Contrôle de la mort cellulaire par la voie des MAPK1/3 (ERK2/1)

Sébastien Cagnol

▶ **To cite this version:**

Sébastien Cagnol. Contrôle de la mort cellulaire par la voie des MAPK1/3 (ERK2/1). Biologie cellulaire. Université Nice Sophia Antipolis, 2005. Français. NNT : . tel-00104792

HAL Id: tel-00104792

https://theses.hal.science/tel-00104792

Submitted on 9 Oct 2006

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

T H E S E

pour obtenir le titre de

Docteur en sciences
de l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Discipline: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

présentée et soutenue par

Sebastien CAGNOL

Contrôle de la mort cellulaire par la voie des MAPK1/3 (ERK2/1)

Thèse soutenue le 4 Juillet 205 à 14h30, au centre Antoine Lacassagne à Nice,
devant le jury composé de

Dr Ellen Van Obberghen-Schilling	Présidente
Dr Alain Eychène	Rapporteur
Dr Urszula Hibner	Rapporteur
Dr Patrick Auberger	Examinateur
Dr Jean-Claude Chambard	Directeur de thèse

LISTE DES ABREVIATIONS 5

LISTE DES SCHEMAS 8

LISTE DES TABLEAUX 9

INTRODUCTION 10

A INTRODUCTION SUR LA MORT CELLULAIRE 11

I Les différents types de mort cellulaire 11

1 L'apoptose 11

2 La nécrose 11

3 La nécrose programmée 12

4 L'autophagie et la paraptose 12

II Les mécanismes de mort par apoptose 13

1 Les caspases 13

2 Les inhibiteurs de caspases 15

2.1 Les IAP 15

a) Smac et Omi les inhibiteurs d'IAP 16

2.2 Les protéines p35 et CrmA 16

III Les voies d'activation des caspases 16

1 L'activation des caspases par la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort 17

1.1 Les récepteurs de mort 17

a) Les récepteurs du groupe I 18

b) Les récepteurs du groupe II 18

1.2 L'exécution de la voie caspase 8 19

1.3 L'inhibition des récepteurs de mort 20

a) Les récepteurs leurres 20

b) La protéine FLIP 20

2 La voie mitochondriale ou voie intrinsèque 21

2.1 Les effets caspase indépendant de la voie mitochondriale 22

2.2 Les protéines de la famille Bcl-2 et la mitochondrie 22

a) La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale 24

2.3 L'apoptosome 24

a) Le contrôle de l'apoptosome 26

3 L'apoptose et les tumeurs 26

3.1 Les voies proapoptotiques sont inhibées dans les cellules tumorales 26

a) p53 27

3.2 Relations entre les voies de signalisation et l'apoptose 27

B LES VOIES DE SIGNALISATION DES MAPK 29

I Les voies de signalisation de JNK et p38 29

1 La voie JNK 29

2 La voie p38 30

II La voie Ras/Raf/MAPK 32

1 L'activation de Ras par les récepteurs à activité tyrosine kinase 33

2 La kinase Raf ... 34
2.1 L'activation de Raf ... 35
a) La fixation de Ras ... 35
b) La phosphorylation du domaine CR2 ... 35
c) La phosphorylation du domaine kinase ... 36
d) L'inhibition de Raf ... 36
3 Les kinases MEK1 et MEK2 ... 37
3.1 L'activation des MEK ... 38
3.2 Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK et leurs limites ... 39
4 Les MAPK1/3 ... 40
4.1 L'activation des MAPK ... 40
4.2 Le contrôle de l'activité des MAPK par les phosphatases ... 41
4.3 Localisation des MAPK ... 41
4.4 La durée d'activation des MAPK ... 42
5 Les protéines d'échafaudage de la voie Raf/MAPK ... 43
5.1 14-3-3 ... 43
5.2 MP-1 ... 43
5.3 Sur-8 ... 44
5.4 RKIP ... 44
5.5 KSR ... 44
5.6 β-arrestine ... 45
6 Les fonctions de la voie des MAPK ... 47
6.1 MAPK et prolifération cellulaire ... 47
6.2 La différenciation cellulaire ... 47
6.3 La migration cellulaire ... 48
6.4 Fonctions neuronales ... 48
C LE CONTROLE DE LA MORT CELLULAIRE PAR LA VOIE DES MAPK ... 49
I Rôle antiapoptotique de la voie Raf/MAPK ... 49
1 La voie Raf/MAPK joue un rôle antiapoptotique dans les cellules tumorales ... 49
1.1 Mutations oncogéniques dans la voie des MAPK chez l'homme ... 50
a) L'oncogène B-Raf favorise la survie des mélanomes ... 53
b) L'activation de la voie des MAPK1/3 favorise la survie des cellules leucémiques ... 53
1.2 L'activation constitutive de la voie des MAPK favorise la croissance indépendante d'ancrage ... 54
2 Rôle de la voie des MAPK dans la survie cellulaire durant le développement embryonnaire ... 55
2.1 L'invalidation de ras chez la souris ... 55
2.2 L'invalidation de raf chez la souris ... 56
a) c-raf-1 joue un rôle antiapoptotique indépendamment des kinases MEK et MAPK ... 57
b) Le rôle antiapoptotique de c-raf-1 dépend-il de l'activité kinase de Raf-1 ? ... 57
2.3 L'invalidation de mek chez la souris ... 58
2.4 L'invalidation de mapk chez la souris ... 59
2.5 L'invalidation de rsk2 chez la souris ... 59
2.6 Voie MAPK et survie cellulaire chez la drosophile ... 60
3 Les mécanismes impliqués dans la survie cellulaire dépendante de la voie des MAPK ... 61
3.1 Les kinases de la voie des MAPK1/3 sont dégradées durant l'apoptose ... 61
3.2 Le contrôle du métabolisme cellulaire par les MAPK1/3 ... 62

3.3 Inhibition de la voie des récepteurs de mort ... 63
a) Contrôle transcriptionnel de l'inhibiteur FLIP ... 63
b) Inhibition post traductionnelle de la caspase 8 ... 63
3.3 Inhibition de la voie mitochondriale ... 65
a) La voie des MAPK1/3 inhibe les protéines proapoptotiques Bad, Bax et Bim ... 65
b) La voie des MAPK1/3 induit les protéines de survie Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 ... 65
c) La voie des MAPK1/3 inhibe l'activation des caspases en aval de la mitochondrie ... 67
♦ La voie des MAPK1/3 inhibe l'apoptosome ... 67
♦ La voie des MAPK augmente l'expression des IAP ... 67
3.4 Raf joue un rôle antiapoptotique indépendamment des kinases MEK/MAPK ... 70
a) Le rôle antiapoptotique de Raf est lié à sa localisation mitochondriale ... 71
♦ Ciblage mitochondrial de Raf-1 ... 71
♦ La forme endogène de Raf-1 est associée à des fractions mitochondriales ... 71
♦ La localisation mitochondriale Raf-1 a-t-elle une signification physiologique ? ... 72
b) Les activités kinases régulées par Raf-1 ... 72
♦ Raf inhibe la kinase de mort ASK1 ... 72
♦ Raf-1 inhibe la protéine proapoptotique MST2 ... 73
♦ Raf-1 active la voie antiapoptotique NFκB ... 73
♦ Raf active la voie de survie MEK5/MAPK5 ... 73
II La voie des MAPK1/3 favorise la mort cellulaire ... 76
1 La voie des MAPK est impliquée dans l'induction de la mort cellulaire au cours du développement ... 76
1.1 Le développement des membres chez le poulet ... 76
1.2 Le U0126 inhibe la mort cellulaire développementale chez l'ascidie ... 76
1.3 Mort des cellules germinales chez Caenorhabditis Elegans ... 77
1.4 Mort des cellules germinales chez l'étoile de mer ... 77
2 La voie MEK/MAPK est inactivée dans les tumeurs ... 78
2.1 Inactivation de la voie des MAPK dans certains modèles tumoraux ... 78
a) Les phosphatases MKP1 et MKP2 sont surexprimées dans certaines tumeurs ... 79
2.2 La mort induite par les drogues chimiothérapeutiques dépend de l'activation de la voie des MAPK1/3 ... 81
a) La mort cellulaire induite par le Taxol dépend de l'activation de la voie des MAPK ... 81
b) La voie des MAPK favorise l'apoptose induite par les agents génotoxiques ... 81
3 La voie des MAPK est impliquée dans la mort cellulaire induite par les radicaux libres ... 85
3.1 L'apoptose induite par les ROS dépend de l'activité MEK/MAPK ... 85
3.2 Les ROS activent la voie des MAPK par un mécanisme biphasique ... 87
3.3 La mort induite par les ROS dépend de l'activation nucléaire prolongée des MAPK ... 88
3.4 L'activation des MAPK par les ROS induit l'apoptose mitochondriale ... 90
a) La voie des MAPK1/3 est impliquée dans une mort indépendante de l'activité des caspases ... 91
4 La mort cellulaire induite par la voie des MAPK est impliquée dans les maladies neurodégénératives ... 92
4.1 L'activation de la voie des MAPK est directement impliquée dans la mort des neurones après ischémie ... 92
a) La mort des neurones ischémiés est en relation avec la localisation nucléaire prolongée des formes actives des MAPK ... 93
4.2 La voie des MAPK est activée durant les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson ... 93
a) La voie des MAPK et la phosphorylation de Tau ... 94
5 Mécanismes impliqués dans l'effet proapoptotique de la voie des MAPK ... 95
5.1 La voie des MAPK induit la mort cellulaire par perte d'ancrage ... 95

5.2 La voie des MAPK et la phospholipase A2 96
5.3 Rôle des isoformes MAPK1 et MAPK3 dans la mort cellulaire 96
5.4 L'activité transcriptionnelle de la voie de signalisation des MAPK dans la mort cellulaire 97
a) L'apoptose induite par la voie des MAPK dépend de p53 97
b) Le facteur de transcription Nur77 98
c) Le facteur de transcription Egr-1 98
d) L'apoptose des lymphocytes T : un modèle d'induction transcriptionnelle de l'apoptose par la voie des MAPK1/3 100

