophosphate  
CB : CBA chicken  $\beta$ -actin promoter  
CD : common docking domain  
cdks : cyclin dependent kinase  
cDNA : ADN (acide deoxyribonucléique) complémentaire  
CSBP : cytokine-suppressive anti-inflammatory drug-binding protein  
D : docking domain  
DLK : dual-leucine zipper kinase  
DMEM+ : Dulbecco's modified eagle medium high glucose  
DUSPs : dual specificity phosphatases  
EF : humain polypeptide chain elongation factor 1 $\alpha$  promoter  
EGF : epidermal growth factor  
ES : embryonic stem cell  
EST : expressed sequence tag  
ERK : extracellular signal-regulated kinase  
FBS : fetal bovine serum  
GFP : green fluorescent protein  
GPCR : G protein couple receptor  
HBSS : Hank's balanced buffer solution  
5'HS : DNase-hypersensitive site  
IL : interleukin  
JIP-1 : JNK interacting proteins  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
KSR 1 : kinase suppressor of Ras

LIF : leukemia inhibitory factor  
MEM : modified eagle medium  
MNK : mitogen and stress activated kinase  
NGF : nerve growth factor  
NLK : nemo like kinase  
MAP : mitogen-activated protein  
MAP2 : microtubule-associated protein 2  
MAPKAP : MAP kinase-activated protein  
MBP : myelin basic protein  
MEF : mouse embryonic fibroblast  
MK : MAPK-activated protein kinase  
MLK : mixed lineage kinase  
MKP : MAP kinase phosphatase  
MP1 : MEK partner 1  
NDR : N-terminal degradation region  
NES : nuclear export signal  
NLK : nemo like kinase  
PAK : p21-activated Ser/Thr kinase  
PBS : phosphate buffered saline  
PCR : polymerase chain reaction  
PDGF : platelet-derived growth factor  
PP : protein phosphatase  
PRAK : p38-regulated/activated kinase  
PTP-SL : STEP-like protein phosphatase  
RFP : red florescent protein  
RSK : p90 ribosomal S6 kinase  
SRE : serum response element  
SRF : serum response factors  
SAPK : stress-activated protein kinase  
TAK : TGF- $\beta$ -activated kinase  
TAO : thousand and one kinase  
TCF : Ternary complex factors

TRE : TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) response element

TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor

TNFR : tumor necrotic factor receptor

TRAF : TNFR-associated factor

UV : ultra violet

## REMERCIEMENTS

Merci à tous les membres du laboratoire du Dr. Sylvain Meloche, tout spécialement à Benjamin Turgeon (Ben there, done that), Philippe Coulombe, Marc Saba-El-Leil et à mon directeur de recherche, le Dr. Sylvain Meloche. Merci à JC et à mon fils Elie ainsi qu'à mes amis de m'avoir endurée et supportée dans les moments plus difficiles.

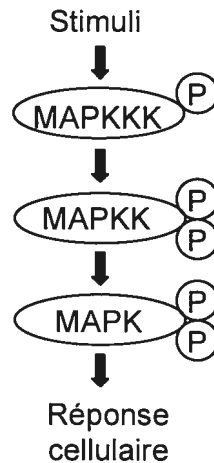
## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Considérations générales

Les MAP («mitogen-activated protein») kinases sont des sérines/thréonines kinases impliquées dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. Ces voies de signalisation permettent l'intégration de signaux provenant de divers stimuli extracellulaires pour que la cellule puisse répondre de façon adéquate aux changements environnants. Ainsi, les MAP kinases sont des enzymes clés impliquées lors de processus contrôlant l'embryogénèse, la prolifération et la différenciation cellulaires, la réponse au stress ainsi que l'apoptose [1-3]. Les premières MAP kinases ont d'abord été désignées MBP/MAP2 kinases suite à leur caractérisation enzymatique mesurée par leur capacité à phosphoryler les substrats MBP («myelin basic protein») ainsi que MAP2 («microtubule-associated protein 2») [4, 5]. Par la suite, l'acronyme MAP a plutôt été utilisé pour définir ces enzymes comme étant activées en réponse à divers agents mitogéniques, d'où l'appellation «mitogen-activated protein» [6].

Chez les eukaryotes, les MAP kinases définissent une grande famille d'enzymes très conservées dans l'évolution, de la levure jusqu'à l'homme (revue dans [3]). Ces enzymes font parties intégrantes d'un module kinase dont l'activation implique la phosphorylation en série de trois kinases soit une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MEKK), une MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK) et une MAP kinase (MAPK) (Figure 1, page 2). La famille de MAP kinases de mammifères comprend 14 membres : ERK1 et ERK2 («extracellular signal-regulated kinase»), JNK 1,2 et 3 («c-Jun N-terminal kinase») et p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ , considérées comme les MAP kinases classiques, ainsi que les sous-familles ERK5, ERK7, NLK («nemo like kinase»), ERK3 et ERK4. Ces dernières sont considérées comme non conventionnelles par leurs particularités respectives en comparaison aux MAP kinases classiques.





**Figure 1 : Module MAP kinase.** L'activation du module kinase implique la phosphorylation en série de trois kinases soit une MAPKKK, une MAPKK et une MAPK.

## 1.2 MAP kinases classiques : ERK1/2, JNK et p38

### 1.2.1 Identification

ERK1 a été la première Map kinase identifiée comme une sérine/thréonine kinase, elle-même phosphorylée sur deux résidus, tyrosine et thréonine, en réponse à l'insuline [4]. Cette kinase s'avéra être la même enzyme caractérisée par différents groupes comme étant phosphorylée sur un résidu tyrosine en réponse à d'autres facteurs de croissance tels le PDGF («platelet-derived growth factor») et l'EGF («epidermal growth factor»)[7], ainsi que par les esters de phorbol [8]. Au début des années 90, le cDNA de cette protéine a été isolé par le groupe de Mélanie Cobb[9], suivi peu de temps après par celui de ERK2 [10].

JNK, aussi appelé SAPK pour «stress-activated protein kinase», a d'abord été caractérisée et purifiée à partir du foie de rat traité à la cycloheximide [11], puis comme une kinase capable de lier et de phosphoryler le N-terminal du facteur de transcription c-Jun en réponse aux rayons ultraviolets [12, 13]. L'isolation du cDNA [14, 15] a permis de mettre en évidence la présence de trois gènes JNK1,2 et 3, dont l'épissage alternatif entraîne la formation d'au moins 10 isoformes [16].

p38 (p38 $\alpha$ ) a été identifiée comme étant phosphorylée en tyrosine en réponse à des endotoxines et suite à un choc osmotique [17], et comme la kinase activatrice de la MAPKAP («MAP kinase-activated protein») kinase 2 dans les cellules traitées à l'interlukine 1 et à l'arsenite [18]. L'isolation du cDNA puis la caractérisation de cette protéine comme une cible de l'inhibiteur pharmacologique SB203580, capable d'empêcher la synthèse de TNF $\alpha$  («tumor necrosis factor») dans les monocytes [19], lui valut aussi le nom de CSBP pour «cytokine-suppressive anti-inflammatory drug-binding protein». L'identification de trois autres gènes a permis d'identifier trois autres isoformes, soit p38 $\beta$  [20], p38 $\gamma$  [21] et p38 $\delta$  [22].

### 1.2.2 Identité protéique

ERK1 et ERK2 sont des protéines de 44 et 42 kDa respectivement qui montrent 85% d'homologie entre elles ainsi qu'une grande homologie avec deux kinases de levure, Kss1 [23] et Fus3 [24], impliquées dans la régulation du cycle cellulaire en réponse aux facteurs de conjugaison. Les différentes formes de JNK présentent 40% d'homologie avec ERK2 au niveau du domaine kinase et 87% d'homologie entre elles. L'extension C-terminale de longueur variable engendre des protéines de 46 et 54 kDa. Les différentes formes de p38, de 38 kDa à 43 kDa, présentent entre 40 et 50% d'homologie avec ERK2 à l'intérieur du domaine kinase et une homologie de plus de 60% entre elles. Tout comme ERK1/2, p38 $\alpha$  possède une grande homologie avec une kinase de levure, Hog1 [25], impliquée dans la réponse à un choc osmotique.

### 1.2.3 Structure protéique

La structure des kinases est définie par la présence d'un domaine catalytique, aussi appelé domaine kinase, qui s'étend sur 250 à 300 acides aminés, subdivisé en 12 sous domaines. L'alignement de la structure primaire de plusieurs kinases a permis de définir la présence de résidus très conservés à l'intérieur de ce domaine, tels les motifs DFG et APE, ainsi que la présence de motifs plus spécifiques aux MAP kinases, dont le motif TXY dans la boucle d'activation [26, 27], ou X représente un acide glutamique pour ERK1/2, une proline pour JNK et une glycine pour p38.

Dans les années 90, plusieurs études dont la cristallographie de la kinase cAMP («cyclic adénosine monophosphate») dépendante [28], ainsi que celle de ERK2 [29] sous la forme phosphorylée et non phosphorylée, ont permis d'élucider la structure tertiaire des MAP kinases. L'analyse structurale a démontré que ces enzymes sont constituées de deux lobes, soit le domaine N-terminal composé majoritairement de feuillets bêta et le domaine C-terminal majoritairement composé d'hélices alpha. Ces deux domaines sont séparés à leur interface par le site catalytique à l'intérieur duquel se lie l'ATP («adenosine triphosphate»). Le domaine N-terminal contient aussi une région riche en glycine permettant le positionnement de l'ATP ainsi qu'un résidu lysine essentiel à la catalyse [30]. Le domaine C-terminal contient le site nécessaire à la reconnaissance du substrat, appelé le site P+1, qui lie spécifiquement les substrats qui contiennent la séquence consensus Pro-X-Ser/Thr-Pro. Le site P+1 est contigu avec une petite boucle, appelée la boucle d'activation, sur laquelle se trouvent les résidus Thr/Tyr (motif TXY) dont la phosphorylation engendre l'activation de la kinase.

Lors de l'activation, la phosphorylation de ces deux résidus induit le rapprochement des deux lobes, l'alignement des résidus essentiels à la catalyse ainsi qu'un changement de conformation du site P+1 permettant la liaison du substrat [29, 31]. La phosphorylation des deux résidus est essentielle à l'activité enzymatique puisque, tel que démontré pour ERK1/2, le remplacement de la Tyr<sup>183</sup> ou la Thr<sup>185</sup> par un résidu alanine ou phénylalanine, respectivement, abolit totalement cette activité [32]. Cependant, la mutation de ces deux résidus par des résidus phosphomimétiques, tel l'acide glutamique, ne rends pas les MAP kinases constitutivement actives [33]. Ceci vient renforcer l'importance de cette double phosphorylation et l'implication de ces deux résidus sur le changement de conformation et l'activation de la kinase.

Les MAP kinases contiennent aussi des domaines d'interactions protéine-protéine. Parmi ceux-ci, le motif composé de résidus acides DXX(D/E), conservé parmi les MAP kinases, a été identifié comme un domaine d'interaction protéine-protéine [34, 35]. Ce domaine, appelé le domaine CD («common docking domain»)

permet une interaction avec les substrats qui possèdent un motif composé de résidus basiques suivi de résidus hydrophobes (LXL et/ou un triplet de résidus hydrophobes). Ce motif, aussi appelé le domaine D («docking domain»), est présent sur plusieurs substrats des MAP kinases tels Elk-1 et c-Jun, sur des kinases activatrices tel MEK1, ainsi que sur les phosphotyrosines phosphatases et sur toutes les MAP kinases phosphatases [34, 36, 37]. Un autre motif, FXFP, présent sur plusieurs substrats, dont les facteurs de transcription SAP-1 et Elk1, a d'abord été identifié comme étant un motif d'interaction spécifique à ERK1/2 [38]. Récemment, il a été démontré que la présence de ce motif augmentait la phosphorylation des substrats par p38 [39]. Le motif FXFP permet la liaison du substrat avec la kinase de manière indépendante ou en plus de l'interaction du substrat avec le domaine CD.

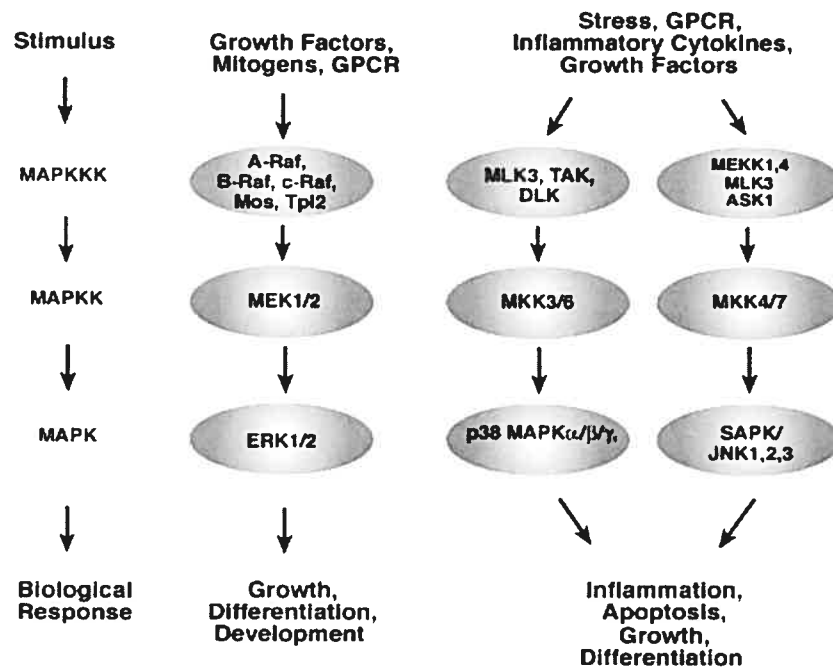
#### 1.2.4 Profil d'expression

ERK1 et ERK2 sont exprimées de façon ubiquitaire tout en présentant un patron d'expression variable selon le tissu et le type cellulaire. L'ARNm est fortement exprimé dans les cellules très différenciées, ainsi que dans le système nerveux où l'expression augmente au cours du développement neuronal [10]. L'ARNm de JNK1 et JNK2 est exprimé de façon ubiquitaire alors que l'expression de JNK3 semble limitée au système nerveux et au cœur [40]. Selon le profil d'expression de l'ARNm, p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont aussi exprimées de façon ubiquitaire [20], alors que p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  sont exprimées de manière différentielle dans différents tissus. L'expression de p38 $\gamma$  est aussi induite lors de la différenciation musculaire alors que l'expression de p38 $\delta$  semble être régulée au cours du développement [41, 42].

#### 1.2.5 Voies de signalisation

Chez les mammifères, trois voies de signalisation ont été particulièrement caractérisées, soit la voie ERK1/2, la voie JNK et la voie p38 (figure 2, page 6). L'activation spécifique des différentes voies de signalisation implique différents types de récepteurs membranaires et protéines adaptatrices ainsi que différentes petites GTPases. Suite à la phosphorylation du module kinase, les MAP kinases

phosphorylent une grande variété de substrats afin d'assurer une réponse cellulaire adéquate.



**Figure 2 : Voie de signalisation ERK, JNK et p38 chez les mammifères.** Suite à un stimulus extracellulaire, les différentes voies de signalisation sont activées via la phosphorylation en série de trois kinases composant le module kinase ( tiré [43] ).

#### 1.2.5.1 Stimuli et récepteurs

Les MAP kinases sont activées par une grande variété de stimuli dont certains sont impliqués dans l'activation de plusieurs voies de signalisation. ERK1/2 sont principalement activées en réponse aux facteurs de croissance (EGF, PDGF, NGF) et à l'insuline [10], alors que JNK et p38 sont principalement activées par différents stress cellulaires (hyperosmolarité, rayons ultraviolets (UV)) [17, 19] ainsi qu'en réponse aux cytokines (IL-1, TNF $\alpha$ ) [44] [45, 46]. La spécificité d'activation des différentes MAP kinases dépend non seulement du type de stimuli mais du type cellulaire. Ainsi, dans certains types cellulaires, ERK1/2 peuvent aussi être activées suite à l'irradiation UV [47] ainsi qu'en réponse à certaines cytokines [48, 49] alors que JNK [14] et p38 [50, 51] peuvent être activées par des facteurs de croissance.

L'activation de ERK1/2 implique principalement les récepteurs à activité tyrosine kinase, activés par des facteurs de croissance, ainsi que différentes classes de GPCR («G protein couple receptor»). Dans le cas des récepteurs tyrosines kinases, la liaison du substrat entraîne l'autophosphorylation du récepteur et le recrutement de la petite GTPase Ras qui, suite à des mécanismes encore peu connus, est en mesure d'activer Raf, la première MAPKKK. Pour ce qui est des GPCRs, l'activation de Raf peut se faire via des mécanismes qui dépendent ou non de l'activation de Ras (revue en [3, 52, 53]).

L'activation de JNK et de p38 implique plusieurs types de récepteurs dont les récepteurs de cytokines TNFR1/2 («tumor necrotic factor receptor»), via le recrutement de TRAF2 («TNFR-associated factor») [54, 55], et le récepteur à l'IL-1 («interleukin 1») qui recrute TRAF6 [56]. Différentes classes de GPCR [57, 58] ainsi que les petites GTPases de la sous famille Rho, dont Rac et Cdc42, ont aussi été impliquées dans l'activation de JNK [59] et p38 [60]. Pour ce qui est des mécanismes d'activation suite à un stress cellulaire, ils sont encore jusqu'à maintenant très peu caractérisés.

#### 1.2.5.2 Module kinase

L'activation du module kinase ERK1/2 implique en premier lieu l'activation des MAP kinases kinases kinases de la sous-famille Raf, telles Raf 1 [61], A-Raf [62] ou B-Raf [63]. Ces kinases vont par la suite activer les MAP kinases kinases MEK1 et MEK2 [64-66], qui à leur tour vont phosphoryler les MAP kinases ERK1 et ERK2. D'autres MAP kinases kinases kinases telles MEKK1,2,3 sont capables d'activer plus d'une voie de signalisation, dont la voie ERK1/2 [67, 68]. Cependant, les MAP kinases kinases MEK1 et MEK2 n'ont jusqu'à maintenant aucun autres substrats connus que ERK1 et ERK2 [69].

Les MAP kinases kinases kinases impliquées dans l'activation de JNK et p38 sont très nombreuses. Leur implication a été démontrée suite à des études de surexpression ainsi que par des expériences de dominant négatif et des expériences de phosphorylation *in vitro*. La plupart sont d'ailleurs capables d'engendrer

l'activation de ces deux MAP kinases et ce à différentes échelles. Par conséquent, la spécificité de ces enzymes au niveau physiologique reste encore ambiguë. Parmi elles, on retrouve TAK1 («TGF- $\beta$ -activated kinase») [70] et ASK1 («apoptosis signal regulating kinase») [71]. MEKK 1-3 [68, 72, 73], MLK2/3 («mixed lineage kinase») [74, 75] et DLK («dual-leucine zipper kinase»)[76] semblent quand à elles plus spécifiques à la voie JNK, alors que TAO 1 («thousand and one kinase») [77] ainsi que PAK («p21-activated Ser/Thr kinase») [60, 78] semblent plus spécifiques à la voie p38.

Les MAP kinases kinases activatrices de JNK sont MKK4 [79] et MKK7[80], qui semblent moins spécifiques que MEK1/2 puisqu'elles sont aussi capables d'activer p38, du moins lorsque surexprimées et *in vitro* [81]. Par contre, l'activation de p38 est spécifiquement assurée par les deux MAP kinases kinases MKK3 [82] et MKK6 [83, 84].

#### 1.2.5.3 Substrats et fonctions

ERK1/2 possèdent une grande diversité de substrats dont les protéines kinases RSK («p90 ribosomal S6 kinase») et MNK 1/2 («mitogen and stress activated kinase»)(revue en [85]), la phospholipase A2 cytoplasmique [86], ainsi qu'un grand nombre de facteurs de transcription dont Elk1 [87], Sap1[88], c-Fos [89] et c-Myc [90]. Les substrats de JNK sont presque exclusivement des facteurs de transcription dont c-Jun [14], ATF-2 [91], p53 [92] et Elk-1 [93]. Ce dernier est d'ailleurs un point de convergence entre la voie ERK1/2 et JNK [93]. p38 compte aussi parmi ses substrats plusieurs facteurs de transcription dont ATF-2 [45] et Sap-1 [94], point de convergence entre la voie ERK1/2 et p38 [95], ainsi que des protéines kinases dont MAPKAP kinases 2/3 («mitogen-activated protein kinase-activated protein») [18] et MNK1/2 [85].

Les MAP kinases jouent un rôle important au niveau de l'embryogénèse, la prolifération et la différenciation cellulaires, la régulation du cycle cellulaire, la réponse au stress ainsi que l'apoptose et la survie cellulaire. Leur capacité à phosphoryler un large éventail de protéines cytoplasmiques ainsi que plusieurs

facteurs de transcription, afin de réguler l'expression génique, explique cette grande diversité au niveau fonctionnel. En général, ERK1/2 sont davantage impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Par exemple, il a été démontré que l'utilisation de dominant négatif de ERK1 pouvait inhiber de façon marquée la prolifération cellulaire [96, 97] et qu'une activation soutenue de la voie ERK 1/2 dans les fibroblastes était requise pour passer le point de restriction en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire [98].