RESULTATS 103

Article 1 : La voie des MAPK1/3 bloque l'activation de la caspase 9 au sein de l'apoptosome 104
Article 2 : L'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 entraîne l'activation de la caspase 8 et la mort des cellules HEK293 par un mécanisme indépendant de FADD 117

DISCUSSION FINALE ET CONCLUSIONS 132

ANNEXES 133

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 134

Liste des abréviations

AIF : apoptosis-inducing factor

Apaf1 : apoptotic protease-activating factor 1

ATRA : all-*trans*-retinoic-acid

Bad : Bcl2-antagonist of cell death

Bax : BCL2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell CLL/lymphoma 2

BCR : B-cell receptor

BIR : baculovirus Inhibitory Repeat

Bid : BH3 interacting domain

CARD : caspase recruitment domain

CAXX : C,cystéine, A acide aminé aliphatique, X n'importe quel acide aminé

Cdc42 : cell division cycle 42

CREB : cAMP response element binding protein

CrmA : cytokine response modifier A

DD :death domain

DED : death effector domain

DIABLO : direct IAP-binding protein with low pl

DISC : death-inducing signalling complex

DR4/5 : death receptor4/5

DUSP : dual specificity phosphatase

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

EphA2 : Ephrin type-A receptor 2

ERK : extracellular regulated kinase

FADD : Fas-associated death domain protein

FGF : fibroblast growth factor

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor precursor

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

GRK-2 : Gprotein-coupled receptor kinase 2

HER2-neu/cerbB2 : human epidermal growth factor receptor 2

HtrA2 : high temperature requirement A 2

HUVEC : human umbilical vascular endothelial cells

IAP : inhibitor of apoptosis protein

IKK : IκB kinase

IL-3 : interleukin 3

KSR : kinase supressor of ras

Mas70 : yeast mitochondrial proteins import receptor 70

MAPK : mitogen activated protein kinase

Mcl-1 : myeloid cell leukemia

MEK : MAPK and ERK kinase

MEKK : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase

MKP : MAP kinases phosphatase

MLCK : myosin light chain kinase

MLK : mixed lineage kinase

mtPTP : mitochondrial transition pore

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MUK: MAPK upstream kinase

NFκB : Nuclear factor NF-kappa-B

NGF : nerve growth factor

6-OHDA : 6-Hydroxydopamine

PAK : p21-activated protein kinase

PARP : poly ADP-ribose polymerase

PDGF : platelet derived growth factor

PDK1 : 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1

PGDH : D-3-phosphoglycerate dehydrogenase

PHAP : putative HLA-DR-associated protein

PKC : protein kinase c

cPLA2 : cytosolic phospholipase A2

ROS : reactive oxygen species

RKIP : raf kinase inhibitor protein

RSK : Ribosomal protein S6 kinase alpha

Shc : Src homology 2 domain containing transforming protein

SMAC : second mitochondria-derived activator of caspases

TAK : TGFβ activated kinase

TCR : T-cell receptor

TGF : Transforming growth factor

TNF : tumor necrosis factor

Tpl2 : tumor progression locus kinase 2

hTOM : Mitochondrial import receptor

TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein

TRAF : TNFR-associated factor

TRAIL : Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

VDAC : voltage-dependant anion channel

VEGF : vascular endothelial growth factor

XIAP : X-inked inhibitor of apoptosis protein

Liste des schémas

Schéma n°1: Les principales caspases impliquées dans l'apoptose 14
Schéma n°2: Les IAPs 15
Schéma n°3: Les récepteurs de mort et leurs ligands 17
Schéma n°4: Les deux groupes de récepteurs de mort 19
Schéma n°5: L'apoptose mitochondriale 21
Schéma n°6: Les protéines de la famille Bcl-2 23
Schéma n°7: La formation de l'Apoptosome et son inactivation 25
Schéma n°8: La voie des kinases de stress JNK/p38MAPK 31
Schéma n°9: La voie de signalisation Raf/MAPK 32
Schéma n°10: L'activation de Ras 33
Schéma n°11: Les trois isoformes de Raf 34
Schéma n°12: Le modèle d'activation de Raf-1 37
Schéma n°13: La kinase MEK 38
Schéma n°14: Les protéines d'échafaudage de la voie MAPK 46
Schéma n°15: La voie MAPK inhibe l'apoptose induite par les récepteurs de mort 64
Schéma n°16: La voie MAPK inhibe l'apoptose mitochondriale 69
Schéma n°17: Raf-1 inhibe l'apoptose indépendamment de la voie MEK/MAPK 75
Schéma n°18: La voie des MAPK1/3 est impliquée dans l'apoptose induite par les agent chimiothérapeutiques 84
Schéma n°19: Les radicaux libres activent la voie des MAPK en deux phases 88
Schéma n°20: Modèle hypothétique d'induction de la mort cellulaire par les MAPK 90
Schéma n°21: Les mécanismes impliqués dans la mort induite par la voie des MAPK 99
Schéma n°22 La voie des MAPK est impliquée dans l'apoptose des lymphocytes 101

Liste des tableaux

Tableau n°1: Les mutations de la voie Ras/MAPK dans les tumeurs 50
Tableau n°2: Les mutations de B-Raf dans les tumeurs 52
Tableau n° 3: Lignées tumorales surexprimant les MPKs 80
Tableau n°4 : La voie des MAPK1/3 et l'apoptose induite par les agents anticancéreux 82
Tableau n° 5: La voie des MAPK1/3 et la mort cellulaire induite par les ROS 86

Introduction

A Introduction sur la mort cellulaire

I Les différents types de mort cellulaire

Chez les organismes pluricellulaires des plus simples comme le nématode *Caenorhabditis elegans* jusqu'aux mammifères, il existe plusieurs processus de mort cellulaire qui sont induits de façon programmée ou qui sont activés par les stimuli de stress extracellulaire. On peut regrouper quatre mécanismes de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose, la nécrose programmée et l'autophagie.

1 L'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé et ordonné en différentes étapes qui seront détaillées dans les pages suivantes. L'apoptose a été caractérisée morphologiquement en 1972 par Kerr et Wyllie (208). Cette forme de mort cellulaire conduit à une séquence d'altérations morphologiques comprenant le bourgeonnement de la membrane plasmique, la condensation et la fragmentation du noyau, et le découpage de la cellule en corps apoptotiques qui seront digérés par des macrophages ou par les cellules voisines. L'apoptose exige de l'énergie sous forme d'ATP, et son exécution requiert l'activation d'une famille de protéases, les caspases. L'apoptose joue un rôle essentiel aussi bien pendant le développement embryonnaire que tout au long de la vie de l'organisme adulte. Ce processus de mort programmé permet à l'organisme d'éliminer les cellules cibles sans provoquer l'inflammation du tissu.

2 La nécrose

A l'inverse de l'apoptose, la mort cellulaire par nécrose est le résultat d'une catastrophe bioénergétique provenant de l'épuisement de l'ATP à un niveau incompatible avec la survie des cellules. La nécrose est induite principalement par des agression extracellulaires comme le stress toxique ou par les dommages physiques. La nécrose est caractérisée

morphologiquement par la vacuolisation du cytoplasme et la perméabilisation de la membrane plasmique qui conduit à la perte du contenu cellulaire. La libération des protéines intracellulaires active le système immunitaire et entraîne une réaction inflammatoire autour de la cellule morte. Les cellules qui meurent par la nécrose montrent fréquemment des changements de morphologie du noyau mais pas la condensation et la fragmentation de la chromatine en fragments de 200 pb, caractéristiques de l'apoptose.

3 La nécrose programmée

Lorsque l'apoptose classique n'arrive pas à complétion, en l'absence de phagocytes ou dans certaines conditions d'infection virale, il se produit une signalisation parallèle conduisant à une mort cellulaire qui s'apparente à de la nécrose. Cette « nécrose programmée » fait intervenir des agents impliqués dans l'apoptose comme les récepteurs de mort Fas et TNFR-1 ou les caspases 1 et 8. La protéine PARP, qui est un substrat des caspases effectrices, semble aussi jouer un rôle important dans l'induction de cette nécrose programmée (pour revue (192)).

4 L'autophagie et la paraptose

La mort par autophagie est caractérisée par la formation d'une vésicule cytosolique, l'autophagosome, qui encapsule les organelles entières et notamment les mitochondries. Cet autophagosome va pouvoir fusionnner avec le lysosome où le contenu sera recyclé (257). Contrairement à l'apoptose, l'autophagie nécessite un cytosquelette intact (pour revue (312)). Il a été montré chez la levure, le Dictyostelium et le C.elegans que l'autophagie représente un mécanisme de survie utilisé pour permettre à ces organismes de survivre à des périodes de limitation en sources énergétiques (242). Chez l'homme on observe fréquemment des cellules autophagiques dans les maladies neurodégénératives tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Il faut noter que les neurones présentent une forme de mort cellulaire non-apoptotique proche de l'autophagie. Cette mort nommée paraptose qui est insensible aux inhibiteurs de caspase et à Bcl-$x_{L,}$ requiert la synthèse protéique. La paraptose n'entraîne pas de dégradation de l'ADN ni de formation de corps apoptotique. Comme l'autophagie, la paraptose est caractérisée par une vacuolisation du cytoplasme qui provient d'un gonflement des mitochondries et du réticulum endoplasmique (414).

II Les mécanismes de mort par apoptose

1 Les caspases

L’apoptose est caractérisée par l'activation d’une famille de protéases à cystéine, les caspases (pour cystein aspartyl protease), qui compte chez l’homme environ 14 membres. L’ensemble des membres de cette famille d’endoprotéases possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine localisé dans un motif Q-A-C-X-G (X pouvant être un résidu R, Q ou G). Les caspases reconnaissent un motif tétrapeptidique, puis clivent la chaîne polypeptidique au niveau d’un résidu aspartate. Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, les procaspases. L’activation des procaspases se fait par des coupures protéolytiques intra ou intermoléculaires. Une caspase active est formée par dimérisation de deux grandes et deux petites sous-unités et comprend donc deux sites catalytiques, à l’exception de la caspase 9 dont la forme dimérique ne présente qu’un seul site actif.

Les procapases ont une structure primaire très conservée qui comprend un prodomaine amino terminal de taille variable, un domaine central correspondant à la grande sous-unité et un domaine carboxy terminal qui correspond à la petite sous-unité (voir shéma n°1).

L’activation des caspases est séquentielle et débute par le clivage auto-protéolytique des caspases initiatrices. Les caspases initiatrices possèdent un prodomaine long, domaine CARD (pour CAspase Recruitment Domain) pour les caspases 1, 2, 4 et 9 ou domaine DED (pour Death Effector Domain) pour les caspases 8 et 10. Ces prodomaines longs permettent aux caspases initiatrices d’être recrutées au sein de complexes multiprotéiques qui servent d'inducteurs de proximité (34) au sein desquels elles pourront être activées par dimérisation et clivage autoprotéolytique. Ces complexes multiprotéiques sont l’apoptosome, qui active la procaspase 9, et le DISC (pour death inducing signaling complex) qui active les procaspases 8 et 10.

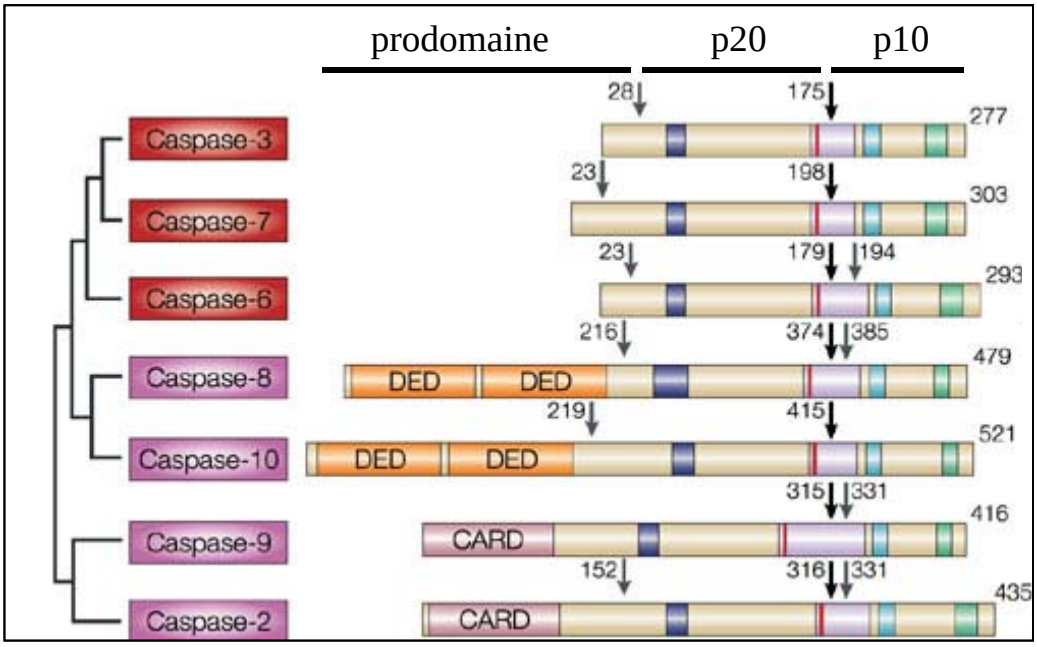

Schéma n°1: Les principales caspases impliquées dans l'apoptose (Riedl SJ 2004)
Les caspases possèdent toutes trois domaines : un prodomaine amino terminal, un domaine central long (p20) et le domaine court (p10). Les caspases initiatrices possèdent un long prodomaine contenant deux domaines DED (caspases 8 et 10) ou un domaine CARD (caspases 9 et 2). Les caspases effectrices 3, 6 et 7 possèdent un prodomaine court. Les caspases sont activées par clivage protéolytique (sites de clivage représentés par les flèches).

Les caspases initiatrices ont pour substrats les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7 et 14). Ces caspases ont un prodomaine court et sont activées par le clivage qui sépare les sous-unités. Ce clivage est effectué par d'autres caspases (initiatrices ou effectrices) ou par la protéase granzyme B. Les caspases effectrices reconnaissent chacune des motifs tétrapeptidiques spécifiques et vont cliver à leur tour de nombreux substrats, comme des enzymes de modification de l'ADN (PARP, DNA-PKs), des protéines de signalisation (Akt, Raf) et des protéines de structure (lamine A, fodrine, actine), ce qui va entraîner le démantèlement de la cellule (pour revues (90, 364)). L'activation en cascade des caspases permet une amplification du signal apoptotique et leur clivage représente un point de non-retour du processus apoptotique. Toutefois l'activité des caspases est aussi sujette à une régulation par différentes protéines antiapoptotiques.

2 Les inhibiteurs de caspases

2.1 Les IAP

Les protéines IAP (pour inhibitor of apoptosis proteins) sont une famille d'inhibiteurs qui agissent comme des pseudosubstrats des caspases 3, 7 et 9. Les IAP appartiennent à la famille des protéines à domaine BIR (pour Baculovirus Inhibitory Repeat). Ce sont des homologues de protéines virales qui inhibent la mort déclenchée lors de l'infection virale. On dénombre chez les mammifères 8 protéines qui sont classées selon leur nombre de domaine BIR et selon la présence d'un domaine RING (voir schéma n°2).

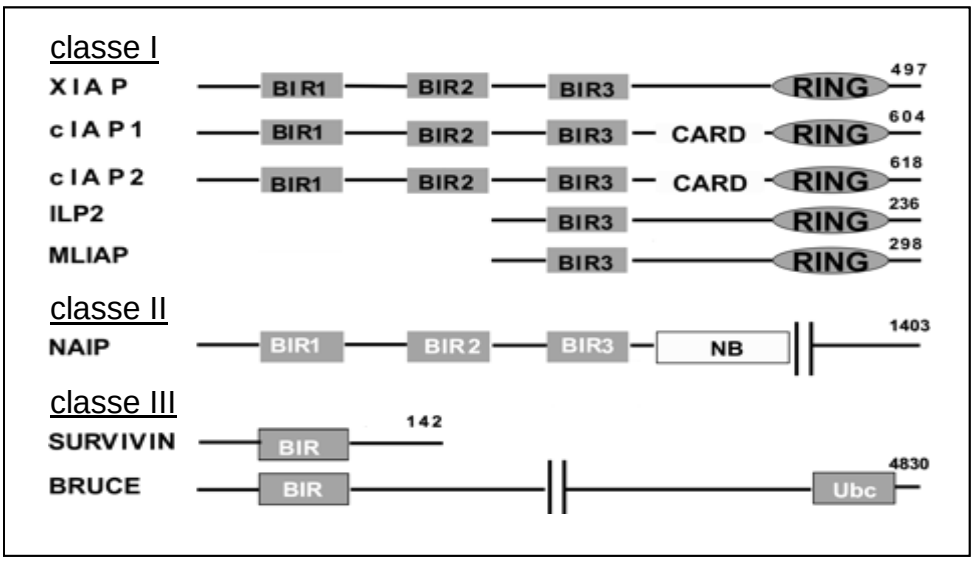

Schéma n°2: Les IAPs (Schimmer AD 2004)

Les IAPs de classe 1, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP-2 et ML-IAP, contiennent de 1 à 3 domaines BIR et un domaine à doigt de zinc (domaine RING) confèrant à cette famille une activité ubiquitine ligase. La présence du domaine RING entraîne la dégradation par le protéasome des caspases qui sont associées aux IAPs (pour revue (489)). cIAP1, cIAP2 possèdent un domaine supplémentaire, le domaine CARD, qui leur permet de s'associer aux caspases à long prodomaine. XIAP, cIAP1 et cIAP2 inhibent les caspase 3, 7 et 9, ILP-2 inhibe la caspase 9 et ML-IAP inhibe les caspases 3 et 9. La seule IAP de classe 2 est NAIP qui possède trois domaines BIR mais pas de domaine RING. NAIP inhibe les caspases 3 et 7. Les

IAP de classe 3 sont Survivin et Bruce qui ne possèdent qu'un domaine BIR. Survivin inhibe la caspase 9 (275). Survivin dont l'expression est augmentée pendant la phase G2/M du cycle cellulaire, pourrait aussi réguler p21, l'inhibiteur des Cdks (pour revue TobakT 9,705). Bruce est une IAP membranaire de haut poids moléculaire (540KDa), qui peut inhiber la caspase 9 mais aussi bloquer l'activité proapoptotique de Smac (352).

a) Smac et Omi les inhibiteurs d'IAP

L'activité des IAPs est régulée par les protéines proapoptotiques Smac/DIABLO (pour Second mitochondria-derived activator of caspases), Omi/HtrA2 (High temperature requirement A) et XAF1. Les protéines de mort Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 sont localisées dans la mitochondrie. Au cours du processus apoptotique elles sont relâchées de la mitochondrie, puis se fixent aux domaines BIR des IAP et inhibent leur fonction de survie. L'association des IAPs avec Smac/DIABLO entraîne leur dégradation par le protéasome, alors que leur association avec Omi/HtrA2 entraîne leur clivage protéolytique (pour revue ((252)). XAF1 est une protéine nucléaire qui se lie à XIAP et la séquestre dans le noyau (251).

2.2 Les protéines p35 et CrmA

Deux protéines virales, p35 et CrmA, sont des inhibiteurs compétitifs des caspases. P35 est une protéine de Baculovirus qui est impliquée dans l'inhibition des caspases 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 et 10. CrmA (pour Cytokine response modifier A) provient du virus de la Vaccine et inhibe l'activité protéolytique des caspases 1, 6 et 8. Une fois clivées par la caspase, ces protéines se lient au site catalytique et inhibent son activité. (pour revue (64))

III Les voies d'activation des caspases

Les caspases initiatrices sont activées principalement par deux voies de signalisation qui entraînent leur dimérisation : la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque qui active les caspases 8/10 et la voie mitochondriale ou voie intrinsèque qui active la caspase 9.