Cependant, les différentes fonctions accomplies par les MAP kinases dépendent aussi du type de stimuli, du type cellulaire, de la durée de l'activation ainsi que de la coactivation de différentes voies de signalisation. Dans les cellules PC12 par exemple, l'activation de ERK1/2 par l'EGF entraîne la prolifération des cellules alors que l'activation par un autre facteur de croissance, le NGF, entraîne la différenciation [99]. Parallèlement, l'absence de NGF dans ces cellules entraîne l'apoptose due à l'inhibition de ERK1/2 (en conjonction avec l'activation de JNK et p38), ce qui implique que dans ce contexte ERK1/2 joue un rôle dans la survie cellulaire [100].

JNK et p38 ont été caractérisées principalement suite à la réponse au stress ainsi que pour leurs rôles dans l'apoptose. L'implication de plusieurs voies de signalisation et le contexte cellulaire pourraient expliquer les différentes fonctions de JNK et ainsi le rôle contradictoire de cette kinase impliquée dans l'apoptose et la survie cellulaire (revue en [101]). Cette double fonction, soit pro et anti apoptotique semble aussi s'appliquer à p38 [102-104]. p38 joue aussi un rôle majeur dans la production de cytokine pro-inflammatoire tel l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  [19, 105], et tout comme JNK, est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires [106-109].

Tel que mentionné, plusieurs substrats des MAP kinases sont des facteurs de transcription qui permettent de contrôler l'expression génique. Par exemple, les facteurs de transcription de la famille TCF («Ternary complex factors»), dont Sap-1 et Elk-1, lorsqu'activés par ERK et/ou JNK et/ou p38, vont former des



hétérodimères avec les facteurs de transcription de la famille SRF («serum response factors»). Ce dimère va par la suite lier l'élément de réponse SRE («serum response element») présent dans la région promotrice du gène c-Fos et ainsi réguler l'expression de ce dernier [87, 88, 110, 111]. Un autre exemple concerne l'activation, par JNK et p38, de l'hétérodimère c-Jun et ATF-2 qui lient la région de contrôle TRE («TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) response element») présente dans la région promotrice du gène c-Jun, ce qui permet ainsi de moduler l'expression de c-Jun [45, 91, 112]. De plus, l'expression des facteurs de transcription de la famille Jun et Fos permet entre autre la formation du complexe AP-1 qui se lie à des éléments de contrôle spécifique dans les régions promotrices des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires [108].

Les différentes fonctions de ces kinases seront aussi abordées à la section 1.7 en rapport aux phénotypes observés suite à l'inactivation du gène chez la souris.

## 1.2.6 Régulation

### 1.2.6.1 Phosphorylation/Déphosphorylation

Tel que mentionné, les MAP kinases sont activées par double phosphorylation sur des résidues tyrosine et thréonine présents dans la boucle d'activation. La phosphorylation des deux résidus est essentielle et nécessaire afin d'activer la kinase. Bien que la durée de cette activation puisse varier, dans des conditions physiologiques, l'activation des MAP kinases est majoritairement transitoire et la quantité des MAP kinases ne varie pas au cours de la stimulation. Ainsi, l'état de phosphorylation doit être régulé de manière rapide et précise. Cet état de phosphorylation dépend de l'équilibre entre la phosphorylation par des kinases activatrices et la déphosphorylation par plusieurs types de phosphatases, dont les sérines/thréonines phosphatases telles PP («protein phosphatase») 2A et PP2C, les tyrosines phosphatases dont PTP-SL («STEP-like protein phosphatase») ainsi que les phosphatases à double spécificités DUSPs («dual specificity phosphatases»), aussi appelées MKPs («MAP kinase phosphatase»).

La spécificité des différentes phosphatases, leur mode de régulation ainsi que leur localisation permettent de réguler de façon spécifique les différentes MAP kinases de manière spatio-temporelle. Par exemple, PP2A, qui est majoritairement cytosolique et impliquée dans la déphosphorylation de ERK1/2 et MEK1/2, est elle-même régulée par son état de phosphorylation suite à une stimulation par des facteurs de croissance [113]. PP2C semble pour sa part spécifique à la voie JNK et p38 où elle est capable d'inactiver p38 ainsi que MKK4 et MKK6 *in vitro* et *in vivo* [114]. Pour ce qui est de PTP-SL, cette phosphatase démontre une spécificité pour ERK1/2 ainsi que p38 et semble aussi posséder la capacité de retenir ERK2 dans le cytosol [115].

Les MKPs sont principalement régulées au niveau transcriptionnel et localisées dans le noyau tel que MKP-1, ou alors activées de façon post-transcriptionnelle et majoritairement cytosoliques tel que MKP3 [116]. Plusieurs stimuli des voies MAP kinases sont d'ailleurs capables d'induire leur expression [117], ce qui implique que ces enzymes font aussi parties d'un mécanisme négatif de régulation rétroactif. Les MKPs démontrent aussi une grande spécificité envers les différentes MAP kinases. Ainsi MKP-3 est spécifique à ERK1/2 [118], MKP-5 et M3/6 à JNK et p38 [118, 119]. MKP-1 est quand à elle capable de déphosphoryler ERK1/2, JNK et p38 [120].

#### 1.2.6.2 Protéines d'échafaudage

La protéine de levure Ste5 est l'une des protéines qui a été le mieux caractérisée pour sa capacité d'échafauder plusieurs protéines ensemble. Cette protéine d'échafaudage est capable de recruter et de lier ensemble les différentes protéines spécifiques au module kinase impliqué dans la réponse aux phéromones (revue en [121]). Les protéines d'échafaudage permettent donc de séquestrer les protéines d'un même module. Ceci permet d'assurer une réponse plus spécifique et une activation rapide du module protéique en question, en raison de la proximité des différentes composantes. De plus, cela permet de localiser différentes protéines en un lieu et à un moment donné ou encore d'empêcher certaines protéines d'interagir avec d'autres protéines afin de prévenir une activation inadéquate.

Chez les mammifères, l'implication des protéines d'échafaudages est beaucoup moins connue que chez les organismes inférieurs tel que la levure. Cependant, quelques protéines d'échafaudages putatives ont été identifiées. Parmi elles, deux protéines ont été identifiées comme étant capables de lier MEK et ERK, soit MP1 («MEK partner 1») qui est spécifique à MEK1 et ERK1 et capable de faciliter leur activation [122] ainsi que KSR 1 («kinase suppressor of Ras») capable de lier directement MEK1/2 ainsi que ERK1/2 [123]. De plus, ces protéines semblent impliquées dans la localisation des MAP kinases au site d'activation. Dans le cas de MP-1, le complexe ainsi formé est localisé à la surface des endosomes tardifs/lysosomes où ERK1 pourrait participer par exemple à la signalisation suite à l'internalisation des récepteurs. Pour ce qui est de KSR-1, elle-même relocalisée à la membrane, elle permet de recruter à ce site MEK et ERK [123] afin d'assurer une réponse rapide suite à l'activation des récepteurs membranaires.

Chez les mammifères, JIP-1 («JNK interacting proteins») est la protéine qui jusqu'à maintenant ressemble le plus à la protéine d'échafaudage Ste5 chez la levure de par sa capacité à lier directement toutes les composantes du module kinase JNK, dont spécifiquement MLK3/DLK, MKK7 et JNK1/2, ce qui permet d'augmenter l'activation des JNKs [124]. Une autre isoforme, JIP-2, a quant à elle aussi été impliquée dans l'échafaudage de MKK3 et p38 [125].

### 1.3 La MAP kinase ERK5

#### 1.3.1 Identification et particularités

ERK5, aussi appelée BMK1 pour «big MAP kinase 1», a été identifiée par la méthode de double hybride utilisée dans le but d'identifier des substrats potentiels de la MAP kinase kinase MEK5 [126], ainsi qu'en utilisant une approche de PCR dégénéré afin d'identifier de nouvelles kinases [127].

Cette MAP kinase contient dans la boucle d'activation le motif TXY, très conservé chez les MAP kinases classiques, où X est un acide glutamique tout comme ERK1/2. L'homologie de la séquence protéique au niveau du domaine kinase avec

ERK2 est de 51%. ERK5 est cependant différente des autres MAP kinases, puisque la protéine de 816 acides aminés possède une extension C-terminale de 400 acides aminés qui n'est pas présente chez les MAP kinases classiques avec un poids moléculaire d'environ 100 kDa. Le rôle fonctionnel de cette extension reste pour l'instant inconnu. Cependant, cette région C-terminale possède plusieurs motifs consensus de phosphorylation MAP kinase dépendant, qui pourraient aussi être des sites d'autophosphorylation [128]. Le domaine C-terminal contient aussi une région riche en proline ainsi qu'une région contenant plusieurs petites répétitions de résidus proline-alanine [126]. Les régions riches en proline représentent souvent des sites de liaison pour les protéines qui contiennent un domaine SH3 tandis que les répétitions proline-alanine pourraient être impliquées dans la localisation de certaines protéines. Par exemple, il a été démontré que la présence de ce motif (proline-alanine) dans la kinase myosine à chaîne légère («Myosin light chain») permet à cette dernière de lier directement l'actin et ainsi d'être localisée à des endroits spécifiques dans la cellule [129].

### 1.3.2 Profil d'expression

L'ARNm de ERK5 est exprimé dans plusieurs tissus à des niveaux variables mais principalement dans le coeur, le placenta, les poumons et les reins [126, 127].

### 1.3.3 La voie de signalisation ERK5

ERK5 est activée en réponse aux facteurs de croissance tel que l'EGF [130] et le NGF [131], en réponse au stress tel que l'oxydation ( $H_2O_2$ ), les chocs osmotiques (sorbitol) [132] et les forces de cisaillement provoquées par le passage du sang dans les vaisseaux [133].

La voie de signalisation ERK5 n'a été caractérisée que récemment. Les récepteurs capables d'activer cette voie sont les récepteurs tyrosines kinases [131] ainsi que les récepteurs couplés aux protéines G [134]. L'activation du module kinase semble, dans certains types cellulaires, être dépendant de Ras [128, 130], impliquer la tyrosine kinase c-Src en réponse au stress oxydatif [134], et tout récemment, impliquer la kinase WNK-1 («with no lysine (K)») [135]. L'activation de

ce module kinase nécessite les MAP kinases kinases kinases MEKK2([136],[135] et MEKK3 [135, 137], une seule MAP kinase kinase, MEK5 [126, 138], et finalement la MAP kinase ERK5, dont les substrats sont principalement des facteurs de transcription dont MEF2C («myocyte enhancer factor2») [138] et le facteur de transcription Sap-1a [131].

ERK5 joue un rôle dans la réponse au stress, comme par exemple en réponse à un stress oxydatif [139], dans la prolifération cellulaire, tel que montré suite à une stimulation par l'EGF [130], dans l'expression de gènes précoces, induite par MEF2C en réponse au sérum [138], ainsi que dans la survie neuronale (revue en [140]).

#### 1.4 Les MAP kinases atypiques ERK3/ERK4

##### 1.4.1 Identification

ERK3 a d'abord été identifiée à partir d'une banque de cDNA de rat à l'aide d'une sonde dérivée de ERK1[10]. La séquence protéique déduite à partir du cDNA caractérisa ERK3 comme une protéine de 543 acides aminés et de masse moléculaire de 63 kDa [10]. Par la suite, le cDNA humain fut isolé et l'analyse de la séquence protéique démontra que la forme humaine, 92% homologue à celle du rat, possédait une extension C-terminale de 178 acides aminés et ainsi, tel que démontré par transcription *in vitro*, une masse moléculaire de 100 kDa [141, 142]. Malgré le fait que les analyses de Northern blot n'ont révélé la présence que d'un seul transcrit d'ARN messager [142], l'homologie élevée entre ces deux orthologues laissait alors envisager la possibilité d'un épissage alternatif ou encore, tel que démontrée par Southern blot, l'existence possible de plusieurs gènes apparentés à ERK3 [10, 141].

Au début des années 2000, Turgeon et al., dans notre laboratoire ont isolé le cDNA de ERK3 chez la souris [143]. Suite à des analyses biochimiques et génomiques, les résultats obtenus ont confirmé que ERK3 est le produit d'un seul gène dont l'expression engendre une protéine unique de 720 acides aminés avec une masse moléculaire de 100 kDa [143, 144]. Le reséquençage du cDNA de rat

révéla que la séquence protéique qui avait été déduite à partir du cDNA était incorrecte et incomplète en raison d'une erreur de séquençage omettant un nucléotide (guanine) entre les codons 502 et 503. L'addition d'un seul résidu à cette position entraîne le déplacement du cadre de lecture, maintenant aligné avec celui de ERK3 humain/souris, et ainsi l'expression d'une protéine de 720 acides aminés avec 94% d'homologie [143].

ERK4 est le deuxième membre de la sous-famille ERK3 des MAP kinases. Le cDNA de ERK4 a été isolé, il y a plus d'une dizaine d'années, à partir d'une banque de cDNA humain [145] et de rat [146] à l'aide d'une sonde dérivée de ERK1. L'identification du cDNA humain a permis de déduire une protéine de masse moléculaire de 63 kDa, alors que le cDNA de rat n'apporte aucune information à ce sujet puisque la séquence analysée était incomplète et ne concernait que le domaine kinase, qui montre cependant 94.4% d'homologie avec celui de l'humain. Suite au séquençage du génome de la souris, nous avons constaté une divergence importante au niveau de la séquence protéique C-terminal entre la forme humaine et celle retrouvée chez la souris. De plus, en comparant la séquence du cDNA humain publié par le groupe de Gonzalez et al. [145] avec la séquence putative du cDNA humain, déduite à partir de la séquence génomique, quelques régions étaient divergentes. Nous avons donc fait séquençer à nouveau le cDNA humain de ERK4 et cette analyse sera présentée dans la partie des résultats à la section 4.1.

#### 1.4.2 Identité protéique et particularités

ERK3 et ERK4 sont des protéines de 100 kDa et 63 kDa, respectivement, qui présentent une homologie au niveau du domaine kinase de 73%, alors que cette homologie diminue grandement au niveau de la partie C-terminale. À l'intérieur du domaine C-terminal, ERK4 possède une région riche en proline qui n'est pas présente chez ERK3. Par rapport à ERK1/2, l'homologie à l'intérieur du domaine kinase est de 50% pour ERK3 et 42% pour ERK4. Tout comme ERK5, ERK3 et ERK4 possèdent une longue extension en C-terminal, ce qui les différencie des MAP kinases classiques. Cependant, il existe deux autres différences majeures au niveau de la séquence protéique qui font que les membres de cette famille sont considérés

comme des MAP kinases atypiques. La première concerne la présence du motif SEG qui vient remplacer le motif TXY très conservé chez les autres MAP kinases. La présence de cette sérine (189 pour ERK3, 186 pour ERK4) confère ainsi un seul site phosphoaccepteur au niveau de la boucle d'activation. La deuxième différence concerne la présence du motif SPR, situé dans le sous-domaine XII, au lieu d'un autre motif très conservé chez les MAP kinases classiques, soit le motif APE.

#### 1.4.3 Caractéristiques géniques

L'existence de plusieurs gènes apparentés à ERK3 a été envisagée suite à des expériences de Southern blot, chez l'humain et chez le rat, qui démontraient plusieurs bandes d'ADN génomique s'hybridant avec une sonde dérivée du cDNA de ERK3 [141] [10]. Paradoxalement, chez la souris une seule bande avait été révélée par Southern blot [143]. De plus, des études d'hybridation fluorescente *in situ* utilisant le cDNA pleine longueur ont localisé le gène *MAPK6* (ERK3) à un seul locus situé sur le chromosome humain 15q21 [141]. Une analyse plus détaillée démontra par la suite que ERK3 est en fait le produit d'un seul gène et que la présence des différentes bandes d'ADN génomique retrouvées par Southern blot pouvait s'expliquer par la présence de plusieurs pseudogènes, dont un chez la souris et six chez l'humain [144]. Chez la souris, le gène *Mapk6* est localisé sur le chromosome 9 adjacent à la mutation *dilute* [143] et chez l'humain sur le 15q21 [141].

La caractérisation du gène *MAPK4* (ERK4) se résume à l'analyse effectuée en comparant l'alignement de la séquence du cDNA avec la séquence d'ADN génomique retrouvée dans les banques de données (NCBI). Tout comme *MAPK6*, le gène *MAPK4* semble situé sur un seul locus. Ce locus se trouve sur le chromosome 18q21 chez l'humain et sur le chromosome 18 chez la souris.

Au niveau structural, le gène *Mapk6* murin s'étend sur une région de 20kb et comprend 6 exons. L'exon 1 ainsi qu'une partie de l'exon 6 génèrent les séquences 5' et 3' non codantes de l'ARNm. Le site d'initiation de la traduction protéique se trouve à l'intérieur de l'exon 2. L'organisation intron/exon est très similaire à celle retrouvée pour le gène humain, bien que ce dernier soit deux fois plus long. Cette

organisation est cependant très différente de celle du gène ERK1, notamment en ce qui a trait à l'organisation exonique encodant les différents sous domaines kinases de la protéine. Par contre, à cet égard, la structure du gène *MAPK6* est très similaire à celle de *MAPK4*, ce qui laisse supposer que ces deux gènes sont le résultat de la duplication d'un gène ancestral commun [144]. Bien que l'organisation intron/exon soit similaire entre ces deux gènes, l'analyse du gène *MAPK4* à partir des banques de données révèle la présence de seulement 5 exons chez l'humain [144], alors que chez la souris le gène *Mapk4* semble posséder 6 exons. Nous avons donc analysé la structure du gène *Mapk4* de souris. Cette analyse sera présentée à la partie résultat à la section 4.2.

Contrairement aux MAP kinases classiques, les gènes *MAPK6* et *MAPK4* ne semblent pas avoir été conservés au cours de l'évolution. Aucun orthologue du gène *MAPK6* et *MAPK4* n'a jusqu'à maintenant été identifiés chez les invertébrés ou chez les plantes [144]. Récemment, un homologue de ERK3 a été identifié chez le *zebrafish* (notre laboratoire, non publié) ainsi que chez un autre poisson, le *Fugu rubripes* [147].

#### 1.4.4 Profil d'expression

L'ARNm de ERK3 est exprimé de façon ubiquitaire à des niveaux variables dans différents tissus adultes avec une expression plus prononcée dans le système nerveux, les muscles squelettiques et l'intestin [141, 144]. Lors du développement embryonnaire chez la souris, l'expression de l'ARNm de ERK3 augmente considérablement entre le jour 9 et 11 puis diminue graduellement jusqu'à la naissance [144]. Ceci est en accord avec le taux d'expression élevé observé lors du développement de la moëlle épinière et de l'hypothalamus chez le rat [10]. De plus, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de ERK3 augmente lors de la différenciation des cellules de carcinome embryonnaires P19 vers une lignée neuronale ou musculaire [10], ainsi que lorsque des cellules de lymphome de Burkitt (Raji) sont traitées avec des inhibiteurs de croissance [148].



L'expression de l'ARNm de ERK4 semble plus limitée que celle de ERK3 et est principalement détectée dans le cœur, les poumons et le système nerveux [145]. Des expériences d'hybridation *in situ* sur le cerveau de rat semble restreindre davantage cette expression au niveau du plexus choroïde et de l'hyppocampe [146].

#### 1.4.5 Module kinase et activité kinase

ERK3 et plus particulièrement ERK4 sont des protéines très peu caractérisées et dont les différentes composantes du module kinase n'ont jusqu'à maintenant pas été identifiées. L'utilisation de plusieurs stimuli connus comme étant capables d'activer les différentes voies des MAP kinases classiques ne permettent pas de démontrer l'activation de ERK3 et ERK4. Bien que la purification d'une kinase putative capable de phosphoryler ERK3 ait été rapportée [149], cette kinase n'a pas été caractérisée d'avantage et n'a pas encore été identifiée. Ainsi, les enzymes capables d'activer ces deux kinases restent pour l'instant inconnues.

En ce qui concerne l'activité kinase de ERK3 et de ERK4, les essais kinases utilisant les substrats classiques des MAP kinases, comme le MBP, n'ont pas permis de déceler l'activité kinase de ces deux enzymes. Cependant, ERK3 est capable de s'autophosphoryler *in vitro* sur la sérine 189 (SEG) présente dans la boucle d'activation [150], ce qui démontre que la protéine possède une activité phosphotransférase. De plus, il a été démontré que la sérine 189 est phosphorylée *in vivo* [150, 151] et que, contrairement à ERK1/2, cette phosphorylation est constitutive dans les cellules privées de sérum[151]. Pour ce qui est de ERK4, nous avons démontré que la sérine 186 (SEG), l'équivalent de la sérine 189 de ERK3, est aussi phosphorylée *in vivo* (non publié).

#### 1.4.6 Substrats et fonctions

Jusqu'à tout récemment, ERK3 ne possédait aucun substrat connu. Dernièrement, MK5 («MAPK-activated protein kinase») a été identifiée par trois groupes comme étant un substrat potentiel de ERK3 [152, 153]. MK5 fut d'abord identifiée comme étant un substrat de la MAP kinase p38, d'où son autre appellation

PRAK («p38-regulated/activated kinase»). Cependant, le rôle physiologique de p38 comme étant un régulateur de l'activité et de la localisation de MK5 a récemment été remis en cause puisque, bien que MK5 soit un substrat de p38 en surexpression [154, 155], MK5 endogène n'est pas activée en réponse aux stimuli capables d'activer p38 et aucune interaction entre ces deux protéines n'a été observée au niveau endogène [156].

Les trois groupes qui ont identifié MK5 comme substrat potentiel de ERK3 s'entendent pour dire que ERK3 et MK5 interagissent ensembles *in vitro et in vivo* et que ERK3 est impliquée dans la relocalisation de MK5 dans le cytoplasme [152, 153]. Cependant, ils arrivent à une conclusion différente en ce qui a trait à l'activation de MK5 et donc au rôle de ERK3 dans la phosphorylation de MK5. L'un démontre que l'activation de MK5 implique son autophosphorylation [153] alors que l'autre groupe démontre que l'activation dépend de la phosphorylation de MK5 par ERK3 [152]. D'autres expériences sont donc nécessaires afin d'éclaircir ce point.

Jusqu'à présent la fonction de ERK3 est toujours inconnue. Cependant, l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de ERK3 au cours du développement embryonnaire murin [143] et lors de la différenciation des cellules embryonnaires de carcinome P19 en cellules neuronales ou musculaires [10] laisse suggérer que ERK3 pourrait avoir un rôle au niveau de la différenciation cellulaire. De plus, l'accumulation de ERK3 a été observée lors de la différenciation des phaeochromocytomes PC12 en cellules neuronales et des myoblastes C2C12 en cellules musculaires [151]. Il a aussi été démontré que la surexpression de ERK3 entraîne un arrêt de la prolifération en inhibant l'entrée des cellules en phase S, ce qui suggère que dans certains contextes cellulaire, ERK3 pourrait agir comme régulateur négatif du cycle cellulaire [151].

Pour ce qui est de ERK4, aucun substrat n'a jusqu'à maintenant été identifié et en ce qui concerne la fonction de cette kinase, celle-ci reste aussi jusqu'à présent inconnue. De plus, nous avons effectué des expériences préliminaires qui semblent

démontrer que, contrairement à ERK3, dans les cellules HEK293, la protéine ne semble pas avoir d'effet au niveau de la prolifération cellulaire (non publié).

#### 1.4.7 Régulation

##### 1.4.7.1 Dégradation protéique

ERK3 est la première MAP kinase à être identifiée comme étant une protéine instable. Cette protéine d'une demi-vie de 30 minutes est dégradée de manière constitutive par le système ubiquitine protéasome dans les cellules en prolifération, et ce indépendamment de son activité kinase et de l'extension C-terminale de la protéine [151]. Par contre, à l'aide de protéines chimériques entre ERK3 et ERK1, deux régions soit NDR1 («N-terminal degradation region») et NDR2 ont été identifiées comme des régions nécessaires et suffisantes pour que la protéine soit ubiquitinée et dirigée vers le protéasome afin d'être dégradée [151]. De plus, il a été démontré que l'ubiquitination de la protéine se fait de manière lysine indépendante, c'est-à-dire non pas sur les lysines internes, sur lesquelles les molécules d'ubiquitines sont généralement attachées, mais plutôt sur le N-terminal de la protéine.

ERK4, contrairement à ERK3, semble être une protéine stable. Lorsque les cellules sont traitées avec la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, la protéine transfectée n'est pas dégradée même après 6 heures suivant le traitement (non publié). D'ailleurs, au niveau de la séquence protéique, la région NDR1 qui confère l'instabilité de ERK3, est très peu conservée entre ERK4 et ERK3 ce qui pourrait expliquer cette plus grande stabilité.

##### 1.4.7.2 Localisation subcellulaire

La première étude sur la localisation de ERK3 a été réalisée par Cheng et al., qui ont montré que ERK3 est une protéine exclusivement nucléaire [150]. Cependant, les résultats obtenus sont sujets à controverse car au moment de cette étude ERK3 était considérée comme une protéine de 62 kDa et non de 100 kDa. Par conséquent, les anticorps anti-ERK3 dérivés de la séquence du cDNA

de rat ont été caractérisés afin d'identifier une protéine de 62 kDa, ce qui complique l'analyse des résultats et met en doute la spécificité des anticorps utilisés afin d'observer la localisation de la protéine endogène.

La deuxième étude sur la localisation de ERK3 a été réalisée par Julien et al. dans notre laboratoire. Cette étude caractérise ERK3 comme une protéine constitutivement cytoplasmique et nucléaire dont la localisation ne dépend pas de son activité enzymatique ou de l'état de phosphorylation de la sérine 189 présente dans la boucle d'activation [157]. La localisation cytoplasmique de ERK3 semble impliquer le système d'export nucléaire actif dépendant de la protéine CRM-1, tel que démontré par l'accumulation nucléaire de ERK3 lorsque les cellules sont traitées à la leptomycine B, un inhibiteur spécifique de CRM-1 [157]. Bien qu'aucune séquence consensus à la séquence riche en leucine caractérisant les NES («nuclear export signal») et nécessaire à l'export par le récepteur CRM-1 n'ait été identifiée, il a été démontré que la région contenant les acides aminés 399-542 est nécessaire pour exporter ERK3 hors du noyau. Cette région pourrait possiblement contenir un ou plusieurs signaux d'export nucléaire quelque peu divergents de la séquence consensus des NES classiques [157]. Cette étude a aussi démontré que l'import et l'export de la protéine est nécessaire à l'arrêt de la prolifération [157]. L'arrêt de la prolifération avait été auparavant observé lorsqu'une forme stable de ERK3 était surexprimée dans les cellules NIH3T3 [151].

Tout récemment, une troisième étude a été réalisée par Bind et al., qui ont démontré que ERK3 est une protéine principalement extranucléaire localisée dans le Golgi, ainsi que les compartiments intermédiaires du reticulum endoplasmique et du Golgi [158]. Cette étude démontre aussi que la protéine existe sous une forme tronquée dont la localisation est maintenant nucléaire et dont cette relocalisation augmente parallèlement avec l'entrée des cellules en phase S [158]. Les résultats contradictoires sur la localisation de ERK3 ainsi que sur l'impact de la localisation nucléaire de la protéine sur le cycle cellulaire laisse donc place à plusieurs questions pour lesquelles d'autres études seront nécessaires afin d'y répondre.

Contrairement à ERK3, des études préliminaires sur la localisation de ERK4, effectuées à l'aide de la protéine transfectée, semblent démontrer que la protéine est principalement cytoplasmique. Tout comme ERK3, l'activité enzymatique de ERK4 et son état de phosphorylation dans la boucle d'activation ne semble pas influencer la localisation de l'enzyme. De plus, tout comme pour ERK3, l'accumulation de ERK4 dans le compartiment nucléaire suite au traitement des cellules à la leptomycine B, laisse suggérer l'existence d'un mécanisme d'export nucléaire actif dépendant de CRM-1 (Julien et al., non publié).

## 1.5 Les autres MAP kinases ERK7 et NLK

### 1.5.1 ERK7

ERK7 fut identifiée en criblant une banque de cDNA de rat [159]. Cette protéine possède dans la boucle d'activation le motif TXY très conservé chez les MAP kinases classiques où X est un acide glutamique tout comme ERK1/2 et ERK5. Par rapport à ERK2, l'homologie au niveau du domaine kinase est de 40% et tout comme ERK5, ERK3 et ERK4, cette protéine de 546 acides aminés contient une extension C-terminale qui n'est pas présente chez les autres MAP kinases. Jusqu'à maintenant cette kinase a été très peu caractérisée et tout comme ERK3 et ERK4 elle n'est pas activée par les stimuli connus pour activer les MAP kinases classiques [159]. Il a été démontré que ERK7 ectopique est constitutivement phosphorylée dans la boucle d'activation et que la protéine possède une activité kinase [159]. Cependant, bien qu'en surexpression ERK7 soit capable d'agir en tant que régulateur négatif de la prolifération cellulaire, ceci se fait indépendamment de son activité kinase [159]. Au niveau de sa régulation, tout comme ERK3, la protéine est régulée via le système ubiquitine protéasome [160]. Aucun substrat n'a pour l'instant été identifié pour cette kinase.

### 1.5.2 NLK

NLK («nemo like kinase») fut identifiée chez la souris comme un homologue de la protéine nemo chez la drosophile [161]. Cette kinase a des caractéristiques communes avec les MAP kinases ainsi qu'avec les cdk («cyclin dependent kinase»).

Bien que l'homologie du domaine kinase soit de 45% par rapport à ERK2, la protéine présente dans la boucle d'activation le motif TQE au lieu du motif TXY très conservé chez les MAP kinases classiques. Par conséquent, tout comme ERK3 et ERK4, cette kinase possède un seul site phosphoaccepteur. Jusqu'à maintenant les MAP kinases capables d'activer NLK sont inconnues. Cependant, il a été démontré que la MAP kinase kinase kinase TAK-1 est impliquée dans l'activation de NLK et que cette activation engendre l'inhibition de la voie de signalisation Wnt [162].

## 1.6 Étude de fonction via l'inactivation génique

### 1.6.1 La souris : un modèle expérimental unique

Bien que le séquençage du génome humain a permis de révéler la séquence et la localisation d'environ 35 000 gènes, l'information dont nous disposons sur la fonction respective de ces gènes ne représente environ que 15% d'entre eux [163]. Jusqu'à présent la souris s'est avérée un excellent modèle expérimental afin d'étudier la fonction de plusieurs gènes humains puisque du point de vue anatomique, physiologique et génétique elle est très similaire à l'humain. De plus, la souris est un outil indispensable puisque son génome peut être manipulé afin d'insérer n'importe quels types de mutations dans les cellules germinales pour qu'il y ait par la suite transmission de la mutation aux générations futures.

La manipulation génétique du génome de souris afin de modifier un gène de façon spécifique est aujourd'hui rendue possible grâce à l'avancement de deux technologies bien précises. La première concerne la possibilité d'isoler et de mettre en culture des cellules embryonnaires souches (ES) [164, 165] qui peuvent par la suite être réinjectées dans un blastocyste en gardant leur potentiel à contribuer à toutes les cellules somatiques ainsi qu'aux cellules germinales [166]. La seconde concerne le développement de méthodes de ciblage génétique («gene targeting») permettant d'insérer un fragment d'ADN exogène par recombinaison homologue entre ce fragment et une séquence homologue présente *in situ* sur le chromosome [167, 168].

Le premier exemple de ciblage génétique par recombinaison homologue dans les cellules ES a été réalisé en ciblant le gène de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) [169, 170]. L'un des premiers exemples de la transmission germinale suite à la manipulation génétique des cellules ES a aussi été réalisé en ciblant le locus de ce gène [171]. Depuis, le ciblage génétique par recombinaison homologue a permis de modifier le génome de la souris soit en insérant des mutations subtiles, comme la mutation, la délétion ou l'insertion d'un seul ou d'un petit nombre de nucléotides, soit en générant des mutations nulles (knock out) en inactivant un gène bien précis, soit en insérant un gène (knock in) à un endroit bien précis, soit en générant des réarrangements chromosomiques, comme des délétions, des inversions et des translocations, ou encore en générant des mutations conditionnelles qui pourront par la suite être exprimées de manière spatio-temporelle [172].

Par conséquent, la souris est un modèle animal unique afin d'analyser, via une ou plusieurs modifications géniques, le phénotype engendré par ces mutations et ainsi apporter de l'information sur plusieurs aspects de la fonction d'un gène et ce dans un contexte physiologique.

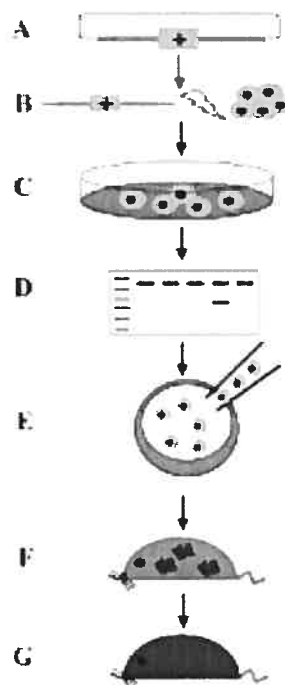
## 1.6.2 Génération de souris nulles (Knock out)

### 1.6.2.1 Principes généraux

La génération de souris nulles est l'une des approches couramment utilisée afin d'étudier la fonction d'un gène. Principalement, cette méthode consiste à inactiver un gène en enlevant une partie du gène ou en insérant une nouvelle séquence afin de compromettre l'intégrité du gène et ainsi empêcher l'expression de la protéine endogène.

Après avoir construit un vecteur de ciblage contenant la mutation désirée, le vecteur est électroporé dans les cellules embryonnaires souches (ES) de souris. Ces cellules sont par la suite mises en culture en présence d'un agent de sélection afin d'éliminer les cellules qui n'ont pas incorporé de manière stable la construction dans

leur génome. Les cellules ES qui survivent sont ensuite isolées et criblées par PCR ou par Southern blot afin de vérifier l'intégration adéquate de la construction au locus ciblé. Celles qui contiennent l'allèle muté sont par la suite injectées dans un blastocyste pour ensuite être transférées dans l'utérus d'une mère porteuse. La progéniture est ensuite analysée afin de déterminer le degré de chimérisme des souris, c'est-à-dire le pourcentage du bagage génétique pour lequel les cellules ES ont contribué. Les mâles qui possèdent un fort degré de chimérisme vont s'accoupler avec des femelles de type sauvage afin de transmettre la mutation dans les cellules germinales de la première portée (F1) (figure 3, page 25). Les souris hétérozygotes seront ensuite croisées entre elles afin de générer des souris homozygotes qui possèdent la mutation désirée sur les deux allèles d'un même locus [173].



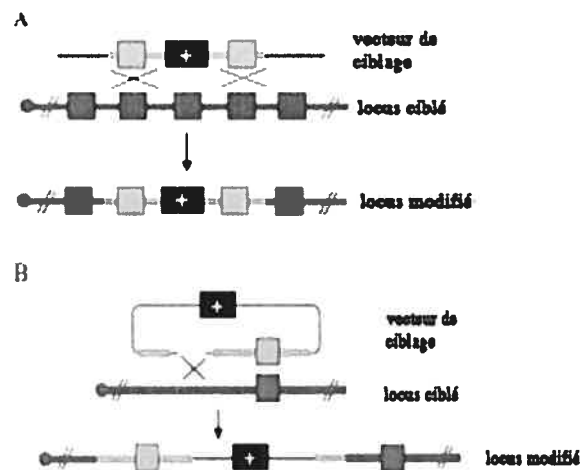
**Figure 3 : Procédure pour la génération de souris mutantes.** A) Construction du vecteur de ciblage B) Électroporation des cellules ES C) Culture des cellules ES en milieu de sélection. D) Identification des clones recombinants E) Injection dans un blastocyste F) génération de souris chimériques et G) Génération de souris hétérozygotes (F1) dont la mutation a été établie dans les cellules germinales (Tiré de [173]).



### 1.6.2.2 Vecteurs de ciblage

La stratégie d'inactivation d'un gène comporte plusieurs aspects dont le choix du vecteur de ciblage pour le type de mutation désirée ainsi que le choix du marqueur de sélection qui permet de sélectionner les cellules qui ont intégré de manière stable la mutation dans leur génome [173]. Cette intégration par recombinaison homologue dépend de l'accessibilité du locus ciblé, mais aussi de la stratégie utilisée pour construire le vecteur de ciblage. Les caractéristiques de ce vecteur peuvent affecter la fréquence à laquelle la recombinaison se produit et ainsi diminuer l'intégration au hasard dans le génome, qui est un événement beaucoup plus fréquent que la recombinaison homologue chez les mammifères.

Le vecteur de ciblage est composé minimalement de deux séquences homologues à la séquence génomique ciblée ainsi que d'un marqueur de sélection inséré entre ces deux séquences. La fréquence de recombinaison homologue augmente avec la longueur des fragments recombinants composant le vecteur. Ces séquences totalisent généralement entre 6 et 10kb et doivent avoir un minimum de 1kb de chaque côté du marqueur de sélection [174]. Il existe deux types de vecteurs, soit le vecteur de remplacement et le vecteur d'insertion (figure 4, page 27). Ces deux vecteurs diffèrent principalement à l'endroit où ils sont linéarisés, ce qui par conséquent modifie la manière dont ils sont intégrés au locus ciblé. Le vecteur de remplacement est linéarisé de manière à ce que la séquence du vecteur reste colinéaire avec la séquence génomique ciblée. Par conséquent, le vecteur de ciblage, composé de deux séquences recombinantes homologues à celle du gène, est inséré par double recombinaison homologue. À l'opposé, le vecteur d'insertion est linéarisé à l'intérieur de la région d'homologie ce qui fait que la recombinaison homologue implique une seule étape de recombinaison qui engendre l'insertion de la totalité du vecteur de ciblage. Par conséquent, en plus d'insérer la construction, cette insertion entraîne la duplication des séquences homologues au sein du locus ciblé [173]. Dans les deux cas l'intégrité du gène est compromise dans le but d'empêcher l'expression de ce dernier.



**Figure 4 : Classification des vecteurs de ciblage.** A) Vecteur de remplacement : La linéarisation du vecteur à l'extérieur des séquences recombinantes homologues permet une double recombinaison ce qui engendre l'insertion du vecteur et le remplacement de la région ciblée. B) Vecteur d'insertion : La linéarisation du vecteur de ciblage à l'intérieur de la séquence recombinante homologue permet une seule recombinaison qui entraîne l'insertion du vecteur et la duplication de la région ciblée (Tiré de [173]).

Bien que la fréquence de recombinaison homologue du vecteur d'insertion soit 5 à 20 fois supérieure à celle du vecteur de remplacement [175] la majorité des souris nulles ont été générées en utilisant le vecteur de remplacement. Ceci s'explique en partie par le fait que le vecteur de remplacement permet d'enlever une partie du gène et d'insérer à un endroit spécifique un gène tel un gène rapporteur. Cette méthode appelée «knock in» est souvent utilisée afin de connaître l'expression du gène ciblé. Dans la majorité des cas le gène rapporteur utilisé est le gène Lac Z qui code pour la B-galactosidase. Ce gène est placé en phase avec l'ATG initiateur de la traduction de la protéine endogène. Ceci permet non seulement d'inactiver le gène ciblé, mais puisque que l'insertion ne perturbe pas le cadre de lecture, cela permet aussi d'obtenir de l'information supplémentaire sur le profil d'expression spatio-temporel du gène d'intérêt, mesuré par la présence de la B-galactosidase [176].

### 1.6.2.3 Marqueurs de sélection

La sélection positive des clones ES qui ont intégré de manière stable la mutation dans leur génome est basée sur la présence d'un gène qui confère une résistance permettant aux cellules qui ont intégré ce dernier de survivre. Le marqueur de sélection le plus souvent utilisé est une cassette contenant le gène de résistance à la néomycine ( $neo^r$ ) qui exprime une protéine aminoglycoside phosphotransférase qui rend les cellules résistantes à l'antibiotique G418 [177].

Le gène  $Neo^r$  est souvent sous le contrôle d'un promoteur fort. Il est donc important de prendre en considération que la présence d'un promoteur fort peut venir interférer avec l'expression des gènes avoisinants. Par exemple, il a été démontré que la délétion du site 5'HS («DNase-hypersensitive site») 2 présent dans la région contrôle du locus(LCR) du gène de la  $\beta$ -globine n'était pas responsable du phénotype observé qui était plutôt dû à la présence du marqueur de sélection [178]. Une solution alternative, lorsque le gène d'intérêt est exprimé dans les cellules ES, est d'insérer le gène de résistance  $Neo^r$  sous le contrôle du promoteur endogène du gène ciblé. Une autre solution consiste à ajouter des sites loxP de part et d'autre de la cassette  $Neo^r$ . Ceci permet par la suite de «floxxer» la cassette  $neo$  et ainsi de se débarrasser du marqueur de sélection et de son promoteur [179]. Cette approche sera discutée plus en détail à la section 1.6.3 puisque cette méthode est le principe de base utilisé pour générer des souris avec des mutations conditionnelles.

Un marqueur de sélection peut aussi être utilisé afin d'augmenter le nombre de cellules qui ont incorporé la mutation par recombinaison homologue. Cette sélection, contrairement à la sélection utilisant le gène  $Neo^r$ , est une sélection négative qui permet d'éliminer les cellules ayant intégré la mutation au hasard dans leur génome. Le gène le plus souvent utilisé est le gène HSV-1tk. Ce gène est inséré dans le vecteur de ciblage à l'extérieur de la séquence contenant les fragments recombinants. Par conséquent, l'intégration de ce dernier n'arrive généralement que lorsque les cellules ont intégré la construction au hasard dans leur génome. Ce gène exprime la protéine thymidine kinase (TK) qui facilite l'intégration

de l'agent de sélection FIAU, un analogue nucléotidique toxique, lors de la réplication de l'ADN. Cette analogue bloque ainsi l'addition de nouveaux nucléotides ce qui entraîne un arrêt de la réplication et subséquemment la mort cellulaire. Par conséquent, cette méthode permet d'enrichir de 3 à 10 fois le nombre de cellules dont l'incorporation s'est faite par recombinaison homologue [180].