1 L'activation des caspases par la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

1.1 Les récepteurs de mort

La voie extrinsèque est déclenchée par des ligands extracellulaires (solubles ou présentés par d'autres cellules), qui activent les récepteurs de mort (pour revues (447) (96)). Les récepteurs de mort font partie de la superfamille des récepteurs au TNF (30). On dénombre chez l'homme au moins huit récepteurs de mort : le récepteur au TNF, TNF-R1 (ou DR1, CD120a, p55, p60), le récepteur CD95 (ou DR2, APO-1, Fas), le récepteur DR3 (ou APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), le récepteur n°1 du ligand TRAIL (ou DR4 ou APO-2), le récepteur n°2 de TRAIL (ou DR5, KILLER, TRICK2), le récepteur DR6, le récepteur à l'ectodysplasin A (ou EDA-R) et le récepteur à l'NGF (468) (voir schéma n°3).

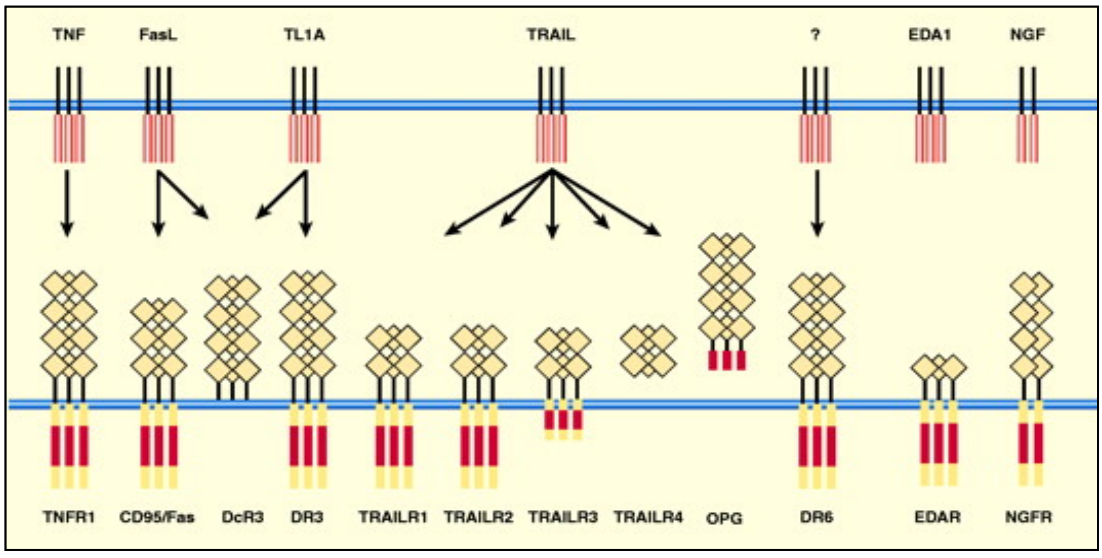

Schéma n°3: Les récepteurs de mort et leurs ligands (LavrikI 2005)

Ces récepteurs possèdent tous 4 domaines riches en cystéine dans leur partie extracellulaire et un domaine de mort DD (Death Domain) dans leur région cytoplasmique. Ce domaine est un domaine de recrutement. Les molécules qui possèdent un domaine homotypique viennent se fixer au domaine DD et déclenchent des cascades de signalisation variées.

Les récepteurs de mort peuvent être divisés en deux groupes selon la nature des molécules qui s'associent à leur domaine cytoplasmique. Le premier groupe comporte les récepteurs CD95, TRAILR1 et TRAILR2, qui vont tous former dans leur partie cytosolique un complexe multiprotéique nommé DISC (pour Death-Inducing Signaling Complex).

a) Les récepteurs du groupe I

Le DISC est un complexe périmembranaire qui permet l'activation des caspase 8 et 10 (voir schéma n°5). Le DISC est composé de trois récepteurs de mort préassemblés, chacun étant lié dans sa partie cytosolique à une protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain). FADD est elle-même liée à une procaspase 8 ou 10 (338). D'autres protéines comme Daxx, FAP-1, FLASH, RIP, FAF-1 peuvent s'associer aux composants du DISC, mais leur rôle est encore mal connu.
Les interactions entre les différentes molécules du DISC sont basées sur les contacts homotypiques. Le domaine DD du récepteur s'associe au domaine DD de la protéine FADD. La protéine FADD possède aussi un domaine effecteur de mort DED (pour Death Effector Domain) qui s'associe au DED situé sur la partie amino-terminale des procaspase 8 et 10. Ce domaine peut aussi interagir avec la protéine inhibitrice $FLIP_L$ qui empêche le recrutement des caspases.

b) Les récepteurs du groupe II

La signalisation des récepteurs TNF-R1, DR3 et DR6 est mal connue. Les récepteurs TNF-R1 et DR3 pourraient recruter FADD par l'intermédiaire de la protéine TRADD (pour TNFR-Associated Death Domain protein) qui contient un domaine DD (180). Le récepteur TNF-R1 peut aussi recruter la kinase RIP et la protéine adaptatrice RAIDD qui possède un domaine CARD pouvant lier la procaspase 2 (117). L'équipe du Dr Tschopp a montré que l'activation du récepteur TNF-R1 induit deux voies de signalisation différentes. La première, qui fait intervenir le récepteur TNF-R1, les protéines TRADD et TRAF-1/2 (pour TNFR-Associated Factor), conduirait à l'activation des voie JNK et NFκB (pour revue (72)). La seconde fait intervenir les molécules TRADD et TRAF dans le cytosol et conduirait à la formation d'un complexe multiprotéique nommé Traddosome qui participerait à l'activation de la caspase 8 (288) (voir schéma n°4).

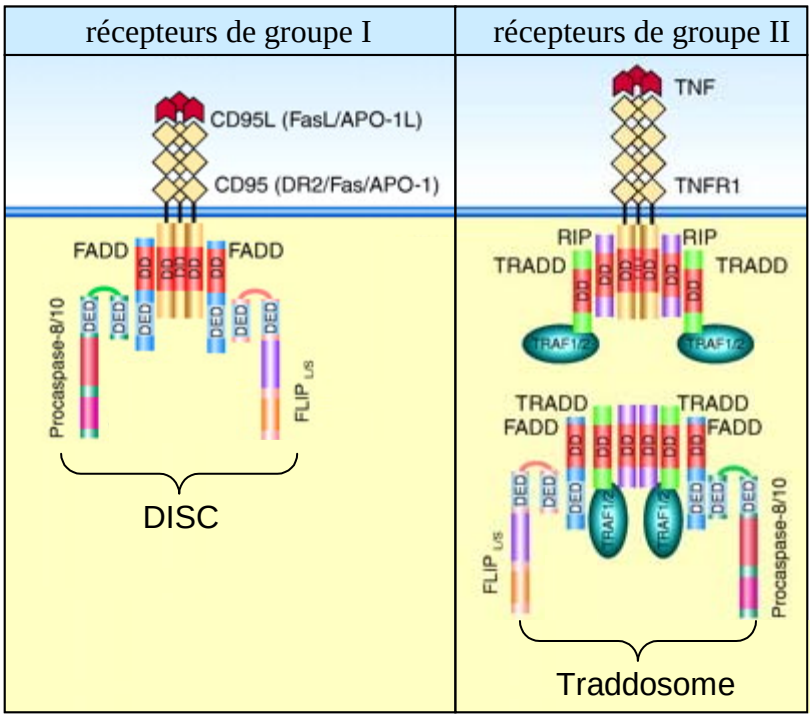

Schéma n°4: Les deux groupes de récepteurs de mort (LavrikI 2005)

Les récepteurs de mort peuvent être divisés en deux groupes. Les récepteurs du premier groupe (CD95, TRAILR-1, TRAILR-2) forment dans leur partie cytosolique un complexe multiprotéique nommé DISC (pour death inducing signaling complex). Le DISC est formé par les récepteurs et les protéines FADD, FLIP et les procaspases 8/10. Les récepteurs du second groupe (TNFR-1, DR3, DR6, EDAR) forment un complexe ne comprenant pas de caspase.

Le modèle d'activation le mieux documenté est l'activation de la procaspase 8 par le récepteur Fas : la stimulation d'un complexe de trois récepteurs Fas entraîne un changement de leur conformation qui permet au niveau de leur partie cytoplasmique de rapprocher entre elles les procaspases 8. Ce rapprochement des procaspases 8 induit leur dimérisation et leur activation par clivage autoprotéolytique. Le clivage entre les deux sous-unités de la procaspase 8 aboutit à la formation d'une caspase 8 active, formée par un hétérotétramère contenant deux grandes sous-unités (p18) et deux petites sous-unités (p10).

1.2 L’exécution de la voie caspase 8

Une fois la caspase 8 activée, l’exécution de l’apoptose peut se faire de deux façons selon le type cellulaire (384). Les cellules dites de type I sont caractérisés par des niveaux élevés de

composants du DISC et expriment une plus grande activité caspase 8. Dans ces cellules, la caspase 8 active directement les caspases effectrices 3 et 7 qui détruisent la cellule. Dans les cellules de type II, les niveaux d'expression des composants du DISC et de caspase 8 activée sont plus faibles. Dans ces cellules, l'exécution de l'apoptose nécessite une amplification du système d'activation des caspases effectrices qui passe par l'activation de la voie mitochondriale via le clivage de la protéine Bid.

1.3 L'inhibition des récepteurs de mort

a) Les récepteurs leurres

Il existe des récepteurs de la famille TNF-R sans domaine DD, les Decoy Receptor ou DcR qui vont inhiber la voie des récepteurs de mort en piégeant leurs ligands. Ces récepteurs, comprennent DcR1 (ou TRAIL-R3, TRID, LIT), DcR2 (ou TRAIL-R4), DcR3 et le récepteur osteoprotegrin (ou OPG, TRAIL-R5) (pour revue (234)). OPG est un récepteur soluble capable de neutraliser le ligand TRAIL (127). TRAIL-R3 et R4 sont des récepteurs membranaires qui peuvent eux aussi piéger TRAIL (321, 399)

b) La protéine FLIP

FLIP (pour FLICE-inhibitory Protein) aussi appelée casper I-FLICE, flame-1, cash, MRIT ou CLARP est une protéine dont la structure ressemble à celle des caspases 8 et 10. Par épissage alternatif, FLIP est exprimée sous la forme de deux protéines $FLIP_S$ (pour short) et $FLIP_L$ (pour long), composées de deux DED. $FLIP_L$ contient en plus un domaine homologue aux domaines p10 et p20 de caspase 8, sans l'activité enzymatique. L'expression de $FLIP_S$ et $FLIP_L$ bloque la mort cellulaire induite par les récepteurs de mort, en empêchant l'association de caspase 8 avec l'adaptateur FADD (28, 190, 446). Cependant, il a été aussi montré que la surexpression de FLIP pouvait favoriser la mort cellulaire (164, 189) (pou revue (337)).