#### 1.6.2.4 Criblage des cellules ES recombinantes

Suite à la sélection, les clones ES qui ont survécu sont analysés par Southern blot ou par PCR («polymerase chain reaction») afin de s'assurer que la construction de ciblage a été insérée correctement et intégralement au locus ciblé [176]. Lorsque la méthode utilisée est celle du PCR, un des oligo nucléotiques est dérivé à partir de la séquence présente uniquement dans la construction du vecteur, tandis que l'autre oligo nucléotique est dérivé de la séquence génomique autre que les séquences utilisées pour construire le vecteur de ciblage. L'analyse par Southern blot est basée sur le profil de digestion unique du locus ciblé, révélé en utilisant une sonde spécifique dérivée de séquences génomiques en 5' ou en 3' de la construction.

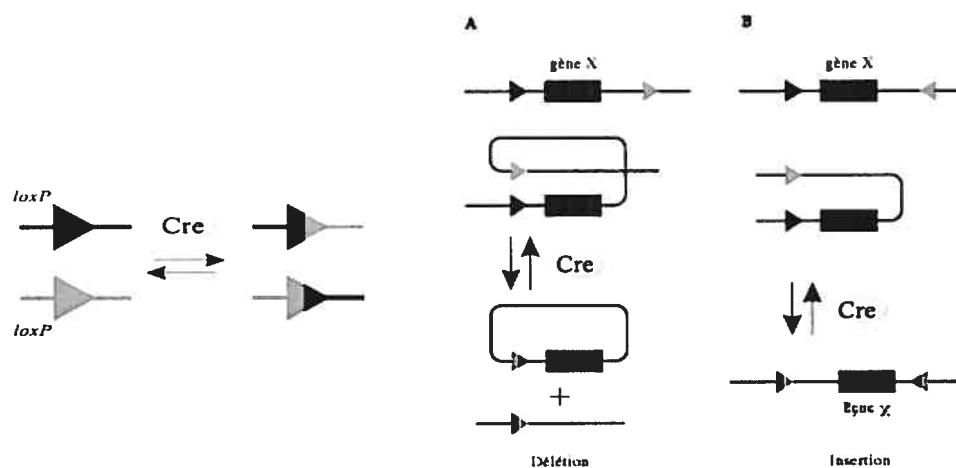
#### 1.6.3 Génération de souris nulles conditionnelles

La génération de souris nulles classique comporte deux désavantages majeurs. Le premier concerne le cas où l'inactivation du gène est létale au cours du développement embryonnaire de la souris. Par conséquent, la fonction du gène ne peut être investiguée dans les stades de développements subséquents et conséquemment chez adulte. Le deuxième concerne les gènes qui ont un large spectre d'expression et dont l'inactivation entraîne un phénotype complexe qui affecte plusieurs tissus.

Afin de remédier à ces limitations, plusieurs groupes ont mis au point différentes stratégies pour rendre l'expression de la mutation conditionnelle [181] [172]. Ces stratégies sont basées sur la propriété du système Cre/*loxP*. La protéine Cre est une recombinase identifiée chez le bactériophage P1. Cette protéine reconnaît une séquence composée de 34 paires de bases, appelée le site *loxP*, et

catalyse la recombinaison de l'ADN présent entre deux sites *loxP* [182]. Ainsi, la recombinaison entre deux sites *loxP* situés en *cis* et orientés dans la même direction se traduit par l'excision du fragment inséré entre ces deux sites, ou lorsque orientés dans des directions opposés, par l'inversion du fragment (figure 5, page 30).

En utilisant cette approche, il est alors possible de générer des souris dont le gène ciblé a été modifié, de façon à ce que la séquence à enlever permettant l'inactivation du gène, se retrouve entre deux sites *loxP*. Les souris contenant ces sites *loxP*, lorsque croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique actif dans un tissu en particulier, permettront d'inactiver le gène de manière tissu dépendant [181].

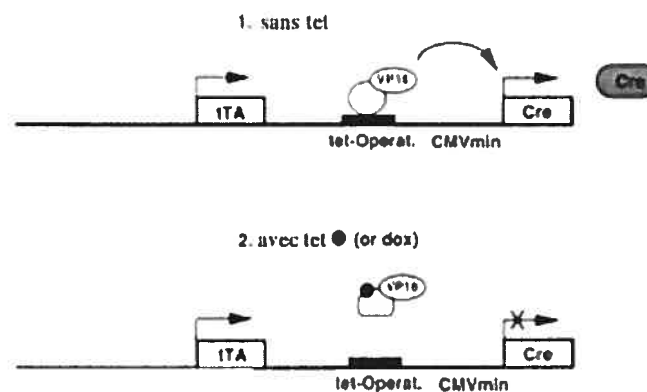


**Figure 5 : Recombinaison des sites *loxP* en *cis*.** A) L'orientation des sites *loxP* dans la même direction engendre la délétion de la séquence présente entre ces deux sites. B) L'orientation des sites *loxP* dans une direction opposée engendre l'inversion de la séquence présente entre ces deux sites. (Tiré de [172])

En plus d'inactiver un gène dans un tissu spécifique, il est aussi possible d'inactiver un gène à un temps précis en utilisant un système inductible permettant l'expression de la Cre recombinase à un moment bien précis. Par exemple, l'un des systèmes souvent utilisés est celui basé sur les propriétés opérateur/répresseur qui régulent l'opéron bactériologique tétracycline (tet) (revue en [183]). Brièvement, la

méthode classique implique l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur minimal contenant l'opérateur tet dont la transactivation dépend de l'ajout ou non de la tétracycline (figure 6, page 31). Parallèlement, un autre promoteur, celui-ci transactivé de manière tissu dépendant, permet l'expression d'une protéine de fusion appelée tTA qui est composée du represseur tet et du domaine de transactivation viral VP16. En l'absence de tétracycline, tTA se lie au promoteur de la Cre recombinase et induit la transcription de la Cre. À l'opposé, l'ajout de la tétracycline libère la protéine du promoteur empêchant ainsi l'expression de la Cre.

### Système tet classique



**Figure 6 : Induction de la Cre recombinase par le système tétracycline(tet) classique.** En absence de tétracycline, la protéine de fusion tTA-VP16 , sous le contrôle d'un promoteur spécifique pour un tissu, se lie à l'opérateur tet et induit l'expression de la Cre recombinase alors qu'en présence de tétracycline la tTA-VP16 est délogée de l'opérateur tet, ce qui empêche la transcription de la Cre (tiré de [176]).

## 1.7 Fonctions des différentes MAP kinases suite à l'analyse du phénotype engendré par l'inactivation du gène chez la souris.

### 1.7.1 ERK1 et ERK2

Les souris nulles ERK1<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles [184]. Cependant, elles présentent un défaut au niveau de la prolifération des cellules T en développement (thymocytes) et au niveau de leur maturation, plus spécifiquement en cellules simples positives CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>. Dans les fibroblastes embryonnaires ERK1<sup>-/-</sup>, la prolifération des cellules stimulées par l'ajout de sérum n'est pas affectée par la perte de ERK1, bien que l'activité ERKs dans ces cellules soit de 50% par rapport à celle des cellules de type sauvage. Ceci est en accord avec le fait que ERK2 est toujours activée dans ces cellules et démontre que ERK2 n'augmente pas afin de compenser la perte de ERK1. Cependant, l'activation de ERK2 est plus soutenue dans les cellules ERK1<sup>-/-</sup> que dans les cellules de type sauvage. Ceci pourrait suggérer que l'intensité du signal est plus important que le signal lui-même et que dans ce cas la stimulation prolongée de ERK2 peut compenser pour la perte de ERK1.

Contrairement aux souris ERK1<sup>-/-</sup>, les souris ERK2<sup>-/-</sup> meurent au cours du développement embryonnaire. Les conclusions tirées par les trois groupes qui ont généré ces souris comportent cependant des différences puisque la mort ne survient pas au même moment au cours du développement. Yao et al. [185], dont les souris meurent au jour 6.5, concluent que le phénotype létal provient de l'incapacité qu'ont les embryons à induire la formation du mésoderme. Cette incapacité découlerait d'un problème au niveau de la différenciation cellulaire plutôt que d'un problème au niveau de la prolifération. Hatano et al. [186], dont les souris meurent au jour 11.5, concluent que le phénotype létal est dû à un défaut au niveau du développement normal du placenta. L'analyse du phénotype laisse suggérer que ERK2 est nécessaire dans les trophoblastes pour la formation du labyrinthe et la vascularisation adéquate du fœtus. Ce résultat est en accord avec la réversion du phénotype chez les souris provenant de l'aggrégation de cellules tétraploïdes de type sauvage (contribuants aux trophoblastes) et de cellules diploïde ERK2<sup>-/-</sup>. Enfin, dans notre laboratoire, Saba et al. [187], dont les souris meurent entre le jour

5.5 et 6.5, concluent que le phénotype létal est dû à un défaut au niveau de la formation de l'ectoderme extraembryonnaire qui génère la partie foetale du placenta ainsi que les cellules trophoblastes géantes. Bien que ces résultats soient différents, les trois études démontrent que ERK2 est essentielle au niveau du développement embryonnaire. Deux d'entre-elles montrent l'implication de ERK2 dans les trophoblastes et le développement du placenta. De plus, ces études ont permis de constater que ERK2 possède certaines fonctions qui ne sont pas redondantes à celles que possède ERK1, puisque ERK1 ne peut compenser pour la perte de ERK2.

### 1.7.2 JNK1, JNK2 et JNK3

Les souris JNK1<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles. Elles démontrent un défaut au niveau de la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices TH1 et TH2. Plus spécifiquement, il a été démontré que les cellules T CD4<sup>+</sup> se différencient préférentiellement en cellules TH2 suite à une stimulation par un antigène et donc que JNK1 est impliquée dans l'inhibition de cette différenciation [109].

Les souris JNK2<sup>-/-</sup> ont été produites par deux groupes et tout comme les souris JNK1<sup>-/-</sup> elles sont viables et fertiles [188, 189]. Les deux groupes concluent que le développement des cellules B et des cellules T est normal. Cependant, leurs conclusions divergent en ce qui a trait à certains phénotypes engendrés par l'absence de JNK2. Sabapathy et al. concluent que les souris présentent un problème général au niveau de l'activation des cellules T ainsi qu'une réponse apoptotique altérée suite à la stimulation par un antigène [189]. Yang et al. concluent plutôt que JNK2 est impliquée au niveau de la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> matures en cellules effectrices TH1 suite à la stimulation par un antigène [188].

Les souris JNK3<sup>-/-</sup> sont aussi viables et fertiles. JNK3 étant exprimée spécifiquement dans le système nerveux, les études de fonction ont donc été portées sur le cerveau. Les analyses ont démontré que suite à un stress neurologique excitotoxique causé par le kainate, les souris JNK3<sup>-/-</sup> ont moins de convulsions que les souris de type sauvage et un taux de survie plus élevé. Ces



souris ont démontré une diminution de l'apoptose ainsi qu'un niveau de phosphorylation plus faible du facteur de transcription c-Jun et AP-1 [40] au niveau de l'hypothalamus. Les auteurs ont donc conclu que JNK3 joue un rôle essentiel en tant que facteur pro apoptotique dans le cerveau.

Les différentes souris nulles ont été utilisées afin de générer des souris doubles nulles. Les souris JNK1/JNK3  $-/-$  ainsi que les souris JNK2/JNK3  $-/-$  sont viables et semblent se développer normalement [190]. Par contre, les souris JNK1/JNK2  $-/-$  montrent un défaut sévère au niveau de la régulation de l'apoptose au cours du développement du cerveau, ce qui entraîne la mort des embryons [190, 191]. Cependant, les deux groupes qui ont généré ces souris ne s'entendent pas sur le rôle de JNK. L'un conclut que JNK joue un rôle essentiel dans l'apoptose [190] alors que l'autre conclut que JNK a un rôle antiapoptotique [191].

JNK1 et JNK2 ont aussi été impliquées au niveau de la prolifération des cellules T et la régulation de la production de IL-2. Cependant, chez les souris doubles nulles, la prolifération et de la production de l'IL-2 est augmentées dans les cellules T, alors que des résultats contraires ont été observés chez les souris JNK1 $-/-$  et les souris JNK2  $-/-$  (revue en [192]). D'autre part, il a été montré que JNK1 et JNK2 ont un effet inverse sur la prolifération des fibroblastes embryonnaires de souris (revue en [193]). Les cellules JNK2 $-/-$  entrent plus rapidement en phase S que les cellules de type sauvage, alors que c'est l'inverse qui se produit dans les cellules JNK1 $-/-$ . Ces dernières présentent un faible défaut de prolifération alors que les fibroblastes JNK2 $-/-$  présente un avantage. L'absence de ces deux JNKs a cependant un effet négatif dramatique sur la prolifération des fibroblastes.

### 1.7.3 p38 $\alpha$

Les souris p38 $\alpha$   $-/-$  meurent au cours du développement embryonnaire principalement en raison d'un défaut au niveau de l'angiogénèse du placenta [194, 195]. Il a aussi été démontré que les embryons ont un myocarde sous-développé

ainsi qu'une formation anormale des vaisseaux sanguins dans la tête, mais ce groupe a conclu que ces anomalies étaient secondaires au défaut du placenta [195].

#### 1.7.4 ERK5

Les souris ERK5<sup>-/-</sup> meurent entre les jours 9.5 et 10.5 du développement embryonnaire en raison d'un défaut au niveau de l'angiogénèse et d'un problème au niveau du développement cardiovasculaire [196-198]. Le défaut au niveau de l'angiogénèse touche le placenta ainsi que le cerveau. Au niveau du développement du cœur la membrane du myocarde est sous-développée et les trabeculaes sont désorganisées. Les souris ERK5<sup>-/-</sup> conditionnelles ont été générées par l'inactivation du gène suite à l'induction du transgène Mx1-Cre dans les souris adultes âgées de 8 semaines. L'inactivation conditionnelle a démontré que les souris meurent quatre semaines suivant l'induction en raison d'un défaut au niveau de l'intégrité des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, engendrant d'importantes hémorragies [199].

#### 1.7.5 ERK3

Les souris ERK3<sup>-/-</sup> ont été générées récemment dans notre laboratoire par Turgeon et al.. Les souris ERK3<sup>-/-</sup> sont non viables et meurent peu après la naissance. Suite aux différentes analyses effectuées jusqu'à maintenant, le phénotype létal semblerait dû à un défaut au niveau du développement du poumon empêchant ainsi les souris de respirer.

## 2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

ERK4 est une MAP kinase atypique qui a été identifiée il y a plus d'une dizaine d'années. Cependant, cette kinase reste jusqu'à maintenant très peu caractérisée, principalement parce qu'aucun substrat ni kinase activatrice n'ont été identifiés jusqu'à maintenant. Dans notre laboratoire, nous avons démontré que la sérine 186 (SEG), présente dans la boucle d'activation, est phosphorylée *in vivo* dans les cellules en phase exponentielle de croissance. Nous avons aussi démontré, que contrairement à ERK3, ERK4 est une protéine stable et que la surexpression de ERK4 n'entraîne pas l'arrêt de la prolifération en phase exponentielle dans les cellules. Jusqu'à maintenant, la caractérisation des MAP kinases classiques a permis de démontrer que ces protéines sont indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Elles sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation qui contrôlent des réponses cellulaires comme la croissance, la prolifération et la différenciation, la réponse au stress et l'apoptose. Par conséquent, il est important de définir la fonction de la MAP kinase atypique ERK4 et son degré d'implication dans ces différents processus.

Puisque nous disposons de peu d'information sur ERK4, il peut donc s'avérer laborieux d'effectuer une étude de fonction via l'utilisation aléatoire d'approches biochimiques. Par conséquent, afin d'étudier la fonction de cette protéine, nous avons choisi d'utiliser une approche génétique, soit l'inactivation du gène *Mapk4* (ERK4) murin. Cette approche nous permettra d'analyser le phénotype engendré par l'absence de la protéine et ce dans un contexte physiologique. Notre objectif est donc dans un premier temps de générer des souris nulles ERK4<sup>-/-</sup>. Pour ce faire, nous avons d'abord établi une stratégie d'inactivation, généré un vecteur de ciblage et ciblé le gène *Mapk4* afin d'inactiver ce dernier dans les cellules souches embryonnaires murines (ES). Ces cellules souches ont par la suite été utilisées afin de générer des souris chimériques. Les souris chimériques capables de transmettre la mutation seront ensuite utilisées afin de générer des souris hétérozygotes ERK4<sup>+/-</sup>, qui lorsque croisées entre elles vont générer des souris nulles (ERK4<sup>-/-</sup>) dont les deux allèles du locus *Mapk4* seront inactivés.

### 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1 Matériel

Les amorces pour les PCRs («polymerase chain reaction») ont été synthétisées par Invitrogen. Les enzymes de restriction, et la Taq polymérase ont été achetées chez Invitrogen. La PFU turbo polymérase a été achetée chez Stratagene. Le milieu de culture DMEM+ («Dulbecco's modified eagle medium high glucose») pour les MEFs («mouse embryonic fibroblast») ainsi que pour les cellules souches de souris Sv129, la L-glutamine, la péniciline et la streptomycine, le sodium pyruvate, les acides aminés nonessentiels, la trypsin 2,5%, le HBSS («Hank's balanced buffer solution»), le PBS («phosphate buffered saline»), le FBS («fetal bovine serum»), le G418 (Geneticin) et le LIF («Leukemia inhibitory factor») ont été achetés chez Invitrogen. Le B-mercaptoéthanol a été acheté chez Sigma. Le DMSO («diméthylsulfoxyde») a été acheté chez Anachemia. Le milieu de culture MEM («modified eagle medium») pour les cellules HEK293 a été acheté chez Invitrogen. Les membranes de nylon Hybond-N ont été achetées chez Amersham. Tous les autres produits utilisés respectent les normes de qualité standard de laboratoire. L'analyse des séquences nucléotidiques a été effectuée avec le programme Sequencher. La traduction des différentes séquences nucléotidiques a été effectuée avec le programme TRANSEQ. L'analyse des séquences protéiques a été effectuée avec le programme CLUSTAL W. Ces deux derniers programmes sont disponibles sur le site EMBL EBI (<http://www.ebi.ac.uk/services/>).

#### 3.2 Méthodes

##### 3.2.1 Radiomarquage des sondes d'ADN

Les sondes d'ADN ont été radiomarquées avec du [ $\alpha^{32}$ ]dCTP et le système de marquage aléatoire d'oligonucléotides selon les instructions du manufacturier (Amersham).

### 3.2.2 Criblage de la banque d'ADN génomique de phage $\lambda$ GEM12 de souris Sv 129

Les bactéries LE392 ont été utilisées pour l'amplification et le criblage de la banque d'ADN génomique de souris Sv129 dans les phages  $\lambda$ GEM12. Les deux premiers tours de criblage ont été effectués en milieu de culture liquide. La présence de l'exon 2 dans les différentes populations a été révélée par PCR en utilisant la Taq DNA polymérase: dénaturation 94°C 30 s, liaison des amorces 60°C 30 s, élongation 72°C 1min pour 40 cycles. Les amorces utilisées sont dérivées de l'exon 2 du gène *Mapk4* murin (5'-TGC AGG TAA CAA CAA CCT TAG CAG CAT CCG-3'(sens) et 5'-GTC AAT GAA GCG CCC ACC AGG GTC ATA CCC-3'(anti-sens). Les tours de criblage subséquents ont été effectués sur pétris de 10cm, en milieu de culture solide.

Les plages de lyse présentes sur les différentes plaques ont été transférées sur membrane Hybond-N et hybridées avec une sonde génomique de 0.3 kb radiomarquée au  $P^{32}$  dérivée de l'exon 2 du gène *Mapk4* murin. L'hybridation a été faite dans un tampon d'hybridation (5X SSC (SSC est 0.15 M NaCl / 0.015 M sodium citrate) / 0.1% SDS / 5X solution de Denhardt's (Denhardt's est 0.02% Ficoll 400 / 0.02% polyvinyl pyrrolidone / 0.002% BSA) / 50% formamide / 100  $\mu$ g/ml d'ADN de saumon simple brin) avec la sonde radiomarquée ( $1 \times 10^6$  c.p.m./ml) pour 16 heures à 42° C. Les membranes ont été lavées à une stringence finale de 0.1% SSC / 0.1% SDS à 60° C et analysées par autoradiographie. Les clones positifs ont été purifiés sur plaques puis caractérisés par PCR dans les mêmes conditions que mentionné plus haut, afin de déterminer la présence de fragment flanquant en 5' et en 3' de l'exon 2 d'une longueur minimale de 4 kb. Les amorces utilisées ont été dérivées des régions introniques en 5' et en 3' de l'exon 2 à partir du gène *Mapk4* murin (région 5'; 5'-GGT TTT ACC TGG CAC TGT-3' (sens) et 5'-CTC AGA ACT CCG GTG AGT-3' (anti-sens), région 3': 5'-GCC CAA GGA GAT GTC ATG 3' (sens) et 5'-TTG AGC CTT GCC CAC TCT-3'). Le clone positif a été amplifié en milieu liquide puis purifié.