2 La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

La voie principale d'activation des caspases est la voie dépendante de la mitochondrie. Lorsque la cellule subit un stress important (choc osmotique ou thermique, arrêt du métabolisme, dommages irréversibles de l'ADN, sevrage en cytokines), les différentes voies de signalisation mises en jeu convergent vers la formation de pores de taille variable au niveau de la membrane externe mitochondriale (pour revues (375) (459)).

La perméabilisation de la mitochondrie conduit à la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi m$) et à la sortie de plusieurs protéines proapoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. Le contrôle de la perméabilité mitochondriale dépend principalement des protéines de la famille Bcl-2.

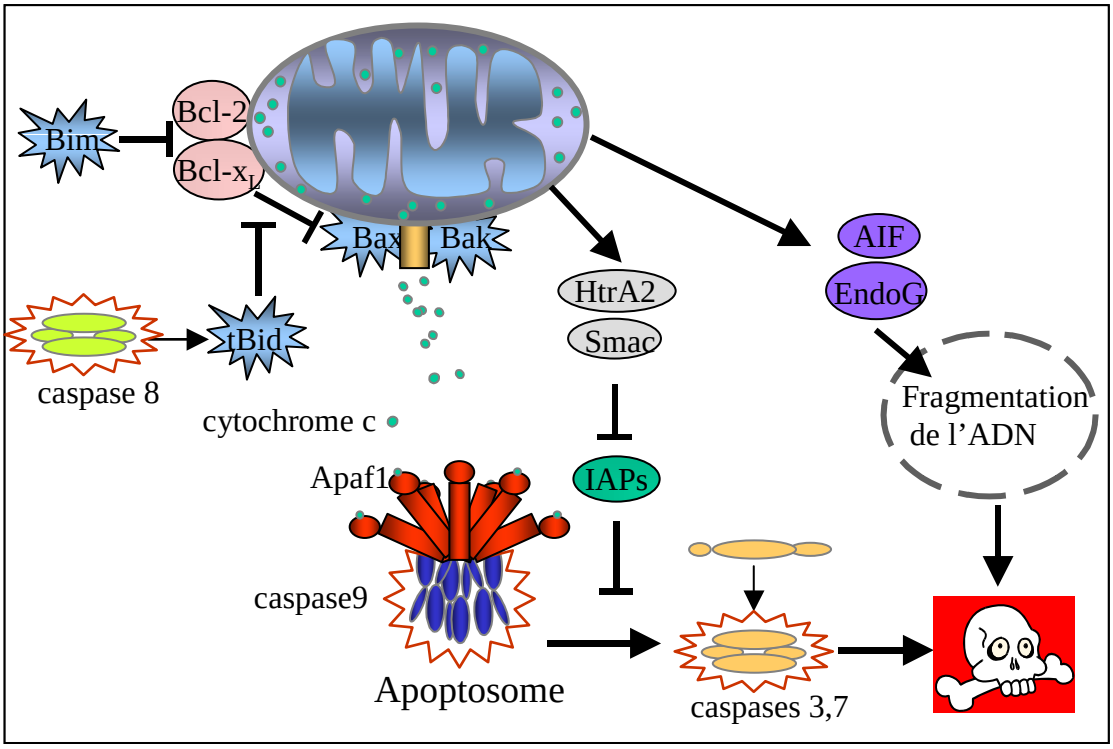

Schéma n°5: L'apoptose mitochondriale

Lorsque la cellule subit un stress important, comme lors d'un arrêt du métabolisme ou suite à des dommages irréversibles de l'ADN, des mécanismes encore mal connus provoquent la formation de pores à la membrane externe des mitochondries. Ces pores de taille variable vont faire sortir vers le cytosol plusieurs protéines proapoptotiques : cytochrome c, Smac, HtrA2, AIF et endonucléase G.

La sortie du cytochrome c est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 qui comporte des membres proapoptotiques comme Bax, Bak, Bid et Bim et des membres antiapoptotiques comme Bcl-2 et $Bclx_L$. Dans le cytosol, le cytochrome c va se fixer à la protéine Apaf1 et entraîner sa multimérisation. L'ensemble va former un complexe nommé Apoptosome. L'Apoptosome va recruter la procaspase 9 pour l'activer. La caspase 9 va activer à son tour les caspases effectrices. Cette activation des caspases est inhibée par les protéines antiapoptotiques IAPs. L'activité des IAP est elle-même inhibée par les protéines Smac et HtrA2 relâchées de la mitochondrie. Les protéines AIF et endonucléase G (Endo G) sont aussi relâchées de la mitochondie et vont se relocaliser dans le noyau pour y dégrader l'ADN

2.1 Les effets caspase indépendant de la voie mitochondriale

Le cytochrome c et Smac ne sont pas les seules protéines proapototiques relâchées par la mitochondrie ; deux facteurs particuliers, AIF et EndoG, vont être relocalisés dans le noyau et vont favoriser la mort cellulaire par des mécanismes indépendamment des caspases. La protéine AIF (pour apoptosis-inducing factor) est une flavoprotéine impliquée dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN en larges fragments (429). La ribonucléase G (EndoG) est une endonucléase qui coopère avec AIF pour dégrader l'ADN (245).

2.2 Les protéines de la famille Bcl-2 et la mitochondrie

Bcl-2 (pour B cell lymphoma) est un oncogène dont la surexpression entraîne une lymphoprolifération par inhibition de l'apoptose. Les protéines de la famille BCL-2 peuvent être subdivisées en trois classes sur la base de leurs fonctions et du nombre de domaines BH (pour Bcl-2 homology). Les membres antiapoptotiques comme Bcl-2 et Bcl_{XL} ont quatre domaines de BH (BH1 à BH4), les membres proapoptotiques tels que BAK et BAX possèdent trois domaines de BH (BH1 à BH3). Les protéines telles que Bad, Bid et Bim qui ne possèdent qu'un seul domaine BH3 (BH3-only protein) sont toutes proapoptotiques (158). Les protéines de la famille Bcl-2 sont capables de former des homo-oligomères ou des hétérodimères entre elles. Certaines de ces protéines comme Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bax, Bad ou Bim possèdent un signal de localisation à la membrane externe de la mitochondrie (voir schéma n°5). Le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie ou l'induction de la mort dépend du ratio des protéines pro et antiapoptotiques de la famille de Bcl-2.

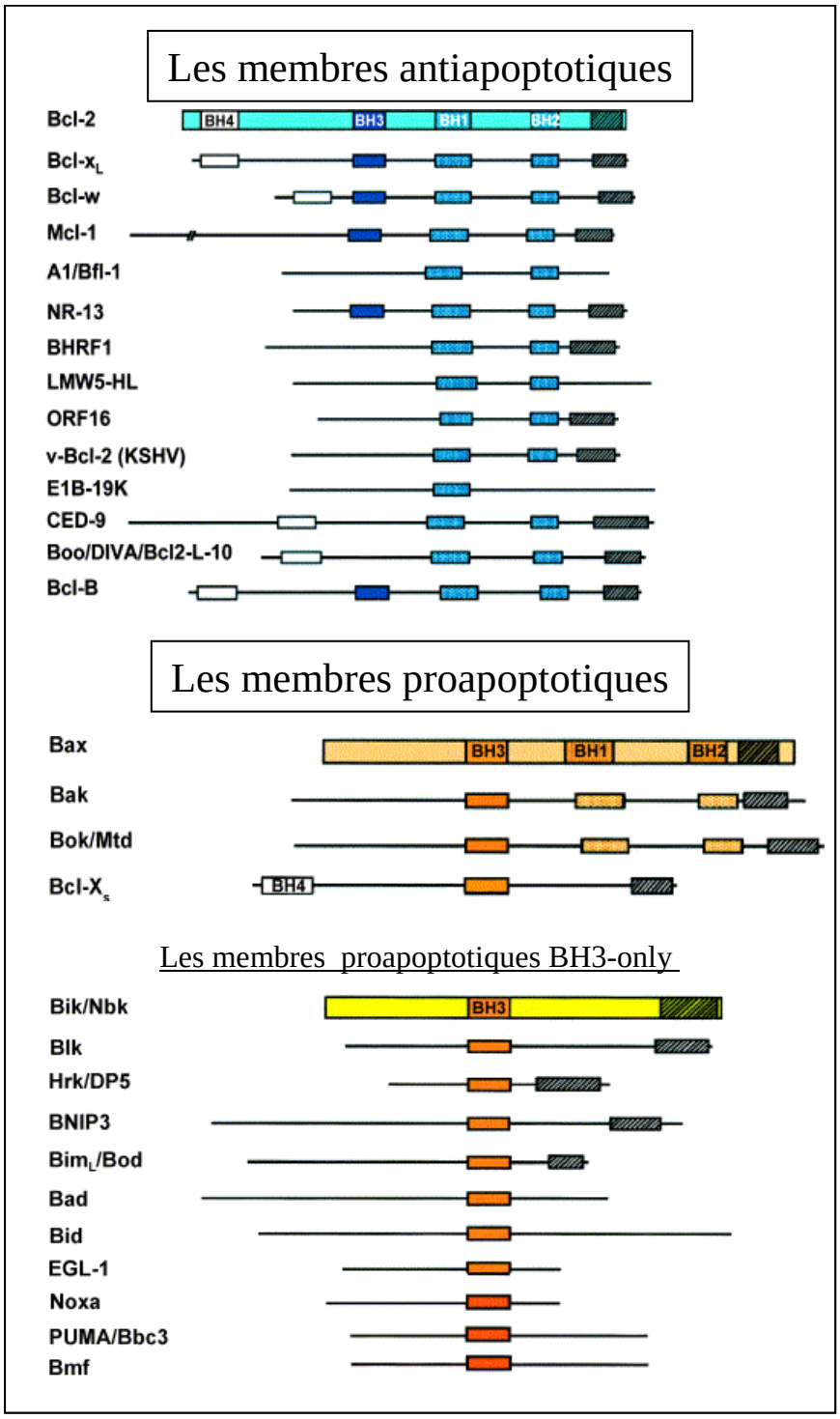

Schéma n°6: Les protéines de la famille Bcl-2 (BornerC 2003)

Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en deux familles : les membres antiapoptotiques et les membres proapoptotiques. Ces protéines possèdent toutes de 1 à 4 domaines BH (pour Bcl-2 homology) et pour certaines un domaine de localisation à la membrane mitochondriale (domaine hachuré sur le schéma). Ces protéines contrôlent la sortie du cytochrome c mitochondrial. En simplifiant, Bax et Bak sont responsables de la sortie du cytochrome c. Bax et Bak sont inhibées par Bcl-2 et $Bclx_L$.

a) La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

La sortie du cytochrome c est initiée par l'oligomérisation des protéines proapoptotiques Bax/Bak (476). Dans les cellules saines, Bak est maintenue à la membrane mitochondriale dans un état inactif, tandis que Bax est séquestrée dans le cytosol par des interactions avec plusieurs protéines, y compris Ku-70 ,14-3-3, et le peptide de humanin (pour revue (44)). De nombreux signaux de mort peuvent déclencher la translocation de Bax, suivie de son insertion dans la membrane externe mitochondriale où elle forme des homo-oligomères ou des hétéro oligomères avec BAK.