### 3.2.3 Construction du vecteur de ciblage (Se référer à la figure 11, page 48 dans la section 4.3.2 des résultats)

Deux gènes rapporteurs ont été utilisés dans la construction du vecteur de ciblage, soit le gène exprimant la RFP («red fluorescent protein») et le gène exprimant la GFP («green fluorescent protein»). Dans un premier temps, le site de multiclonaage (MSC) du plasmid pDsRed2-C1 et du plasmid pEGFP-C2 ont été enlevés en digérant par *Bgl*II et *Bam*HI. La RFP a été amplifiée par PCR dans les mêmes conditions que mentionné plus haut en utilisant la Pfu polymérase et les amorces 5'-CCG CTC GAG CGG CCG CAT AAC CGT ATT ACC GCC ATG C-3' (sens) contenant les sites de digestion *Xho*I et *Not*I et 5'-CCG GAA TTC GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG C-3' (anti-sens) contenant le site de digestion *Eco*RI. La GFP a été amplifiée dans les mêmes conditions avec les amorces 5'-CCG GAA TTC CAC CAT GGT GAG CAA G-3' (sens) contenant le site de digestion *Eco*RI et 5'-CCG GGA TCC CGT CGA CCA CAA CTA GAA TGC AG-3' (anti-sens) contenant les sites de digestion *Sa*I et *Bam*HI. Les fragments recombinants en 5' et en 3' ont été amplifiés dans les mêmes conditions que mentionné plus haut à partir du clone positif comprenant l'exon 2 du gène *Mapk4*. Un fragment de 3.5 kb comprenant la partie intronique en 5' de l'exon 2 et la partie non codante de l'exon 2 jusqu'au codon ATG, marquant le début de la traduction de la protéine ERK4, a été amplifié avec les amorces 5'-CCG GAA TTC CTT CAA GAA ACT CCA GCT C-3' (sens) et 5'-CCG GAA TTC TCA GCC ATT GTT GCC TCA G-3' (antisens) contenant tous deux le site de digestion *Eco*RI. Un fragment de 2.4 kb comprenant le début de la région intronique en 3' de l'exon 2 a été amplifié avec les amorces 5'-CGG ACT AGT GGG TGT CTT CAT CAT CCT CTC-3' (sens) et 5'-CGG ACT AGT CCT ACT AAG AGG AGT GGC AG-3' (antisens) contenant tous deux le site de digestion *Spe*I. L'amplification des séquences recombinantes a ainsi permis de d'enlever la partie codante de l'exon 2 du gène *Mapk4*.

Les différents fragments ont été sous clonés dans pBluscript. De part et d'autre des séquences du gène *Mapk4* recombinantes, la GFP a été insérée en phase avec l'ATG de la protéine endogène (ERK4), venant ainsi remplacer la partie de l'exon 2 codant pour les acides aminés 3 à 182 de ERK4. La cassette de résistance à la Neomycine, flanquée de deux sites *loxP*, a été insérée en 3' de la

GFP. La RFP a été insérée en 5' en dehors de la séquence de ciblage. La construction a été linéarisée en digérant *NotI*, résolue par électrophorèse sur gel d'agarose (low melting point) 0.8 % (w/v) et purifiée par électroélution.

#### 3.2.4 Culture des cellules souches (ES) Sv 129 de souris

Les MEFs («mouse embryonic fibroblast») ont été préalablement cultivées dans un milieu de culture DMEM+, 10 % FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ES ont été cultivées sur une couche de cellules nourricières composée de MEFs résistantes à la néomycine adhérentes sur de la gélatine puis les cellules ont été irradiées à 4000 RAD. Les cellules ES ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM+, 20 % FBS (inactivé à la chaleur), 2 mM L-glutamine, 0.1 mM acides aminés non essentiels, 1 mM sodium pyruvate, 85 µM β-mercaptoéthanol, 1410 U/mL de LIF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un environnement humidifié composé de 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.5 Électroporation des cellules ES et sélection

Le vecteur de ciblage (25 µg) a été électroporé dans 1 X 10<sup>7</sup> cellules ES en suspension à 950 µF et 225 V avec un appareil Bio-Rad gene pulser Xcell, puis les cellules ont été déposées sur les MEFs. Le lendemain, les cellules ont été mises en sélection dans un milieu de culture contenant 300 µg/ml de G418. Après 7 à 8 jours de sélection, les clones résistants au G418 ont été piqués dans les puits, préalablement rincés avec une solution de HBSS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine puis les clones ont été trypsinisés (PBS / 0.5 mM EDTA / 0.2 % trypsin) et ensemencés individuellement sur des MEFs irradiés dans des plaques 96 puits. Après 3 jours de culture, les clones ont été trypsinisés (PBS / 0.5 mM EDTA / trypsin 0.1%) puis ensemencés en duplicata. Un des duplicata a été ensemencé sur des MEFs irradiés puis les clones ont été congelés dans un milieu de congélation (60 % DMEM+ / 20 % FBS/ 20 % DMSO).

L'autre duplicata a été ensemencé directement sur la gélatine puis les clones ont été cultivés jusqu'à confluence. À confluence, les cellules ont été lysées dans

50µl de solution de lyse (TPA (10 mM Tris pH8/2 mM EDTA, 400 mM NaCl) / 0.5% SDS / 700 µg/ml de protéinase K). L'ADN a été précipité à l'éthanol 100 % froid.

### 3.2.6 Criblage des clones par Southern blot

L'ADN des différents clones a été digéré puis résolu sur gel 0.8 % (p/v) et transféré sur membrane de nylon Hybond-N. La membrane a été hybridée avec une sonde radiomarquée au P<sup>32</sup>. La première sonde utilisée (se référer à la figure 10, page 47 dans la section 4.3.1 des résultats) a été amplifiée à partir de la région intronique du gène *Mapk4* murin en 5' à l'extérieur de la séquence utilisée pour la recombinaison homologue. La deuxième sonde utilisée (se référer à la figure 15, page 52 dans la section 4.3.3 des résultats) a été fabriquée à partir du gène *Neor*. L'hybridation et les lavages ont été effectués tel que décrit plus haut puis la membrane a été analysée par autoradiographie.

### 3.2.7 Expression de la construction dans les HEK 293

Les cellules HEK 293 ont été cultivées dans un milieu de culture MEM («modified eagle medium»), 10 % FBS, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine à 37°C dans un environnement humidifié composé de 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules (pétri de 60 mm) ont été transfectées avec 6 µg de la construction du vecteur de ciblage par co-précipitation au calcium phosphate. Après deux jours de culture, l'expression de la RFP et de la GFP a été détectée à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence.

### 3.2.8 Séquençage du cDNA de ERK4

Le cDNA de ERK4 humain a été donné par le Dr. Roger J. Davis. Deux régions du cDNA de ERK4 ont été séquencées par le centre de séquençage du CHUM (centre hospitalier de l'Université de Montréal). Les amorces utilisés sont ; région 1 : 5'- AAC CAG AGC CAG CTG TCC A-3' (sens) et 5'-GTA GTC GGC CTC GAA GGC-3' (antisens), région 2 : 5'-AAG CAG GCG GCC GGC G-3' (sens) et 5'-CGG CAG GTC CTC GGG CT-3' (antisens)).

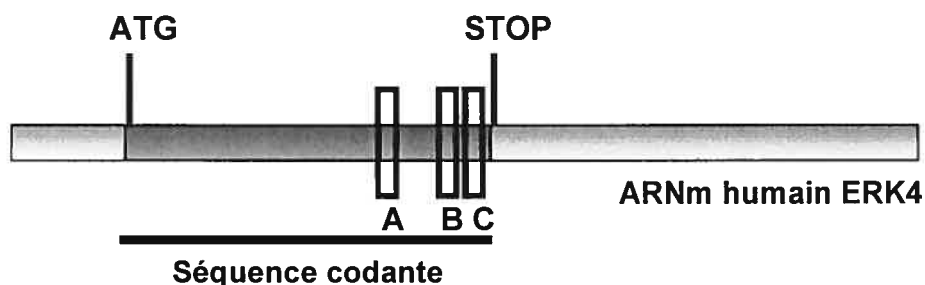


## 4. RÉSULTATS

### 4.1 Séquence révisée de ERK4 humain

Lorsque nous avons élaboré notre stratégie d'inactivation nous avons préalablement analysé les séquences de cDNA et protéique de ERK4 décrites dans la littérature et les banques de données. En comparant la séquence protéique de ERK4 humain, déduite à partir du cDNA humain cloné par Gonzalez et al. (NCBI : NM002747), avec la séquence protéique déduite à partir du cDNA de souris (NCBI : BC058942), nous avons remarqué que les extrémités C-terminales de ces deux protéines étaient divergentes et que la protéine murine possédait une extension C-terminale d'environ 30 acides aminés. Nous avons par la suite comparé la séquence du cDNA humain (NCBI : NM002747) avec la séquence nucléotidique du gène *MAPK4* humain (NCBI : 5596) afin de vérifier si ces deux séquences étaient divergentes. Suite à cette analyse, trois régions sont différentes au niveau de la séquence nucléotidique.

Afin de vérifier dans un premier temps si ces différences découlaient d'une erreur de séquençage, nous avons séquencé à nouveau le cDNA de ERK4 humain cloné par Gonzalez et al. [145]. L'analyse de la séquence expérimentale de ERK4 a permis de démontrer qu'effectivement trois régions comportaient des erreurs de séquençage (figure 7, page 43). Ainsi, dans la séquence du cDNA cloné par Gonzalez et al., 5 nucléotides au total ont été omis. Dans la première région (figure 7A, page 43) les nucléotides CG et C ont été omis, tandis qu'un nucléotide G a été omis dans les deuxième et troisième régions (figure 7B et C, page 43). Ces nucléotides sont d'ailleurs tous présents sur la séquence nucléotidique du gène *MAPK4* humain. L'ajout de ces nucléotides amène un changement au niveau du cadre de lecture de l'ARNm. La séquence protéique déduite à partir de la séquence de l'ARNm corrigé se traduit par une protéine plus longue, soit de 587 acides aminés, dont l'identité protéique est maintenant de 94% par rapport à son homologue murin (NCBI: AAH58942)(figure 8, page 44).



A

|                 |       |  |       |
|-----------------|-------|--|-------|
| ERK4 Davis      | 1140- | GACCCGCGCG--GGTTCGGCGC-ACTGGCTGAGGACGTGCAGGTGGACCCGCGCAAGGAC | -1197 |
| ERK4 génomique  |       | GACCCGCGCGCGGGTTCGGCGCCACTGGCTGAGGACGTGCAGGTGGACCCGCGCAAGGAC |       |
| ERK4 reséquéncé |       | GACCCGCGCGCGGGTTCGGCGCCACTGGCTGAGGACGTGCAGGTGGACCCGCGCAAGGAC |       |

B

|                 |       |   |       |
|-----------------|-------|---|-------|
| ERK4 Davis      | 1497- | CAGGGCG-CCCAGAGCACGCCAGCCCGCCCGCGACGCCCGAGCGCCGCTTGTCTGCC | -1556 |
| ERK4 génomique  |       | CAGGGCGGCCAGAGCACGCCAGCCCGCCCGCGACGCCCGAGCGCCGCTTGTCTGCC  |       |
| ERK4 reséquéncé |       | CAGGGCGGCCAGAGCACGCCAGCCCGCCCGCGACGCCCGAGCGCCGCTTGTCTGCC  |       |

C

|                 |       |   |       |
|-----------------|-------|---|-------|
| ERK4 Davis      | 1556- | TCGCCCCCG-CGCCCCGCCCCCGGTGGACGGCGCGCCAGCCCCAGTTCGACCTGGAC | -1615 |
| ERK4 génomique  |       | TCGCCCCCGGCCCGCCCCCGGTGGACGGCGCGCCAGCCCCAGTTCGACCTGGAC    |       |
| ERK4 reséquéncé |       | TCGCCCCCGGCCCGCCCCCGGTGGACGGCGCGCCAGCCCCAGTTCGACCTGGAC    |       |

Figure 7 : Séquence révisée du cDNA de ERK4 humain. Aligement du cDNA cloné par Gonzalez et al., séquence nucléotidique du gène *MAPK4* et du cDNA de Gonzalez et al. reséquéncé. Trois régions comportent des divergences : A) omission de trois nucléotide, soit CG et C, B) et C) omission d'un nucléotide, soit un G. Les séquences ont été alignées avec le programme clustal W. Les nucléotides identiques ont été ombragés.

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| ERK4 souris | <b>MAEKGDCIASVYGYDLGGRFIDFQPLGFGVHGLVLSATDSRACRIVAVKKIIVLSDARSMK</b>  | 60  |
| ERK4 humain | <b>MAEKGDCIASVYGYDLGGRFVDFQPLGFGVHGLVLSAVDSRACRIVAVKKIIVLSDARSMK</b>  | 60  |
| ERK4 souris | <b>HALREIKIIRRELDHDMIVKVVYVVLGPIGSDIQGELFKFSVAYIVQEYMETDLACLLEQGT</b> | 120 |
| ERK4 humain | <b>HALREIKIIRRELDHDMIVKVVYVVLGPIGTDIQGELFKFSVAYIVQEYMETDLAFLLEQGT</b> | 120 |
| ERK4 souris | <b>LTEDHAKLFNVQLIRGLKYIHSANVLRDLKPAWTFISTEDLVLLIGDFGLARIVDQHYS</b>    | 180 |
| ERK4 humain | <b>LAEERAKLFNVQLIRGLKYIHSANVLRDLKPAWTFISTEDLVLLIGDFGLARIVDQHYS</b>    | 180 |
| ERK4 souris | <b>HKGYLSEGLVTKNYRSPRLLISPNHYTKAIDHWAAAGCILAEMLYGKMLFAGAEHELEQMQL</b> | 240 |
| ERK4 humain | <b>HKGYLSEGLVTKNYRSPRLLISPNHYTKAIDHWAAAGCILAEMLYGKMLFAGAEHELEQMQL</b> | 240 |
| ERK4 souris | <b>IIDTIPVVREEDKEELLRVHPSFVSSWEVWRPLRKLIPVNSEAIDFLEKILTFVNPDR</b>     | 300 |
| ERK4 humain | <b>ILETIPVIREEDKDELLRVHPSFVSSWEVWRPLRKLIPVNSEAIDFLEKILTFVNPDR</b>     | 300 |
| ERK4 souris | <b>LTAENGLQHPYMSPYSCPEDEPTSQHPFRIEDEIDDTIVMAASQSQLSHWD---RYPVS</b>    | 356 |
| ERK4 humain | <b>LTAENGLQHPYMSPYSCPEDEPTSQHPFRIEDEIDDTIVMAAASQSQLSHWDTCSSRYPV</b>   | 360 |
| ERK4 souris | <b>LSSDLEWRPDRCDQDASEVQRDPRAGSIPLAEDVQVDPRIKDSOSSSERFLEQSHSSHERAF</b> | 416 |
| ERK4 humain | <b>LSSDLEWRPDRCDQDASEVQRDPRAGSIPLAEDVQVDPRIKDSOSSSERFLEQSHSSHERAF</b> | 420 |
| ERK4 souris | <b>EADYGRSCDYKVGSPSYLDKLLWRDNKPHHYSEPKLIIDLSHWKQAASAPPRAAVAADPV</b>   | 476 |
| ERK4 humain | <b>EADYGRSCDYKVGSPSYLDKLLWRDNKPHHYSEPKLIIDLSHWKQAAGAPPTATGLADTG</b>   | 480 |
| ERK4 souris | <b>SREDEPASLFLERIAQWVKSTQGGSERASPPDAPEPRISASPPGHPTPIDGGASPPQFDLD</b>  | 536 |
| ERK4 humain | <b>AREDEPASLFLERIAQWVKSTQGGPEHASPPADDPERISASPPGRPAPVBDGGASPPQFDLD</b> | 540 |
| ERK4 souris | <b>VFISRALKIKCTKPEDLPENKIGDLNGACISHPGDLVQTEAFSEERW</b>                | 583 |
| ERK4 humain | <b>VFISRALKIKCTKPEDLPENKIGDLNGACIPEHPGDLVQTEAFSEERW</b>               | 587 |

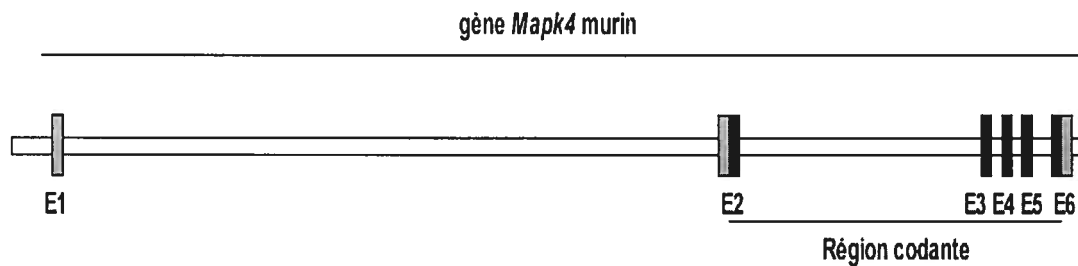
**Figure 8 : Séquence révisée de la protéine ERK4 humaine.** Alignement protéique de ERK4 humain (séquence déduite à partir de l'ARNm corrigé) et de ERK4 de souris. ERK4 humain est une protéine de 587 acides aminés avec 94% d'identité protéique par rapport à son homologue murin. Les séquences ont été alignées avec le programme clustal W. Les acides aminés identiques ont été ombragés.

#### 4.2 Le gène *Mapk4* (ERK4) murin contient 6 exons répartis sur 140 kb

L'analyse du gène *Mapk4* à partir du logiciel « MAP viewer » du NCBI ainsi qu'avec la banque de données «UCSC» démontre que le gène *MAPK4* humain possède 5 exons alors que le gène *Mapk4* murin en possède 6 . Par conséquent, afin de définir notre stratégie d'inactivation génique, nous nous sommes assurés de l'exactitude de la structure du gène *Mapk4* murin. Pour ce faire nous avons analysé les différents cDNAs identifiés chez la souris. À partir des banques de données (NCBI), deux cDNAs ont été sélectionnés, soit BC058942 et NM17632. L'alignement de ces deux cDNAs a montré dans un premier temps que le clone NM17632 possède un nucléotide en moins au niveau de la région codante par rapport au clone BC058942. Nous avons donc analysé les séquences protéiques déduites à partir de ces deux cDNAs. Nous avons d'abord analysé la protéine de ERK4 de souris retrouvée sur NCBI (NCBI: AAH58942) déduite à partir du clone BC058942. Cette protéine possède 583 acides aminés et tel que mentionné, une identité protéique de 94% par rapport à son homologue humain. Par contre, la protéine déduite à partir du clone NM17632 à l'aide du programme «Transeq », possède 478 acides aminés et une extrémité C-terminale très divergente par rapport à la protéine ERK4 AAH58942. Nous avons ensuite vérifié si le nucléotide absent de la séquence du cDNA NM17632 et présent dans la séquence du cDNA BC058942 se trouvait dans la séquence du gène *Mapk4* murin (MGI: 2444559). Nous avons constaté que ce nucléotide est effectivement présent dans la séquence génomique. L'ajout de ce nucléotide à la séquence du cDNA NM17632 rétablit le cadre de lecture, le rendant maintenant parallèle à celui du clone BC058942.

L'alignement de ces deux cDNAs démontre dans un deuxième temps que le clone NM17632 possède une extension 5' non codante qui n'est pas présente sur le clone BC058942. Nous avons donc recherché dans les banques ESTs («expressed sequence tags ») la présence de cette séquence afin de s'assurer que celle-ci soit présente dans l'ARNm de ERK4. Suite à notre analyse, plusieurs clones ESTs ont été identifiés. Considérant cette séquence comme faisant partie de l'ARNm de ERK4, nous avons construit un cDNA putatif à partir du clone BC058942 et du clone NM17632. L'alignement de ce cDNA avec la séquence du gène *Mapk4* murin ainsi

que la délimitation des régions introniques et exoniques a permis de démontrer que la structure du gène *Mapk4* murin comprend un total de 6 exons, répartis sur 140 kb. L'exon 1, une partie de l'exon 2 ainsi qu'une partie de l'exon 6 sont des séquences non codantes (5' et 3' UTR) (figure 9, page 46).

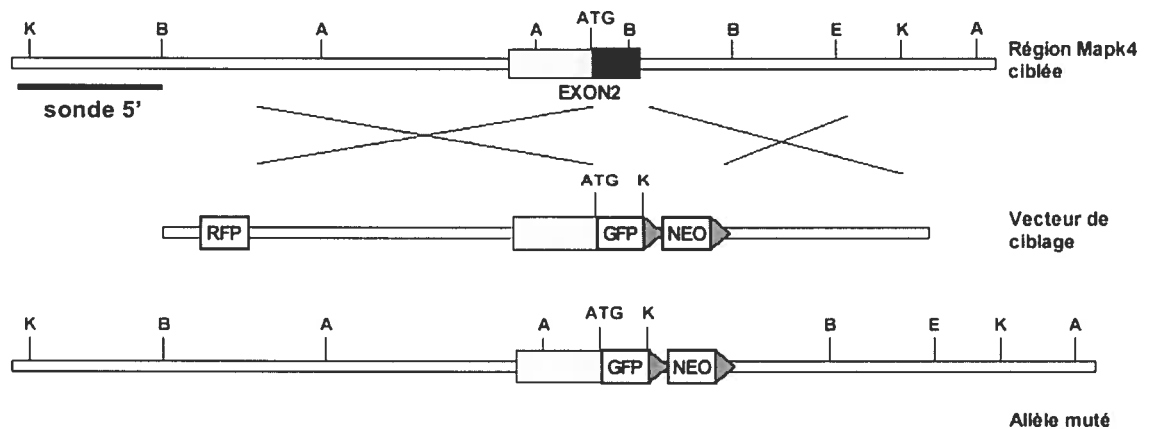


**Figure 9 : Structure du gène *Mapk4* murin.** Le gène *Mapk4* murin possède un total de 6 exons répartis sur 140 kb. L'exon 1, une partie de l'exon 2 ainsi qu'une partie de l'exon 6 sont des séquences non codantes. Ces régions sont identifiées en gris.

#### 4.3 Inactivation du gène *Mapk4* murin

##### 4.3.1 Stratégie de délétion

L'approche choisie afin d'inactiver le gène *Mapk4* murin consiste à enlever la partie codante de l'exon 2 (figure 10, page 47). Cette délétion se traduit par la perte des acides aminés 3 à 182 au niveau de la séquence protéique de ERK4. En outre, la stratégie utilisée consiste à insérer un gène rapporteur en phase avec l'ATG de la protéine endogène. Dans notre cas le gène rapporteur choisi code pour une protéine fluorescente, soit la GFP («green fluorescent protein»). L'insertion de ce gène permettra non seulement d'empêcher l'expression de la protéine endogène mais également de suivre le profil d'expression spatio-temporel du gène *Mapk4*.



**Figure 10 : Stratégie de délétion du gène *Mapk4* murin.** Inactivation du gène *Mapk4* via la délétion de la région codante de l'exon 2 et l'insertion du gène rapporteur de la GFP. Suite à la recombinaison homologue du vecteur de ciblage, le locus *Mapk* sera composé de l'allèle muté.

#### 4.3.2 Construction du vecteur de ciblage

Afin de cibler le locus *Mapk4* murin, la première étape consiste à générer un vecteur de ciblage (figure 11, page 48). Ce vecteur est composé principalement de deux séquences recombinantes dérivées de la séquence du gène *Mapk4* et du gène rapporteur de la GFP. Il contient aussi un marqueur de sélection positif. Le marqueur utilisé est le gène de résistance à la Neomycine (*Neo<sup>r</sup>*) flanqué de deux sites *lox P* afin de permettre l'excision de ce gène au moyen de la Cre recombinase. Enfin, nous avons choisi d'utiliser comme marqueur de sélection négatif un autre gène rapporteur dont la présence peut se mesurer par l'expression d'une autre protéine fluorescente, soit la RFP («red fluorescent protein»). La sélection négative est basée sur le principe que les cellules qui vont exprimer la RFP ne seront pas sélectionnées puisque l'expression de cette protéine signifie que la construction a été insérée au hasard dans le génome. Ce gène est par conséquent situé à l'extérieur de la région d'homologie dans le vecteur de ciblage. Enfin, le site unique de digestion KpnI a été inséré à l'intérieur de la construction afin de générer un profil de digestion de restriction qui nous permettra de distinguer l'allèle muté de l'allèle de type sauvage.

Pour la construction du vecteur de ciblage nous avons d'abord criblé une banque d'ADN génomique  $\lambda$ GEM 12 de souris Sv 129 afin d'isoler les clones contenant l'exon 2 du gène *Mapk4*. Un million de clones au total ont été criblés à l'aide d'une sonde dérivée de l'exon 2. Par la suite les différents clones positifs ont été analysés par PCR afin d'identifier le clone dont la séquence comprenait un minimum de 4 kB d'ADN génomique de part et d'autre de l'exon 2. De cette séquence, les fragments nécessaires pour la recombinaison homologue de la construction de ciblage ont été amplifiés par PCR. Les autres fragments du vecteur de ciblage, la GFP et la RFP, ont aussi été amplifiés par PCR. Chacun des fragments comprenant des sites de digestion unique ont été digérés, purifiés puis insérés successivement dans le vecteur de ciblage (figure 11, page 48).

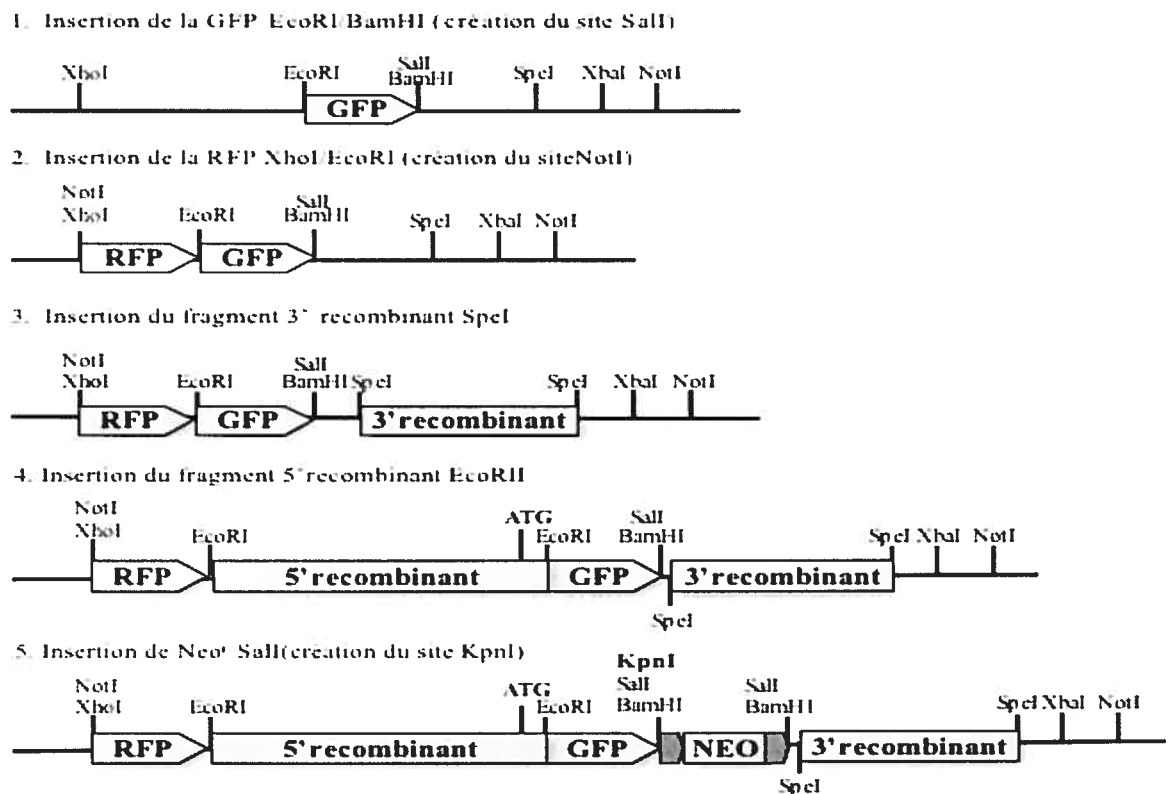
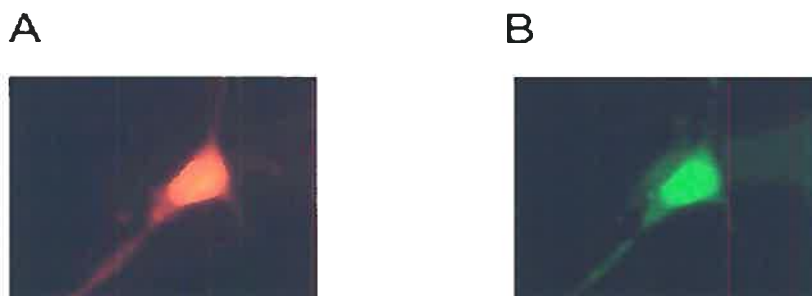


Figure 11: Construction du vecteur de ciblage. Les différents fragments ont été amplifiés par PCR, tel que décrit dans le matériel et méthodes, et sous-clonés successivement dans le vecteur de ciblage. Les fragments recombinants 5' et 3' représentent les séquences génomiques amplifiées à partir du clone isolé suite au criblage de la banque d'ADN  $\lambda$ GEM 12 de souris Sv. Le fragment recombinant en 5' contient l'ATG de ERK4 endogène.

De part et d'autre des séquences du gène *Mapk4* recombinantes (fragments 5' et 3' recombinants), la GFP a été insérée en phase avec l'ATG de la protéine endogène (ERK4). Cette insertion vient remplacer la partie de l'exon 2 codant pour les acides aminés 3 à 182 de ERK4. À chaque étape de clonage, le profil de digestion a été analysé afin de s'assurer que le fragment a été inséré de façon adéquate. Finalement, afin de s'assurer que l'expression de l'ARNm de la GFP respecte le cadre de lecture de l'ARNm de ERK4 endogène, la jonction entre l'exon 2 (extrémité du fragment recombinant 5') et la GFP de la construction de ciblage a été séquencée. Nous avons par la suite vérifié l'expression *in vivo* du gène rapporteur de la RFP présent dans le vecteur de ciblage. Pour ce faire nous avons transfecté la construction telle quelle dans les cellules HEK 293 puisque le gène de la RFP possède son propre promoteur. L'expression de la protéine a été détectée à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence (figure 12A, page 49). De plus, nous avons été en mesure de détecter l'expression de la GFP (figure 12B, page 49). Ceci soulève quelques questions puisque ce gène ne possède pas son propre promoteur et que la séquence en amont de ce gène provient de l'exon 2 et d'une région intronique du gène *Mapk4*.

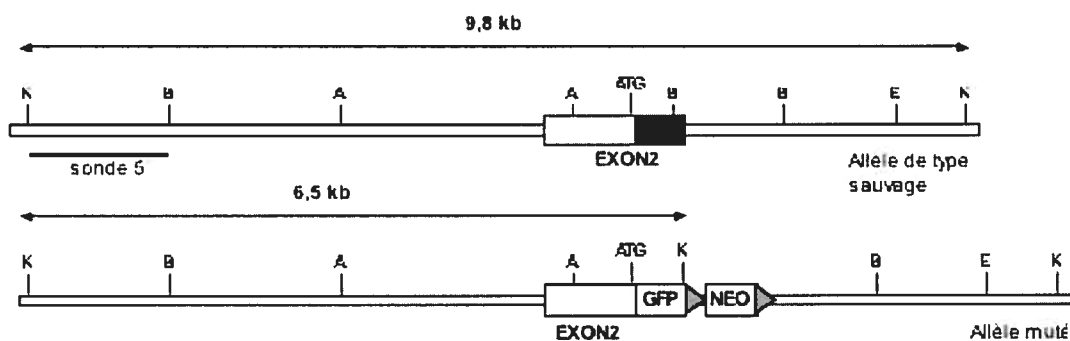


**Figure 12 : Expression de la RFP et de la GFP *in vivo*.** La construction du vecteur de ciblage a été transfectée (6 $\mu$ g) dans les cellules HEK 293 en phase exponentielle. Après 2 jours l'expression de la RFP (A) et de la GFP (B) ont été détectées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence.



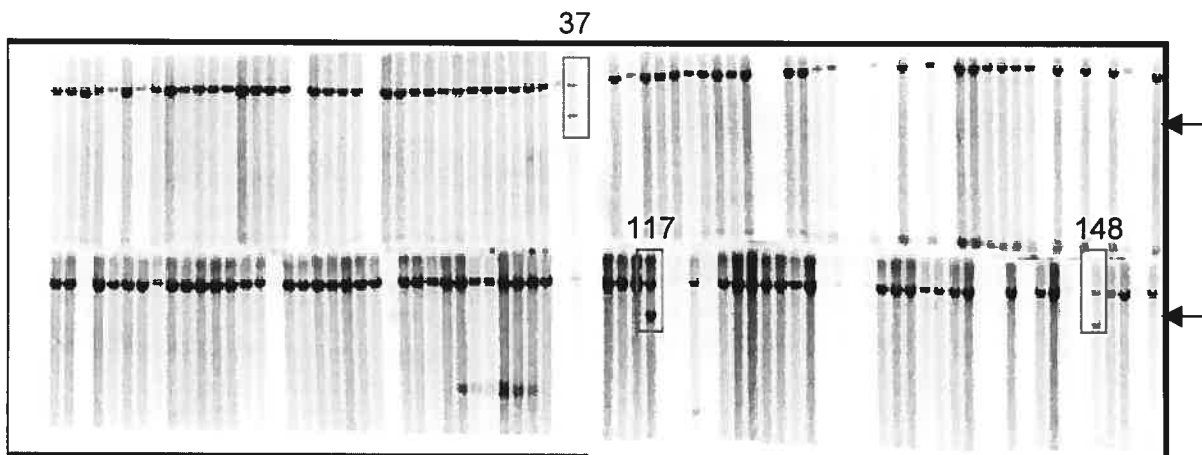
#### 4.3.3 Ciblage du gène *Mapk4* dans les cellules souches (ES) murines

La construction du vecteur de ciblage a été linéarisée puis électroporée dans les cellules ES. Le lendemain, les cellules ont été mises en sélection avec l'antibiotique geneticine (G418). Après 7 à 8 jours de sélection, les clones résistants ont été repiqués. Une fois amplifiés, les différents clones ont été subdivisés afin d'obtenir un duplicata. Un des duplicata a servi au criblage des clones afin d'identifier ceux qui ont incorporé par recombinaison homologue la construction dans leur génome. La stratégie élaborée afin d'identifier les clones possédant l'allèle muté est basée sur le profil de digestion qui est différent de celui de l'ADN génomique de l'allèle de type sauvage. Le site de digestion Kpn1 a été choisi afin de générer des fragments de longueurs différentes permettant ainsi de distinguer la présence des deux allèles selon la migration électrophorétique des fragments. De plus, nous avons tenu compte qu'un des sites de digestion doit être situé à l'extérieur de la région ciblée par la construction de ciblage. Lorsque l'allèle de type sauvage sera digéré, un fragment de 9,8 kb sera généré alors que dans le cas de l'allèle muté ce fragment sera de 6,5 kb, puisque qu'un autre site Kpn1 a été généré suite à l'intégration de la construction de ciblage (figure 13, page 50).



**Figure 13 :** Profil de digestion du locus *Mapk4* pour la détection des fragments par Southern blot. La digestion Kpn1 engendre un fragment de 9,8 kb lorsque l'allèle de type sauvage est présent, alors qu'elle engendre un fragment de 6,5 kb lorsque l'allèle muté a été incorporé au locus *Mapk4*.

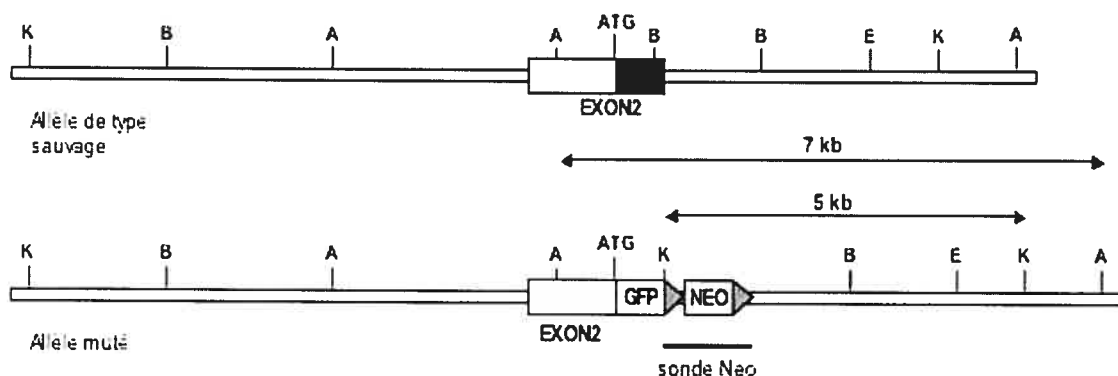
Le criblage des clones a été effectué par Southern blot à l'aide d'une sonde dérivée de la séquence génomique en 5' de l'exon 2 et en amont de la séquence d'homologie retrouvée dans le vecteur de ciblage. Sur les 300 clones analysés, 3 clones positifs ont été obtenus, soit les clones 37, 117 et 148 (figure 14, page 51).



**Figure 14 : Criblage des clones ES par Southern blot.** L'ADN génomique de 300 clones a été digéré KpnI, transféré puis hybridé avec une sonde en 5' de la séquence recombinante. Sur les 300 clones criblés, 3 clones positifs ont été identifiés, soit le clone 37, 117 et 148. Le locus *Mapk4* présente le profil de digestion attendu, soit un fragment de 9,8 kb qui représente l'allèle de type sauvage ainsi qu'un fragment de 6,5 kb qui représente l'allèle muté indiqué par les flèches.

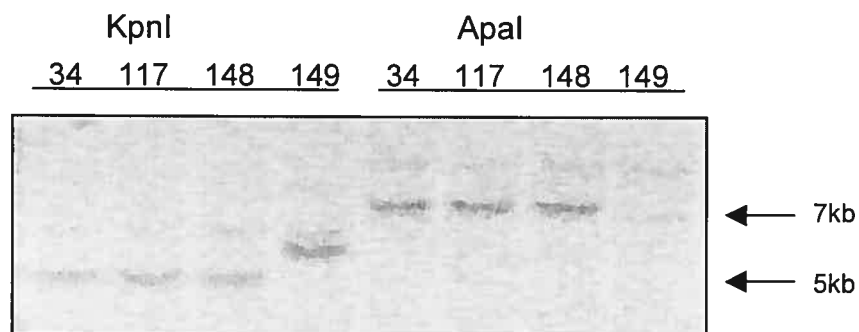
Afin de s'assurer que la construction de ciblage soit insérée uniquement au locus ciblé et qu'il n'y a pas eu d'intégration au hasard dans le génome, nous avons criblé les clones positifs en utilisant une sonde dérivée d'une séquence présente à l'intérieur du vecteur de ciblage. La sonde utilisée est dérivée du gène *Neo<sup>r</sup>*. Ce gène confère une résistance à l'agent de sélection G418 et par conséquent les cellules ES qui ont survécu à la sélection se doivent d'avoir au minimum inséré cette séquence. Ainsi, d'après le profil de digestion de l'allèle muté et en tenant compte qu'un des sites de digestion doit se trouver à l'extérieur de la région ciblée par la construction de ciblage, une digestion KpnI génère un fragment de 5 kb et une digestion Apal génère un fragment de 7 kb (figure 15, page 52). Advenant une intégration au hasard dans le génome, le profil de digestion ne sera pas respecté et des bandes de différentes longueurs seront alors détectées. La présence des

fragments de taille attendue permet aussi de s'assurer que la région 3' de la construction a été insérée intégralement au locus ciblé.



**Figure 15 : Profil de digestion de l'allèle muté du locus *Mapk4* pour la détection des fragments par Southern blot.** La digestion KpnI (K) engendre un fragment de 5,1 kb alors que la digestion ApaI engendre un fragment de 7kb. Le criblage a été réalisé avec une sonde dérivée du gène *Neo<sup>r</sup>*.

Sur les trois clones positifs criblés, aucun ne présente d'intégration au hasard et tous ont intégré la construction de ciblage intégralement dans leur génome (figure 15 , page 52). Le clone 149 a été utilisé à titre de contrôle négatif puisqu'il ne possède pas l'allèle muté et qu'il a démontré une résistance au G418.



**Figure 16 : Criblage des clones ES recombinants par Southern blot.** L'ADN des clones a été digéré KpnI ou ApaI puis hybridé avec une sonde dérivée du gène *Neo<sup>r</sup>*. Les clones positifs 37,117 et 148 ont le profil de digestion attendu, soit un fragment de 5 et 7 kb. Le clone 149 a été utilisé à titre de contrôle négatif.

Le criblage des 300 clones ES a donc permis d' identifier trois clones qui ont incorporé au locus ciblé la construction de ciblage ce qui représente un pourcentage de recombinaison homologue de 1%. Ainsi, notre stratégie d'inactivation s'est avérée fonctionnelle. L'inactivation de gène *Mapk4* murin dans les cellules ES a donc permis de poursuivre l'inactivation du gène chez la souris.

Nous avons par la suite fait analyser le caryotype de deux des trois clones positifs puis fait micro-injecter dans le blastocyste de souris celui qui possédait le meilleur caryotype. De cette micro-injection plusieurs chimères ont été générées (Figure 17, page 53). Bien que nous ne disposons pas encore des souris découlants du croisement de ces chimères, afin de vérifier la transmission de la mutation au niveau germinale, le chimérisme des souris nous indique par contre que le clone ES injecté est en mesure de contribuer aux cellules somatiques. De plus, le degré de chimérisme est généralement une indication de la contribution cellulaire provenant du clone ES injecté. Plus les souris sont chimériques, plus cette contribution est grande et plus il y a de chances que le clone injecté ait contribué aux cellules germinales. En ce sens, les chimères que nous avons obtenues ont un bon potentiel afin de transmettre la mutation du gène *Mapk4*.