Le couple Bax/Bak pourait agir sur le canal VDAC (pour Voltage-Dependent Anion Channel) localisé à la membrane externe mitochondriale, pour former un canal permettant le passage du cytochrome c (402). Il est aussi possible que BAX et BAK coopèrent avec le mtPTP (pour mitochondrial Permeability Transition Pore) ce qui conduirait à la rupture de la membrane externe mitochondriale permettant alors la sortie du cytochrome c et de protéines plus volumineuses (pour revue (197)).

Les protéines de survie comme Bcl-x_L ou Bcl-2 sont localisées à la membrane externe de la mitochondrie où elles ont pour rôle d'inhiber l'oligomérisation de Bax/Bak.

Les protéines proapoptotiques BH3-only telles que Bad, Bid et Bim fonctionneraient en amont de Bax et de Bak en empêchant leur inhibition par les protéines Bcl2 et Bcl-x_L (pour revue (197)).

Le clivage de Bid par la caspase 8, par le granzyme B (278) ou par les cathepsines lysosomales (82) active son potentiel proapoptotique et permet d'amplifier la réponse a induite par les récepteurs de mort ou lors de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques en activant la voie mitochondriale.

2.3 L'apoptosome

Une fois dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec le domaine carboxy terminal de Apaf1 (pour Apoptotic protease-activating factor 1) (182) et permet en présence de nucléotides de démasquer les domaines clés d'Apaf1, les domaines WD40 et le domaine CARD. Les domaines WD40 permettent la multimérisation d'Apaf1 et le domaine CARD permet de recruter la procaspase initiatrice procaspase 9 via son propre domaine CARD. La

structure tridimensionnelle de l'apoptosome a été résolue par cryomicroscopie électronique (1). L'apoptosome serait formé par sept molécules d'Apaf1 qui interagissent entre elles au niveau de leur extrémité amino terminale pour former une sorte de roue.

Les domaines CARD d'Apaf1 se retrouvent au centre de l'apoptosome qui est, comme le DISC, un inducteur de proximité qui permet de concentrer localement la procaspase 9. L'association entre Apaf-1 et la caspase 9 forme un complexe holoenzymatique qui d'une part active la caspase 9 par dimérisation et clivage auto-protéolytique et d'autre part augmente son activité enzymatique (366). Le clivage autoprotéolytique de caspase 9 se fait au niveau de son résidu D315 (418), il faut noter que ce clivage n'est pas nécessaire à son activité mais il est bien le reflet de son activation (366, 417). Une fois activée la caspase 9 peut alors cliver les caspases exécutrices comme les caspase 3 et 7. La caspase 3 active une boucle de rétrocontrôle positif en clivant la caspase 9 au niveau de son résidu D330 , ce qui empêche l'interaction de caspase 9 avec son inhibiteur XIAP (531).

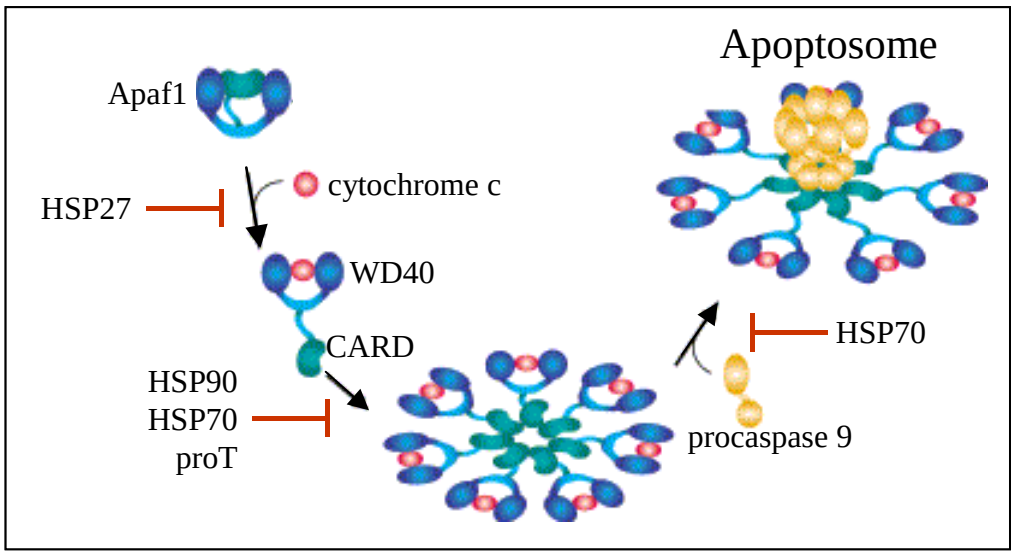

Schéma n°7 : La formation de l'Apoptosome et son inactivation (Green DR)

Dans le cytoplasme, le cytochrome c vient se fixer au domaine WD40 de la protéine Apaf1, entraînant un changement de conformation qui permet l'oligomérisation d'Apaf1 sous forme d'heptamère. Les domaines CARD des molécules d'Apaf1 se retrouvent au centre de l'Apoptosome et vont pouvoir recruter des procaspases 9. Cette disposition des domaines CARD d'Apaf1 permet de concentrer les procaspases 9, ce qui favorise leur activation par dimérisation. Les différentes étapes de formations de l'Apoptosome sont inhibées par plusieurs protéines antiapoptotiques. HSP27 inhibe la fixation du cytochrome c à Apaf1 ; proT, HSP70 et 90 inhibent la multimérisation d'Apaf1 et HSP70 inhibe le recrutement de la procaspase 9.

a) Le contrôle de l'apoptosome

Les protéines chaperones HSP (pour heat shock protein) qui sont induites lors de différents stress comme l'élévation de la température ou la carence en glucose, facilitent la formation tridimensionnelle des protéines et la survie des cellules. Les HSP ont été aussi impliquées dans l'inhibition de l'apoptosome. HSP27 se fixe au cytochrome c et l'empêche d'interagir avec Apaf1 (49), HSP90 se fixe à Apaf1 et inhibe son oligomérisation (322) et HSP70 empêche l'oligomérisation d'Apaf1 (376) et le recrutement de caspase 9 (24). Récemment, l'équipe du Dr Wang a isolé deux autres protéines régulatrices de l'apoptosome. La prothymosine α (ProT) qui inhibe la multimérisation d'Apaf1 et PHAP (pour HLA-DR-Associated pProtein) qui favorise l'activation de caspase 9 (196). Cependant leur mécanisme d'action est encore inconnu.

3 L'apoptose et les tumeurs

3.1 Les voies proapoptotiques sont inhibées dans les cellules tumorales

De nombreux exemples montrent clairement que le développement tumoral requiert obligatoirement l'inactivation des processus apoptotiques qui tendent à éliminer les cellules qui prolifèrent de façon anarchique (pour revue (155)). La pression de sélection durant le développement tumoral cause l'émergence de mutations somatiques favorisant la survie cellulaire. Le gène bcl-2 a été identifié à cause d'une translocation chromosomique qui en fait un oncogène dans les lymphomes folliculaires, la protéine Bcl-2 n'a pourtant pas un rôle dans le contrôle de la division cellulaire mais elle inhibe l'apoptose mitochondriale. Le gène antiapoptotique bcl-2 est surexprimé dans de nombreuses autres tumeurs. Le gène Apaf-1, qui code pour un composant essentiel de la machinerie apoptotique est sousexprimé dans les mélanomes et les lignées leucémiques, conséquence de la méthylation de son promoteur pendant la transformation cellulaire. (199).

a) p53

La protéine p53 est un facteur de transcription dont le rôle est de contrôler l'intégrité du génome avant la réplication de l'ADN. L'expression de p53 est contrôlée en permanence par la protéine MDM2, qui se fixe à p53 et entraîne sa dégradation par le protéasome. Lorsque le génome subit des altérations, la liaison entre p53 et MDM2 est inhibée par différents mécanismes post-traductionnels et p53 s'accumule, induisant l'expression de ses gènes cibles. P53 induit l'expression de p21, l'inhibiteur du cycle cellulaire, mais aussi des gènes proapoptotiques comme Bax et DR5. L'arrêt dans le cycle permet la réparation de l'ADN et la répression de p53. Lorsque les dommages causés à l'ADN sont trop importants, l'activation prolongée de p53 induit l'accumulation des protéines proapoptotiques et déclenche la mort cellulaire (410). La perte de fonctionnalité de la protéine p53 et cela dans 50% des tumeurs humaines (174) a pour conséquence la résistance des cellules tumorales à la mort, ce qui entraîne l'accumulation d'aberrations génétiques et la progression tumorale.

3.2 Relations entre les voies de signalisation et l'apoptose

La "pleiotropie antagoniste" est le terme inventé par D. Green et G. Evans pour montrer que les voies qui stimulent la prolifération entraînent aussi la mort cellulaire (155).
Il a été montré que certains oncogènes comme cMyc ont la faculté de favoriser simultanément la prolifération et la mort cellulaire. Aussi longtemps que les facteurs de survie appropriés sont présents, l'expression des oncogènes entraîne la prolifération cellulaire. Cependant, en l'absence de facteurs trophiques pour compenser les signaux de mort, l'expression desoncogènes accélère alors la mise en place du processus apoptotique. Le proto-oncogène cMyc joue un rôle important dans la prolifération cellulaire en favorisant l'activité du complexe Cycline E/Cdk2 et en augmentant l'expression des facteurs de transcription eIF4E et eIF2α. La surexpression de cMyc favorise la transformation *in vitro* des fibroblastes par *Ras* ou *v-abl* et le développement tumoral *in vivo*. Cependant il a été aussi montré que cMyc favorise la mort cellulaire induite par différents stimuli en activant les protéines Bax et p53 (pour revue (332)) et en augmentant l'expression d'Apaf1 et des caspases via le facteur de transcription E2F-1 (pour revue (26)).

De façon similaire, la voie de signalisation du récepteur à l'IGF et la voie de signalisation de NFκB contrôlent la balance prolifération/mort cellulaire. La signalisation du récepteur IGF1R est habituellement impliquée dans la survie des cellules normales et tumorales. Cependant la surexpression du récepteur IGF1R inoccupé ou de sa seule partie cytoplasmique induit une mort cellulaire par nécrose, indépendante de la voie mitochondriale et de l'activation des caspases (414). La voie NFκB qui joue un rôle important dans l'induction de gènes codant pour des facteurs antiapoptotiques comme les IAPs, la protéine FLIP et la protéine Bcl_{XL} (pour revue (204)), peut en parallèle induire des gènes proapoptotiques comme le récepteur de mort Fas, son ligand FasL ou les récepteurs de mort DR4, DR5 et DR6 (pour revue (344)) Le destin des cellules est lié en permanence à l'intégration des signaux pro- et anti-apoptotiques.

B Les voies de signalisation des MAPK

Les cellules perçoivent les changements de leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs, le plus souvent membranaires. Ces récepteurs vont transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule en activant une série de modifications protéiques ou « cascade de signalisation » qui va permettre à la cellule de réagir.
Les voies de signalisation des MAPK (pour Mitogen Activated Protein Kinase) permettent l'engagement rapide d'un programme d'expression génique en réponse à un stimulus. Ces voies de signalisation ont été extrêmement bien conservées au cours de l'évolution et sont constituées de protéines kinases qui s'activent en cascade et transmettent le signal par une suite d'interaction entre protéines. Les voies de signalisation des MAPK, comme celles de p38 (ERK6, SAPK3), de JNK et de MAPK1/3 (ERK2/1, p42p44MAPK) jouent un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire.

I Les voies de signalisation de JNK et p38

Les kinases JNK et p38 appartiennent à la famille des SAPK (pour Stress-Activated Protein Kinase)

1 La voie JNK

La voie JNK (pour c-Jun NH2-terminal Kinase) est activée par les stimuli de stress comme le choc thermique ou osmotique, les cytokines inflammatoires comme le TNFα, les rayons ionisants et les inhibiteurs de la synthèse protéique. Il existe trois isoformes de la kinase JNK : JNK1(MAPK8), JNK2(MAPK9) et JNK3(MAPK10) (102, 230), et chacune est exprimée sous deux formes, une longue de 55KDa et une courte de 46KDa (162). Les kinases JNK sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation (motif TPY) par les MAPK Kinases MKK4 et 7, qui sont elles-mêmes activées par plusieurs MAPKK Kinases comme MEKK1/2/3/4, MLK (pour mixed lineage kinase),

MUK (pour MAPK Upstream Kinase) /DLK/ ZPK, TAK (pour TGFβ Activated Kinase), Tpl2 (pour Tumor progression locus) ou encore ASK1 (pour Apoptotic Signal regulated Kinase) (pour revue (229)). Une fois activées, les kinases JNK transloquent dans le noyau pour y activer (ATF2) ou inhiber (c-jun) des facteurs de transcription par phosphorylation. La voie JNK joue un rôle important lors de l'inflammation en induisant le TNFα ou en stabilisant les ARNm d'IL2, d'IL3 et du VEGF-A. La voie JNK est activée par de nombreux stimuli proapoptotiques comme les UV, l'activation de Fas ou les céramides (pour revue (253)). Elle joue un rôle important dans l'induction de la mort cellulaire, en particulier dans les neurones : l'inactivation de *jnk*1 et *jnk*2 diminue l'apoptose des neurones durant le développement (225, 374) et l'inactivation de *jnk*3 diminue l'apoptose neuronale suite au traitement au kaïnate (502). L'une des fonctions de la voie JNK serait d'activer la kinase proapoptotique ASK1 (75).

2 La voie p38

Comme JNK, la voie p38 est activée par le stress thermique et osmotique et les cytokines inflammatoires. La voie p38 est composée de quatre protéines p38α/Mpk2/CSBP, p38β, p38δ/SAPK4 et p38γ/SAPK3. Les p38 sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation TGY par les MAPK Kinases MKK3, 4 et 6 (40, 103). Les MAPKK impliquées dans la voie p38 sont TAK1 ASK1/MAPKKK5, MUK/DLK/ ZPK, MLK3 et MEKK4 (pour revue (515)). La voie p38 joue un rôle important dans l'induction des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (217) et dans la différenciation des neurones et des myoblastes (351). La voie p38 est aussi impliquée dans l'apoptose induite par Fas (200) par la perte d'ancrage (61) et pourrait jouer un rôle synergique avec la voie JNK dans l'induction de l'apoptose comme lors de l'enlèvement de NGF dans les cellules PC12 (493).

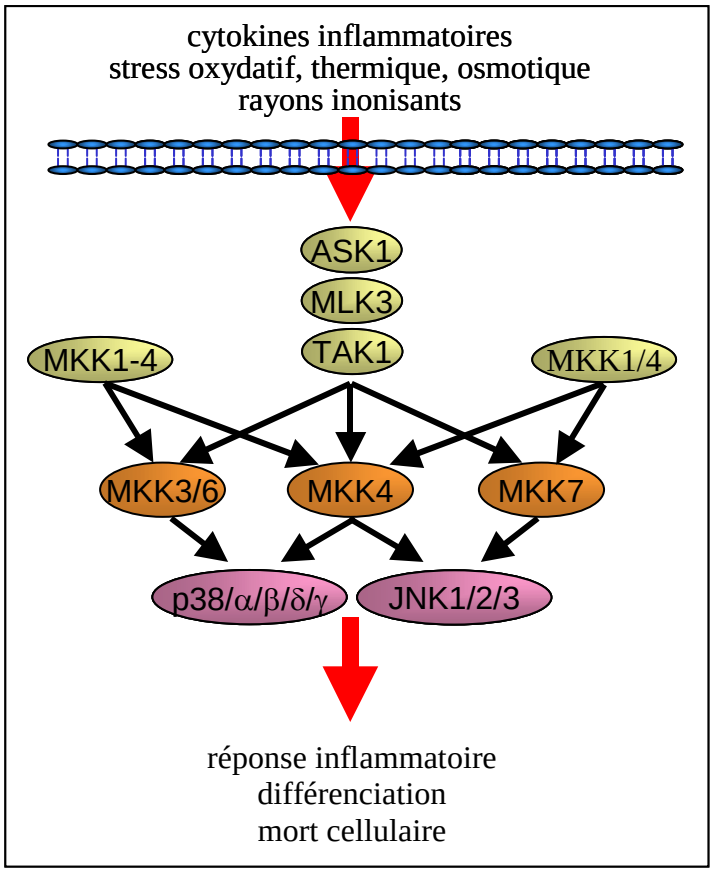

Schéma n°8: La voie des kinases de stress JNK/p38MAPK

Les voies de signalisation des kinases JNK et p38 appartiennent à la famille des SAPK (pour stress-activated protein kinase). Comme JNK, la voie p38 est activée par différents stress extracellulaires et les cytokines inflammatoires. Les voies des kinases JNK/p38MAPK sont composées d'un module multi-protéique comportant différentes protéines kinases activées par phosphorylation selon un ordre hiérarchique : les MKKK activent les MKK qui activent finalement les MPAK JNK ou p38.

II La voie Ras/Raf/MAPK

La voie des MAPK1/3 est composée d'un module multi-protéique où les kinases Raf, MEK et MAPK1/3 sont activées en cascade par des phosphorylations séquentielles. La stimulation des récepteurs membranaires couplés à Ras, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, active la kinase initiatrice de la voie des MAPK1/3, Raf, par un mécanisme complexe impliquant à la fois la phosphorylation et la déphosphorylation. Raf active les kinases à spécificité tyrosine et thréonine MEK1 et MEK2 qui activent à leur tour les kinases MAPK1 et MAPK3. Les kinases MAPK1/3 vont transmettre le signal généré par les récepteurs en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments sub-cellulaires, ce qui conduit à l'exécution de fonctions biologiques aussi diverses que la prolifération cellulaire, la différentiation cellulaire et la migration cellulaire.