**Figure 17 : Chimères obtenues suite à l'injection des cellules ES ERK4+/- de souris Sv 129 dans le blastocyste de mères porteuses CD1. La contribution cellulaire des cellules Sv 129 engendre la coloration du pelage.**

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION

ERK4 est une MAP kinase atypique de la sous famille ERK3 des MAP kinases qui possède une identité protéique de 42% par rapport à ERK1/2 et de 73% par rapport à ERK3 au niveau du domaine kinase. Cependant, tout comme ERK3, la boucle d'activation de cette kinase est caractérisée par la présence du motif SEG au lieu du motif TXY très conservé chez les MAP kinases classiques. De plus, ERK4 possède une extension protéique C-terminale qui n'est pas présente chez les MAP kinases classiques. Malgré le fait que cette kinase ait été identifiée il y a plus d'une dizaine d'années, elle n'a été jusqu'à maintenant que très peu caractérisée. Aucune kinase activatrice ni aucun substrat n'ont été identifiés. De plus, les substrats classiques comme la MBP, utilisés pour mesurer *in vitro* l'activité des MAP kinases classiques, n'ont pas permis de détecter une activité kinase chez ERK4. Dans notre laboratoire, nous avons démontré que la sérine 186 du motif SEG de ERK4 est phosphorylée *in vivo*. Nous effectuerons prochainement des essais d'autophosphorylation *in vitro* afin de démontrer si ERK4 possède une activité phosphotransférase.

Bien que ERK4 possède une grande identité protéique avec ERK3, des travaux préliminaires suggèrent que ERK4 possède des propriétés biochimiques distinctes. Par exemple, nos résultats montrent que ERK4 est une protéine stable alors qu'il a été démontré que la demi-vie de ERK3 est d'environ 30 minutes[151]. De plus, la surexpression de ERK4 ne semble pas affecter la prolifération des cellules en phase exponentielle alors qu'il a été démontré qu'une forme stable de ERK3 inhibe l'entrée des cellules en phase S [151]. Pour ce qui est de la localisation subcellulaire, ERK4 semble principalement cytoplasmique alors que ERK3 est à la fois cytoplasmique et nucléaire [157]. Ces résultats laissent envisager que ERK4 a une fonction cellulaire différente de celle de ERK3. De plus, la délétion du gène *Mapk6* (ERK3) engendre un phénotype létal chez la souris, ce qui démontre que ERK4, du moins dans certaines conditions, ne peut compenser la perte de ERK3.

Puisque nous disposons de peu d'information sur ERK4, il s'avèrait donc laborieux d'effectuer une étude de fonction via l'utilisation aléatoire d'approches biochimiques. Par conséquent, afin d'étudier la fonction physiologique de cette protéine, nous avons choisi d'utiliser une approche génétique, soit l'inactivation du gène *Mapk4* (ERK4) murin. Parallèlement, nous avons analysé la séquence de ERK4 puisque les informations sur cette séquence divergeaient. Nous avons aussi analysé la structure du gène *Mapk4* murin afin de définir une stratégie d'inactivation adéquate.

### 5.1 Séquence révisée de ERK4 humain

La divergence entre la séquence protéique de ERK4 humain et murin ainsi que celle révélée par l'alignement du cDNA cloné par Gonzalez et al. et de la séquence génomique, remettaient en doute l'exactitude de la séquence de ERK4 humain retrouvée dans la littérature. Après avoir séquencé de nouveau le cDNA cloné par Gonzalez et al., nous avons pu mettre en évidence plusieurs erreurs de séquençage attribuables à l'omission de 5 nucléotides au total. Ces nucléotides étaient d'ailleurs tous présents dans la séquence de l'ARNm déduite à partir de la séquence génomique. La présence de ces 5 nucléotides a pour effet de modifier le cadre de lecture prédit initialement. La protéine déduite à partir de cette nouvelle séquence possède donc une extrémité C-terminale plus longue, soit une protéine totalisant 587 acides aminés au lieu de 557. L'identité protéique de ERK4 humain est maintenant de 94% par rapport à son homologue murin. Ainsi, la souris représente donc un excellent modèle afin d'étudier la fonction de ERK4 humain.

Une erreur de séquençage semblable a aussi été rapportée chez le rat pour la séquence du cDNA de ERK3. ERK3 de rat avait été initialement caractérisée comme étant une protéine de 62 kDa [10]. Par contre, les cDNAs de ERK3 humain et murin prédisaient une protéine d'environ 100 kDa [141-143]. Turgeon et al. dans notre laboratoire ont démontré que l'absence d'un seul nucléotide dans la séquence de rat était responsable de cette ambiguïté au niveau de l'identité de ERK3[143]. Par conséquent, afin de s'assurer de l'identité d'une protéine, particulièrement si la

fonction de cette protéine est inconnue, il est important de s'assurer de l'exactitude des séquences de cDNAs clonés.

## 5.2 Le gène *Mapk4* (ERK4) murin contient 6 exons répartis sur 140 kb

Lors de l'analyse du gène *Mapk4* murin, nous avons constaté que la structure de ce gène comportait un exon supplémentaire en amont par rapport à l'exon 1 du gène *MAPK4* humain. Afin de confirmer la structure du gène murin et ce dans le but de définir notre stratégie d'inactivation, nous avons analysé les différents cDNAs murins retrouvés dans les banques de données. Deux cDNAs ont été utilisés afin de construire un cDNA putatif d'une longueur maximale. Suite à l'alignement de ce cDNA avec la séquence du gène *Mapk4*, l'analyse des barrières introns/exons a permis d'établir clairement que le gène *Mapk4* murin comprend 6 exons répartis sur 140 kb dont l'exon 1, une partie de l'exon 2 ainsi que l'exon 6 codent pour des régions non traduites.

L'identification positive d'un exon supplémentaire dans la séquence génomique murine a soulevé la possibilité que cet exon soit aussi présent dans la séquence humaine. Puisqu'un seul cDNA humain a été cloné nous avons tenté d'identifier une séquence similaire à l'exon 1 murin dans les banques humaine de ESTs en criblant ces banques à l'aide de l'exon 1 murin ou encore à l'aide d'une séquence située à l'extrémité 5' du cDNA humain. Cependant, nous n'avons pu identifier aucun clone EST permettant de valider la présence d'un autre exon pour le gène humain. L'utilisation d'approches comparatives en bioinformatique n'a pas permis de confirmer ou d'infirmer la présence d'un sixième exon dans le gène humain.

Nous avons obtenu un autre résultat qui complexifie l'analyse de la structure du gène *Mapk4*. Lorsque nous avons testé par transfection transitoire l'expression de la construction du vecteur de ciblage, nous avons détecté au microscope à fluorescence, en plus de l'expression de la RFP, l'expression de la GFP. Dans cette construction, contrairement au gène de la RFP qui est sous le contrôle d'un promoteur exogène, la séquence en amont du gène de la GFP provient de la région

non codante de l'exon 2 ainsi que d'une région intronique du gène *Mapk4* murin. Par conséquent, ces résultats suggèrent que cette région possède une activité promotrice permettant l'expression de la GFP. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des essais Luciférase, afin de mesurer l'activité promotrice de cette région, et par l'identification du site d'initiation de la transcription.

Depuis quelques années, il a été montré que l'expression de certains gènes, tel que le gène *p18(INK4c)* et *PPAR $\gamma$* , pouvaient être contrôlée par la présence de multiples promoteurs (revue en [200]). Par exemple, le niveau d'expression et l'expression du gène de manière spatio-temporelle peut être contrôlé par l'activité spécifique de différents promoteurs ou encore via la stabilité des différentes formes d'ARNm engendrées [200]. Il est donc possible que le gène *Mapk4* possède plus d'un promoteur afin de réguler son expression. Cependant, tant que le site d'initiation de la transcription ne sera pas identifié expérimentalement ou que la région en amont de l'exon 1 et celle de l'exon 2 ne seront pas caractérisées, cette hypothèse reste très spéculative.

En supposant qu'une région en amont de l'exon 2 possède une activité promotrice et étant donné les doutes raisonnables quant à la présence de l'exon 1 dans la structure du gène *MAPK4* humain, il est possible d'envisager que l'exon 1 que nous avons identifié sur le gène *Mapk4* murin soit en fait une séquence codante appartenant à un autre gène. D'autre part, l'analyse du gène *MAPK6* codant pour ERK3, le paralogue de ERK4, suggère fortement que le gène *MAPK6* et *MAPK4* ont une origine commune découlant probablement de la duplication d'un gène ancestral commun [144]. En ce sens, du point de vue évolutif, la structure du gène *Mapk4* murin, composé de six exons, s'apparente d'avantage à la structure du gène *Mapk6*. En plus de posséder une organisation semblable des frontières exons/introns, dans les deux cas, l'exon 1 est non codant et situé à une distance considérable de l'exon 2, qui comprend le site d'initiation de la traduction protéique (premier ATG).

Quoiqu'il en soit, malgré les doutes qui persistent sur la structure du gène de ERK4, la présence ou l'absence de l'exon 1 n'a pas de répercussion sur le cadre



de lecture de la protéine et donc n'a pas de répercussion au niveau fonctionnel. Ceci s'explique par le fait que l'exon 1 murin est un exon non codant et que le site d'initiation de la traduction est situé dans l'exon 2 présent aussi dans la séquence du gène humain. Par conséquent, la présence ou non de cet exon supplémentaire n'affecte en rien la validité de notre stratégie d'inactivation.

### 5.3 Stratégie d'inactivation et de criblage

Afin de caractériser ERK4 d'avantage et d'étudier la fonction de cette protéine, nous avons opté pour une approche génétique nous permettant d'inactiver le gène chez la souris. Cette approche nous permettra d'analyser le phénotype engendré par cette délétion dans un contexte physiologique chez l'animal. Nous avons choisi d'utiliser la délétion génique classique («knock out») plutôt que la délétion génique conditionnelle puisque celle-ci nous permet d'insérer un gène rapporteur («knock in») afin d'analyser le profil d'expression spatio-temporel du gène *Mapk4*. La stratégie d'inactivation passe donc par la délétion d'une partie de l'exon 2 du gène *Mapk4* et l'insertion d'un gène rapporteur en phase avec l'ATG de la protéine endogène. Dans notre stratégie nous avons choisi d'utiliser le gène de la GFP comme gène rapporteur de l'expression génique au lieu du gène *LacZ* exprimant la B-galactosidase. Principalement, nous avons choisi la GFP afin de pouvoir détecter directement l'expression du gène par microscopie à fluorescence et éviter la coloration X-gal qui nécessite plus de préparation des échantillons. De plus, nous pourrions mesurer par cytométrie en flux, dans diverses conditions, la modulation de l'expression du gène *Mapk4* dans différentes lignées cellulaires dérivées des souris mutantes.

Par exemple, la GFP a été utilisée pour mesurer l'expression du récepteur des glucocorticoïdes durant le développement des thymocytes. Pour ce faire, Brewer et al. ont généré des souris dont le gène du récepteur aux glucocorticoïdes a été remplacé par le gène exprimant une protéine de fusion GFP-récepteur glucocorticoïde (GFP-GR) [201]. Cette méthode s'est avérée efficace pour détecter l'expression génique dans les thymocytes par cytométrie en flux. De plus, cette méthode a permis de visualiser l'expression génique dans les tissus murins

directement en regardant l'expression de la GFP-GR à l'aide d'un microscope à fluorescence. Il a aussi été démontré que la fluorescence est proportionnelle à la quantité de protéines exprimées et que, lorsque l'expression de cette protéine avoisine l'expression de la protéine endogène, il est alors possible de quantifier l'expression protéique dans des cellules dérivées de souris mutantes [202]. Cependant, la GFP a le désavantage d'être moins sensible que la B-galactosidase pour mesurer de faibles taux d'expression génique. Ceci est dû au fait que l'expression de la GFP est proportionnelle à la fluorescence émise, alors que la B-galactosidase possède une activité enzymatique capable d'amplifier le signal d'expression selon la disponibilité du substrat et le temps de coloration.

L'utilisation de protéines fluorescentes comme gènes rapporteurs comporte un autre avantage, soit de pouvoir sélectionner les cellules qui expriment cette protéine. En effet, Gagnetent et al. ont démontré que l'utilisation d'une protéine GFP-Cre exprimée de manière transitoire dans les cellules ES permettait non seulement d'enlever une séquence génomique flanquée de deux sites *loxP*, mais permettait aussi l'isolation rapide et spécifique de cellules ES modifiées au moyen du FACS («fluorescence-activated cell sorting») [203]. Par conséquent, l'utilisation de gènes rapporteurs exprimant des protéines fluorescentes permet de sélectionner, que ce soit au moyen du FACS ou encore par visualisation directe, les cellules qui expriment ce gène. Ceci est d'autant plus important lorsqu'il s'agit d'isoler un petit nombre de cellules au sein d'une même population. Ainsi, puisque l'inactivation d'un gène par recombinaison homologue est un événement peu fréquent dans les cellules ES, cette méthode s'avère très intéressante pour le criblage de cellules ES recombinantes bien qu'il est nécessaire de s'assurer par la suite que les cellules sélectionnées n'expriment pas la protéine à cause d'une insertion au hasard dans le génome. Nous avons donc tenté de développer une stratégie qui nous permettrait d'utiliser cette approche afin de faciliter le criblage des cellules ES ERK4 mutantes.

Notre stratégie d'inactivation comporte l'insertion du gène rapporteur GFP. Cependant, afin d'utiliser ce gène comme marqueur de sélection positif des cellules ES recombinantes, ERK4 doit être exprimée dans ces cellules car l'expression de la

GFP est sous le contrôle du promoteur endogène *Mapk4*. Puisque nous ne disposons d'aucune information quant à l'expression de ERK4 dans les cellules ES, nous avons décidé d'utiliser le gène rapporteur de la RFP, celui-ci sous le contrôle d'un promoteur exogène, soit le promoteur CMV. Pour ne pas interférer avec notre stratégie d'inactivation et dans le but de réduire le nombre de cellules ES recombinant à isoler, nous avons modifier la stratégie de sélection positive de manière à effectuer une sélection négative. Puisque la présence d'un marqueur de sélection négatif reflète l'incorporation de la construction de ciblage au hasard dans le génome des cellules, les cellules exprimants la RFP pourront être discriminées des cellules ES qui possèdent l'allèle correctement ciblé.

Cette stratégie comporte trois avantages majeurs. Le premier avantage est que l'utilisation de ce marqueur, contrairement au marqueur de sélection négatif classique tel le gène HSV-tk, ne nécessite pas que les cellules soient traitées avec un agent de sélection toxique comme le FIAU. Le deuxième avantage est que ce gène rapporteur, puisqu'utilisé comme marqueur de sélection négatif, peut être exprimé sous le contrôle d'un promoteur exogène (CMV) constitutivement actif afin de s'assurer que la protéine est exprimée et donc détectable. Enfin, puisque le marqueur de sélection ne se trouve pas au locus ciblé, le phénotype engendré par la délétion génique n'est pas modifié par la présence d'un promoteur exogène ou l'expression respective de cette protéine.

Lors du criblage des cellules ES recombinantes, nous avons tenté dans un premier temps de détecter directement l'expression de la RFP dans les cellules ES par microscopie. Cependant, nous n'avons pas réussi à détecter cette expression. Bien que l'expression de la RFP soit facilement détectable lorsque la construction de ciblage est transfectée de manière transitoire dans les cellules HEK 293, il est possible que le promoteur CMV soit faiblement ou pas exprimé dans les cellules ES. Une étude sur l'activité de différents promoteurs dans les cellules ES, dont le promoteur CMV, semble appuyer ces résultats [204]. Ceci sera donc pris en considération lors de la construction future de vecteurs de ciblage. Plusieurs types de promoteur dont le promoteur EF («humain polypeptide chain elongation factor

1 $\alpha$  promoter») et le promoteur CBA («chicken  $\beta$ -actin promoter») seront testés pour s'assurer de l'expression de la RFP dans les cellules ES. Il est aussi possible que les conditions de détection que nous avons utilisées ne soient pas optimales pour la détection de la RFP et de la GFP, puisque l'expression de la GFP n'a pas non plus été détectée dans les cellules ES. Cependant, dans le cas de la GFP, tel que mentionné, l'expression de la protéine est sous le contrôle du promoteur de ERK4 endogène. Par conséquent, il est possible que la protéine ne soit pas exprimée dans la mesure où le gène *Mapk4* ne serait pas actif dans les cellules souches murines. Afin d'analyser l'expression du gène *Mapk4* et de vérifier cette hypothèse, nous procéderons prochainement à l'extraction de l'ARNm de différents tissus et types cellulaires, dont les cellules souches, afin de mesurer l'expression par RT-PCR.

Puisque la sélection négative des clones ne nous a pas permis d'optimiser notre méthode de criblage, nous avons utilisé la méthode classique et repiqué un maximum de clones, pour un total de 300. Pour le criblage des clones qui possèdent l'allèle muté nous avons utilisé une sonde en 5' de l'exon 2 dérivée d'une région intronique qui n'est pas présente dans la région d'homologie utilisée pour la construction du vecteur de ciblage. Parallèlement, un site de digestion unique KpnI introduit au locus ciblé, suite à l'intégration de la construction de ciblage, nous permettait d'obtenir un profil de digestion de l'allèle muté différent de celui de l'allèle de type sauvage. L'utilisation d'une sonde à l'extérieur de la séquence de ciblage nous a permis de nous assurer que la mutation a été insérée au bon locus. De plus, cela nous a permis de nous assurer que la région qui comprend la GFP a été insérée dans son intégrité.

Suite au criblage des 300 clones, trois clones positifs ont été identifiés. Afin de s'assurer que la mutation a été intégrée seulement au locus ciblé et qu'il n'y ait pas eu d'autre intégration au hasard dans le génome (ce qui pourrait affecter le phénotype), nous avons criblé les clones positifs avec une sonde dérivée du gène *Neo<sup>r</sup>*, présent uniquement dans la construction de ciblage. Cela nous a permis de confirmer que la construction de ciblage avait été intégrée au bon endroit dans le génome et en une seule copie. En effet, la construction de ciblage n'a pas été

intégrée au hasard dans les clones 37, 117 et 148. De plus, le profil de digestion de ces trois clones a permis de confirmer que la construction de ciblage en 3' du site KpnI a été insérée dans son intégrité. Suite au criblage des 300 clones, nous avons calculé un pourcentage de recombinaison homologue de l'ordre de 1%. Bien que ce pourcentage soit peu élevé (généralement compris entre 1 et 10%), nous pouvons conclure que notre stratégie d'inactivation du gène *Mapk4* dans les cellules ES a fonctionné. En effet, nous avons obtenu trois clones qui démontrent le bon profil d'intégration au locus ciblé. Par conséquent, la première étape afin de générer des souris dont le gène *Mapk4* a été inactivé a été franchie avec succès.

#### 5.4 Suite du projet

Suite à la complétion de la première étape, nous avons entamé la deuxième étape qui consiste à injecter les cellules ES recombinantes dans le blastocyste d'une mère porteuse. Préalablement, le clone positif 148 a été sélectionné et analysé d'avantage afin de s'assurer que le caryotype des cellules souches était normal. Ceci est une mesure de précaution afin de s'assurer que le phénotype observé reflète uniquement l'inactivation génique et non un réarrangement chromosomique comme une trisomie ou une translocation chromosomique. De plus, un caryotype normal est une bonne indication que les cellules ont le potentiel de contribuer aux cellules somatiques et germinales.

Suite à l'injection, nous avons obtenu des souris chimériques que nous avons croisées afin d'obtenir une première population de souris hétérozygotes pour l'allèle ERK4 muté. Récemment, nous avons obtenu les souris et le génotypage de ces souris devrait se faire sous peu. Lorsque nous aurons identifié les souris hétérozygotes nous les croiserons entre elles afin de générer les souris homozygotes dont le gène *Mapk4* aura été inactivé sur les deux allèles. Nous prévoyons donc obtenir les souris nulles ERK4 durant l'été 2005.

Lorsque nous aurons obtenu les souris nulles ERK4, nous allons dans un premier temps déterminer si l'inactivation du gène *Mapk4* entraîne un phénotype létal. Advenant une létalité au niveau embryonnaire, nous déterminerons à quel

moment du développement survient la mort de l'embryon. Ceci nous permettra par la suite de diriger notre étude de fonction par rapport à un stade bien précis du développement. Advenant la survie des souris, nous effectuerons des analyses morphologiques et histologiques comparatives afin de déterminer le phénotype engendré par la délétion. Parallèlement, nous analyserons le profil d'expression spatio-temporel de ERK4 par la détection de la GFP. Ceci nous permettra de cibler les organes et tissus où ERK4 est exprimée et permettra encore d'avantage de diriger l'analyse du phénotype. Nous dériverons aussi à partir des souris nulles diverses lignées cellulaires (MEFs, cellules hématopoïétiques...) afin d'étudier les effets cellulaires de la perte de ERK4, notamment sur la prolifération et la différenciation des cellules.

Advenant le cas où l'inactivation de ERK4 n'entraîne aucun phénotype sévère, il est possible d'envisager que la protéine ne soit pas impliquée au niveau du développement, qu'elle ne soit pas nécessaire à la survie des souris où encore qu'il existe une redondance protéique fonctionnelle capable de palier à l'absence de ERK4. Cette redondance pourrait par exemple être assurée par ERK3, le paralogue de ERK4. Cependant, nos résultats préliminaires semblent indiquer que ces deux protéines se comportent de manière très différente, du moins au niveau de leur stabilité protéique respective et de leur effet sur la prolifération cellulaire. Enfin, les souris nulles ERK3 présentent un phénotype léthal, ce qui implique que ERK4 n'est pas en mesure de compenser pour la perte de ERK3. Malgré ces résultats, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que ces deux protéines soient redondantes, du moins pour certaines fonctions. Il serait aussi intéressant d'étudier le rôle de ces deux protéines en générant des souris doubles hétérozygotes et double «kock out» de ERK3 et ERK4.

En conclusion, nous avons établi une stratégie d'inactivation qui nous a permis d'inactiver le gène *Mapk4* dans les cellules ES. Nous avons délété la région codant pour les acides aminés 3 à 182 de ERK4 et remplacé cette région par le gène de la GFP afin d'analyser l'expression du gène *Mapk4*. Cependant, notre stratégie ne nous a pas permis d'optimiser tel que souhaité la méthode de criblage

des cellules ES mutées. L'identification de clones positifs par Southern blot a permis de sélectionner le clone 148 pour générer les souris mutantes. Ce clone a été utilisé afin de générer des souris chimériques puis une première population de souris potentiellement hétérozygotes pour l'allèle muté. La génération de souris nulles ERK4 s'avérera un outil indispensable pour étudier la fonction de ERK4 ainsi que le profil d'expression spatio-temporel du gène *Mapk4*. Parallèlement, nous proposons une séquence révisée pour la forme humaine de la protéine ERK4. Ainsi, ERK4 est une protéine de 587 a.a et possède une identité protéique de 94% par rapport à son homologue murin.

La caractérisation des MAP kinases classiques jusqu'à ce jour a permis de démontrer que celles-ci sont indispensables au bon fonctionnement de la cellule et de l'organisme entier. Ces enzymes sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation qui contrôlent diverses réponses cellulaires associées à la croissance, la prolifération et la différenciation, la réponse au stress et l'apoptose. Par conséquent, il est important de définir la fonction de la MAP kinase atypique ERK4 et son degré d'implication dans ces différents processus. Ainsi, la génération de souris nulles pour l'allèle ERK4 s'inscrit parfaitement dans cette optique.

## 6. RÉFÉRENCES

1. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
2. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
3. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.
4. Ray, L.B. and T.W. Sturgill, *Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 3753-7.
5. Ahn, N.G. and E.G. Krebs, *Evidence for an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade in Swiss 3T3 cells. Activation of serine peptide kinase activity by myelin basic protein kinases in vitro*. J Biol Chem, 1990. **265**(20): p. 11495-501.
6. Rossomando, A.J., et al., *Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(18): p. 6940-3.
7. Cooper, J.A., et al., *Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins*. Cell, 1982. **31**(1): p. 263-73.
8. Kazlauskas, A. and J.A. Cooper, *Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42*. J Cell Biol, 1988. **106**(4): p. 1395-402.
9. Boulton, T.G., et al., *An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control*. Science, 1990. **249**(4964): p. 64-7.
10. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65**(4): p. 663-75.
11. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17355-63.
12. Pulverer, B.J., et al., *Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 670-4.
13. Hibi, M., et al., *Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain*. Genes Dev, 1993. **7**(11): p. 2135-48.
14. Derijard, B., et al., *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1025-37.
15. Kyriakis, J.M., et al., *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 156-60.
16. Gupta, S., et al., *Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors*. Embo J, 1996. **15**(11): p. 2760-70.
17. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
18. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1027-37.



19. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
20. Jiang, Y., et al., *Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17920-6.
21. Li, Z., et al., *The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **228**(2): p. 334-40.
22. Jiang, Y., et al., *Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30122-8.
23. Courchesne, W.E., R. Kunisawa, and J. Thorner, *A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in S. cerevisiae*. Cell, 1989. **58**(6): p. 1107-19.
24. Elion, E.A., P.L. Grisafi, and G.R. Fink, *FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation*. Cell, 1990. **60**(4): p. 649-64.
25. Herskowitz, I., *MAP kinase pathways in yeast: for mating and more*. Cell, 1995. **80**(2): p. 187-97.
26. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
27. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. Faseb J, 1995. **9**(8): p. 576-96.
28. Knighton, D.R., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*. Science, 1991. **253**(5018): p. 407-14.
29. Canagarajah, B.J., et al., *Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation*. Cell, 1997. **90**(5): p. 859-69.
30. Robinson, M.J., et al., *Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for adenosine 5'-triphosphate*. Biochemistry, 1996. **35**(18): p. 5641-6.
31. Johnson, L.N., M.E. Noble, and D.J. Owen, *Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation*. Cell, 1996. **85**(2): p. 149-58.
32. Robbins, D.J., et al., *Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 5097-106.
33. Mansour, S.J., et al., *Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase*. Science, 1994. **265**(5174): p. 966-70.
34. Tanoue, T., et al., *A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 110-6.
35. Rubinfeld, H., T. Hanoch, and R. Seger, *Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30349-52.
36. Yang, S.H., et al., *The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 710-20.
37. Johnson, T.R., et al., *Regulation of dual-specificity phosphatases M3/6 and hVH5 by phorbol esters. Analysis of a delta-like domain*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 31755-62.
38. Jacobs, D., et al., *Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase*. Genes Dev, 1999. **13**(2): p. 163-75.
39. Galanis, A., S.H. Yang, and A.D. Sharrocks, *Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 965-73.
40. Yang, D.D., et al., *Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene*. Nature, 1997. **389**(6653): p. 865-70.

41. Lechner, C., et al., *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4355-9.
42. Hu, M.C., et al., *Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7095-102.
43. technology, c.s., *MAPK signaling cascades*.
44. Sluss, H.K., et al., *Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8376-84.
45. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.
46. Freshney, N.W., et al., *Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1039-49.
47. Coffey, P.J., et al., *UV activation of receptor tyrosine kinase activity*. Oncogene, 1995. **11**(3): p. 561-9.
48. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades*. Adv Cancer Res, 1998. **74**: p. 49-139.
49. Yao, B., et al., *Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 307-10.
50. Morooka, T. and E. Nishida, *Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24285-8.
51. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Platelet-derived growth factor activates a mammalian Ste20 coupled mitogen-activated protein kinase in airway smooth muscle*. Cell Signal, 1997. **9**(3-4): p. 311-7.
52. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.
53. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 225-36.
54. Natoli, G., et al., *Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway*. Science, 1997. **275**(5297): p. 200-3.
55. Yuasa, T., et al., *Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22681-92.
56. Lomaga, M.A., et al., *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling*. Genes Dev, 1999. **13**(8): p. 1015-24.
57. Yamauchi, J., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27771-7.
58. Shapiro, P.S., et al., *The seven-transmembrane-spanning receptors for endothelin and thrombin cause proliferation of airway smooth muscle cells and activation of the extracellular regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase groups of mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5750-4.
59. Coso, O.A., et al., *The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1137-46.
60. Bagrodia, S., et al., *Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation*. J Biol Chem, 1995. **270**(47): p. 27995-8.

61. Marais, R. and C.J. Marshall, *Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf*. *Cancer Surv*, 1996. **27**: p. 101-25.
62. Bogoyevitch, M.A., C.J. Marshall, and P.H. Sugden, *Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(44): p. 26303-10.
63. Jaiswal, R.K., et al., *The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(10): p. 6944-53.
64. Crews, C.M., A. Alessandrini, and R.L. Erikson, *The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product*. *Science*, 1992. **258**(5081): p. 478-80.
65. Ahn, N.G., R. Seger, and E.G. Krebs, *The mitogen-activated protein kinase activator*. *Curr Opin Cell Biol*, 1992. **4**(6): p. 992-9.
66. Zheng, C.F. and K.L. Guan, *Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(15): p. 11435-9.
67. Yujiri, T., et al., *Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption*. *Science*, 1998. **282**(5395): p. 1911-4.
68. Blank, J.L., et al., *Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(10): p. 5361-8.
69. Seger, R., et al., *Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(20): p. 14373-81.
70. Yamaguchi, K., et al., *Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction*. *Science*, 1995. **270**(5244): p. 2008-11.
71. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. *Science*, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
72. Yan, M., et al., *Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1*. *Nature*, 1994. **372**(6508): p. 798-800.
73. Deacon, K. and J.L. Blank, *MEK kinase 3 directly activates MKK6 and MKK7, specific activators of the p38 and c-Jun NH2-terminal kinases*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16604-10.
74. Hirai, S., et al., *MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(24): p. 15167-73.
75. Tibbles, L.A., et al., *MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6*. *Embo J*, 1996. **15**(24): p. 7026-35.
76. Fan, G., et al., *Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(40): p. 24788-93.
77. Hutchison, M., K.S. Berman, and M.H. Cobb, *Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(44): p. 28625-32.
78. Lee, S.H., et al., *BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 25066-72.
79. Sanchez, I., et al., *Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun*. *Nature*, 1994. **372**(6508): p. 794-8.

80. Tournier, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7337-42.
81. Meier, R., et al., *Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells*. Eur J Biochem, 1996. **236**(3): p. 796-805.
82. Derijard, B., et al., *Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms*. Science, 1995. **267**(5198): p. 682-5.
83. Han, J., et al., *Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6)*. J Biol Chem, 1996. **271**(6): p. 2886-91.
84. Moriguchi, T., et al., *A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13675-9.
85. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
86. Lin, L.L., et al., *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase*. Cell, 1993. **72**(2): p. 269-78.
87. Gille, H., et al., *ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation*. Embo J, 1995. **14**(5): p. 951-62.
88. Janknecht, R., W.H. Ernst, and A. Nordheim, *SAP1a is a nuclear target of signaling cascades involving ERKs*. Oncogene, 1995. **10**(6): p. 1209-16.
89. Chen, R.H., C. Abate, and J. Blenis, *Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10952-6.
90. Davis, R.J., *The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14553-6.
91. Gupta, S., et al., *Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway*. Science, 1995. **267**(5196): p. 389-93.
92. Hu, M.C., W.R. Qiu, and Y.P. Wang, *JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases*. Oncogene, 1997. **15**(19): p. 2277-87.
93. Zinck, R., et al., *Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 4930-8.
94. Price, M.A., A.E. Rogers, and R. Treisman, *Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET)*. Embo J, 1995. **14**(11): p. 2589-601.
95. Price, M.A., F.H. Cruzalegui, and R. Treisman, *The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light*. Embo J, 1996. **15**(23): p. 6552-63.
96. Pages, G., et al., *Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8319-23.
97. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. Faseb J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
98. Lavoie, J.N., et al., *A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry*. Prog Cell Cycle Res, 1996. **2**: p. 49-58.
99. Qui, M.S. and S.H. Green, *PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity*. Neuron, 1992. **9**(4): p. 705-17.
100. Xia, Z., et al., *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1326-31.

101. Ip, Y.T. and R.J. Davis, *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2): p. 205-19.
102. Sarkar, D., et al., *mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(15): p. 10054-9.
103. Park, J.M., et al., *Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition*. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2048-51.
104. Porras, A., et al., *P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(2): p. 922-33.
105. Perregaux, D.G., et al., *Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence*. *Mol Pharmacol*, 1995. **48**(3): p. 433-42.
106. Craxton, A., et al., *p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes*. *J Immunol*, 1998. **161**(7): p. 3225-36.
107. Crawley, J.B., et al., *T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 15023-7.
108. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
109. Dong, C., et al., *Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2092-5.
110. Cavigelli, M., et al., *Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation*. *Embo J*, 1995. **14**(23): p. 5957-64.
111. Whitmarsh, A.J., et al., *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element*. *Science*, 1995. **269**(5222): p. 403-7.
112. Raingeaud, J., et al., *MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(3): p. 1247-55.
113. Waskiewicz, A.J. and J.A. Cooper, *Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(6): p. 798-805.
114. Takekawa, M., T. Maeda, and H. Saito, *Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways*. *Embo J*, 1998. **17**(16): p. 4744-52.
115. Blanco-Aparicio, C., J. Torres, and R. Pulido, *A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(6): p. 1129-36.
116. Keyse, S.M., *Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(2): p. 186-92.
117. Tamura, S., et al., *Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(4): p. 1060-6.
118. Muda, M., et al., *The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(44): p. 27205-8.
119. Theodosiou, A., et al., *MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases*. *Oncogene*, 1999. **18**(50): p. 6981-8.
120. Chu, Y., et al., *The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(11): p. 6497-501.
121. Elion, E.A., *The Ste5p scaffold*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 22): p. 3967-78.

122. Schaeffer, H.J., et al., *MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1668-71.
123. Muller, J., et al., *C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 983-93.
124. Whitmarsh, A.J., et al., *A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1671-4.
125. Buchsbaum, R.J., B.A. Connolly, and L.A. Feig, *Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(12): p. 4073-85.
126. Zhou, G., Z.Q. Bao, and J.E. Dixon, *Components of a new human protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12665-9.
127. Lee, J.D., R.J. Ulevitch, and J. Han, *Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(2): p. 715-24.
128. English, J.M., et al., *Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 3854-60.
129. Williamson, M.P., *The structure and function of proline-rich regions in proteins*. Biochem J, 1994. **297** (Pt 2): p. 249-60.
130. Kato, Y., et al., *Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor*. Nature, 1998. **395**(6703): p. 713-6.
131. Kamakura, S., T. Moriguchi, and E. Nishida, *Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus*. J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26563-71.
132. Abe, J., et al., *Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16586-90.
133. Yan, C., et al., *Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 143-50.
134. Fukuhara, S., et al., *Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves Galpha q and Galpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21730-6.
135. Xu, B.E., et al., *WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7826-31.
136. Sun, W., et al., *MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5093-100.
137. Chao, T.H., et al., *MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36035-8.
138. Kato, Y., et al., *BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C*. Embo J, 1997. **16**(23): p. 7054-66.
139. Abe, J., et al., *c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20389-94.
140. Cavanaugh, J.E., *Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival*. Eur J Biochem, 2004. **271**(11): p. 2056-9.
141. Meloche, S., B.G. Beatty, and J. Pellerin, *Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3*. Oncogene, 1996. **13**(7): p. 1575-9.
142. Zhu, A.X., et al., *Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8202-11.

143. Turgeon, B., M.K. Saba-El-Leil, and S. Meloche, *Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 1**: p. 169-75.
144. Turgeon, B., B.F. Lang, and S. Meloche, *The protein kinase ERK3 is encoded by a single functional gene: genomic analysis of the ERK3 gene family*. *Genomics*, 2002. **80(6)**: p. 673-80.
145. Gonzalez, F.A., et al., *Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues*. *FEBS Lett*, 1992. **304(2-3)**: p. 170-8.
146. Garcia, J.I., et al., *Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk*. *Mamm Genome*, 1996. **7(11)**: p. 810-4.
147. Aparicio, S., et al., *Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes**. *Science*, 2002. **297(5585)**: p. 1301-10.
148. Kleines, M., et al., *Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1492(1)**: p. 139-44.
149. Cheng, M., et al., *Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3*. *J Biol Chem*, 1996. **271(20)**: p. 12057-62.
150. Cheng, M., T.G. Boulton, and M.H. Cobb, *ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271(15)**: p. 8951-8.
151. Coulombe, P., et al., *Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23(13)**: p. 4542-58.
152. Seternes, O.M., et al., *Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway*. *Embo J*, 2004. **23(24)**: p. 4780-91.
153. Schumacher, S., et al., *Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development*. *Embo J*, 2004. **23(24)**: p. 4770-4779.
154. New, L., Y. Jiang, and J. Han, *Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14(6)**: p. 2603-16.
155. Seternes, O.M., et al., *Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22(20)**: p. 6931-45.
156. Shi, Y., et al., *Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23(21)**: p. 7732-41.
157. Julien, C., P. Coulombe, and S. Meloche, *Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression*. *J Biol Chem*, 2003. **278(43)**: p. 42615-24.
158. Bind, E., et al., *A novel mechanism for mitogen-activated protein kinase localization*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15(10)**: p. 4457-66.
159. Abe, M.K., et al., *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*, 1999. **19(2)**: p. 1301-12.
160. Kuo, W.L., et al., *ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway*. *J Biol Chem*, 2004. **279(22)**: p. 23073-81.
161. Brott, B.K., B.A. Pinsky, and R.L. Erikson, *Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95(3)**: p. 963-8.

162. Ishitani, T., et al., *The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF*. *Nature*, 1999. **399**(6738): p. 798-802.
163. Stanford, W.L., J.B. Cohn, and S.P. Cordes, *Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(10): p. 756-68.
164. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature*, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
165. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
166. Bradley, A., et al., *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. *Nature*, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
167. Smithies, O., *Animal models of human genetic diseases*. *Trends Genet*, 1993. **9**(4): p. 112-6.
168. Wong, E.A. and M.R. Capecchi, *Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays*. *Somat Cell Mol Genet*, 1986. **12**(1): p. 63-72.
169. Doetschman, T., et al., *Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells*. *Nature*, 1987. **330**(6148): p. 576-8.
170. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. *Cell*, 1987. **51**(3): p. 503-12.
171. Thompson, S., et al., *Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells*. *Cell*, 1989. **56**(2): p. 313-21.
172. Babinet, C. and M. Cohen-Tannoudji, *Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology*. *An Acad Bras Cienc*, 2001. **73**(3): p. 365-83.
173. van der Weyden, L., D.J. Adams, and A. Bradley, *Tools for targeted manipulation of the mouse genome*. *Physiol Genomics*, 2002. **11**(3): p. 133-64.
174. Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley, *The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(11): p. 5586-91.
175. Hasty, P., et al., *Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(9): p. 4509-17.
176. Muller, U., *Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis*. *Mech Dev*, 1999. **82**(1-2): p. 3-21.
177. Colbere-Garapin, F., et al., *A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells*. *J Mol Biol*, 1981. **150**(1): p. 1-14.
178. Fiering, S., et al., *Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus*. *Genes Dev*, 1995. **9**(18): p. 2203-13.
179. Sauer, B., *Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system*. *Methods*, 1998. **14**(4): p. 381-92.
180. Mansour, S.L., K.R. Thomas, and M.R. Capecchi, *Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes*. *Nature*, 1988. **336**(6197): p. 348-52.
181. Gu, H., et al., *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. *Science*, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
182. Kilby, N.J., M.R. Snaithe, and J.A. Murray, *Site-specific recombinases: tools for genome engineering*. *Trends Genet*, 1993. **9**(12): p. 413-21.



183. Shockett, P.E. and D.G. Schatz, *Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5173-6.
184. Pages, G., et al., *Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1374-7.
185. Yao, Y., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12759-64.
186. Hatano, N., et al., *Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development*. Genes Cells, 2003. **8**(11): p. 847-56.
187. Saba-El-Leil, M.K., et al., *An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development*. EMBO Rep, 2003. **4**(10): p. 964-8.
188. Yang, D.D., et al., *Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2*. Immunity, 1998. **9**(4): p. 575-85.
189. Sabapathy, K., et al., *JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development*. Curr Biol, 1999. **9**(3): p. 116-25.
190. Kuan, C.Y., et al., *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development*. Neuron, 1999. **22**(4): p. 667-76.
191. Sabapathy, K., et al., *Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2*. Mech Dev, 1999. **89**(1-2): p. 115-24.
192. Kuida, K. and D.M. Boucher, *Functions of MAP kinases: insights from gene-targeting studies*. J Biochem (Tokyo), 2004. **135**(6): p. 653-6.
193. Sabapathy, K., et al., *Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 713-25.
194. Tamura, K., et al., *Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis*. Cell, 2000. **102**(2): p. 221-31.
195. Adams, R.H., et al., *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 109-16.
196. Regan, C.P., et al., *Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9248-53.
197. Sohn, S.J., et al., *ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43344-51.
198. Yan, L., et al., *Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development*. BMC Dev Biol, 2003. **3**(1): p. 11.
199. Hayashi, M., et al., *Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure*. J Clin Invest, 2004. **113**(8): p. 1138-48.
200. Landry, J.R., D.L. Mager, and B.T. Wilhelm, *Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes*. Trends Genet, 2003. **19**(11): p. 640-8.
201. Brewer, J.A., et al., *Knock-ins and conditional knockouts: in vivo analysis of glucocorticoid receptor regulation and function*. Endocr Res, 2002. **28**(4): p. 545-50.
202. Brewer, J.A., et al., *Green fluorescent protein-glucocorticoid receptor knockin mice reveal dynamic receptor modulation during thymocyte development*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1309-18.
203. Gagneten, S., et al., *Brief expression of a GFP cre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(16): p. 3326-31.
204. Chung, S., et al., *Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines*. Stem Cells, 2002. **20**(2): p. 139-45.