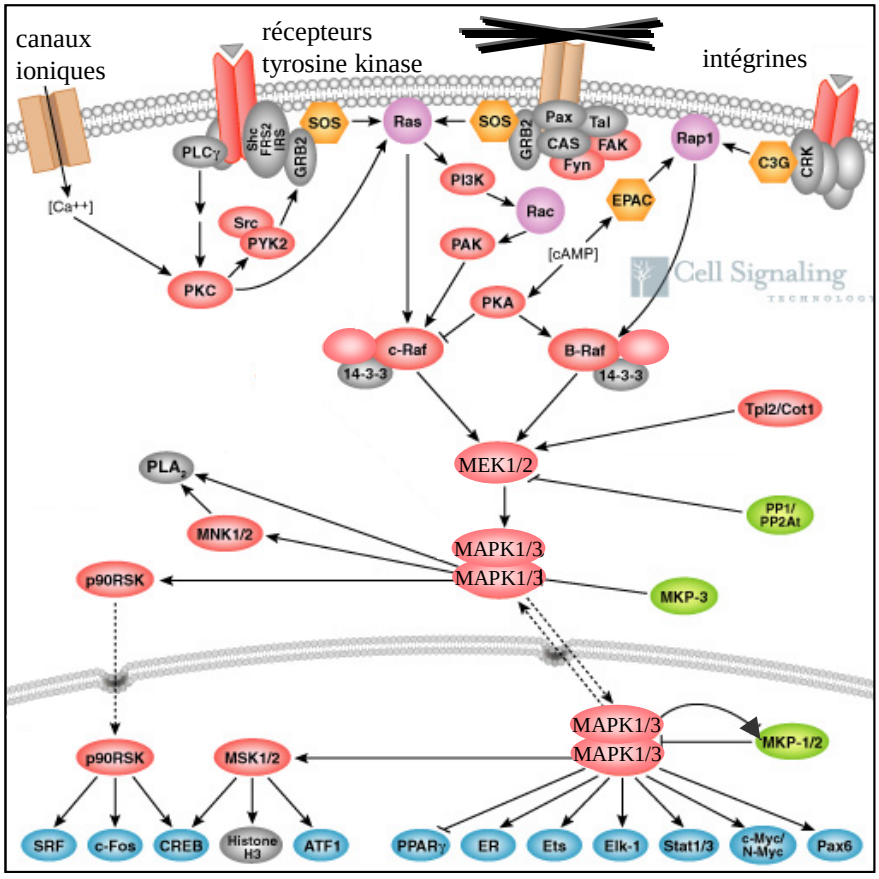

Schéma n°9: La voie de signalisation Raf/MAPK (Cell signaling 2005)

La stimulation des récepteurs membranaires couplés à Ras, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, active Raf par un mécanisme complexe. La kinase Raf, initiatrice de la voie des MAPK1/3, active par une double phosphorylation les kinases à spécificité tyrosine et thréonine MEK1/2 qui phosphorylent et activent les kinases MAPK1/3. Les MAPK1/3 activées sont libérées du complexe et transmettent le signal généré par les récepteurs en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments sub-cellulaires.

1 L’activation de Ras par les récepteurs à activité tyrosine kinase

Suite à la stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur à l’EGF, les protéines SOS1 et 2 (pour Son Of Sevenless) sont relocalisées du cytoplasme vers la membrane plasmique où elles se lient à la protéine GRB2 (pour Growth-factor-Receptor-Bound protein 2). SOS, qui est une protéine facteur d’échange GDP contre GTP, induit un changement de conformation de la protéine membranaire Ras, en catalysant la transformation de la forme Ras-GDP à la forme active Ras-GTP (pour revue (114)).

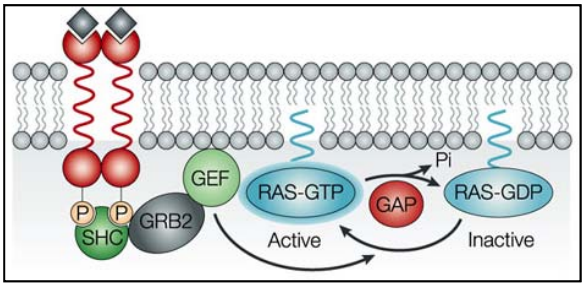

Schéma n°10: L’activation de Ras (Downward J 2003)

Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de la protéine Ras : H-Ras, N-Ras et K-Ras 4A et 4B codées par trois gènes, le gène K-*ras* étant régulé par épissage alternatif. L’une des fonctions de ces protéines est de recruter et d’activer Raf à la membrane plasmique. Bien que chacune de ces 4 isoformes s’associe à la kinase Raf, elles n’ont pas la même efficacité pour l’activer. Ainsi *in vitro* K-ras est la plus efficace de ces isoformes pour activer la voie des MAPK1/3 (465, 501). Il a été montré récemment que le signal de prénylation de H-Ras et K-Ras pouvait les localiser à la membrane du réticulum endoplasmique et du golgi où elles peuvent activer la voie Raf/MAPK (77).

2 La kinase Raf

La kinase Raf est exprimée chez l'homme sous trois isoformes A-Raf, B-Raf et C-Raf ou Raf1. L'isoforme Raf1 est exprimée fortement dans tous les tissus tandis que A-Raf est exprimée dans les tissus urogénitaux et dans les muscles, et B-Raf dans les neurones, les testicules et les cellules hématopoïétiques (pour revue (79, 216). De plus, l'épissage alternatif du gène B-*raf* conduit à 10 isoformes possédant toutes le domaine de fixation à Ras et le domaine kinase. Ces isoformes diffèrent au niveau des deux premiers exons et des exons 8b et 10a. La présence de l'exon 10a augmente l'activation de MEK par B-Raf alors que la présence de l'exon 8a fait l'inverse (pour revue (340)). Les kinases Raf possèdent trois régions conservées, les régions CR1,CR2 et CR3. La région CR1 contient deux domaines de liaison à Ras : le domaine de liaison à Ras (domaine RBD pour Ras binding domain) et le domaine CRD riche en cystéine. Le domaine CR2 est riche en résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation de Raf. Le domaine CR3 carboxy-terminal correspond au domaine kinase de Raf.

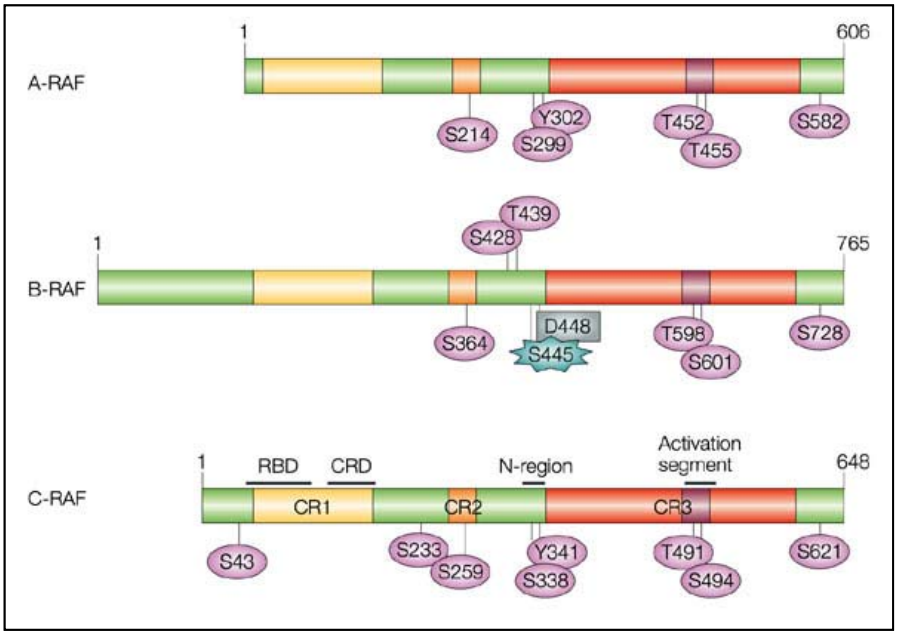

Schéma n°11: Les trois isoformes de Raf (Wellbrock C 2004)

La kinase Raf est exprimée chez l'homme sous trois isoformes A-Raf, B-Raf et C-Raf ou Raf1. Les kinases Raf possèdent trois régions conservées, les régions CR1,CR2 et CR3. La région CR1 contient deux domaines de liaison à Ras, le domaine de liaison à Ras (domaine RBD pour Ras binding domain) et le domaine CRD riche en cystéine. Le domaine CR2 est riche en résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation de Raf. Le domaine CR3 carboxy terminal correspond au domaine kinase de Raf. Ce domaine possède aussi plusieurs sites de phosphorylation contrôlant l'activité de Raf, notamment les sites du segment d'activation.

2.1 L'activation de Raf

a) La fixation de Ras

La forme inactive de Raf est une forme auto-inhibée qui provient de l'association de la partie amino terminale de Raf avec le domaine kinase carboxy terminal. Cette structure de Raf-1 est stabilisée par la protéine 14-3-3, liée aux résidus phosphorylés S259 et S621 de Raf-1 (455). La sérine 259 est phosphorylée par PKA (107) et par AKT (367, 529) ; la sérine 621 est phosphorylée par PKA (294).

Lorsque Ras est activée sous sa forme Ras-GTP, elle s'associe avec la région RBD du domaine CR1 de Raf, ce qui relocalise Raf du cytosol vers la membrane plasmique.

L'association de Ras à Raf déplace la protéine chaperone 14-3-3 du résidu S259 du domaine CR2, ce qui permet aux phosphatases PP1 et PP2A de se fixer à Raf-1 et de déphosphoryler la Ser259 (194, 405). Cette déphosphorylation du résidu S259 permet de dissocier le domaine CR2 du domaine kinase CR3 de Raf qui était bloqué et inhibé (87). Le résidu équivalent à la S259, a été conservé chez A-Raf (résidu S214) et chez B-Raf (résidu S364). La sérine 364 de B-Raf est phosphorylée par la protéine kinase SGK (pour Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase), elle-même activée par PDK1 (516).

b) La phosphorylation du domaine CR2

L'activation de Raf-1 se poursuit par la phosphorylation des résidus sérines S338 et S339 et sur des résidus tyrosines Y340 et Y341. Les deux sérines sont phosphorylées par les kinases PAK1 et PAK3, activées par les petites protéines G Rho et Cdc42 et par la PI 3K (108, 213, 438). Les tyrosines Y340 et Y341 de Raf-1 sont phosphorylées par Src (131). Ces deux phosphorylations sont nécessaires et agissent en synergie pour permettre l'activation complète de Raf1 (279). Elles joueraient un rôle dans le maintien de Raf-1 à la membrane (149).

Les résidus S338 et Y341 sont conservés chez A-raf (résidus S299 et Y302) et semblent nécessaires à son activation (270).

Par contre B-Raf possède deux résidus chargés négativement, D447 et D448, qui miment la phosphorylation des tyrosines 340 et 341 chez Raf-1. L'équivalent de la Ser338 de Raf-1 est la S445 qui est constitutivement phosphorylée. Ces modifications expliquent pourquoi B-Raf est activée plus facilement que Raf-1 ou A-Raf (pour rev (79)).

c) La phosphorylation du domaine kinase

L'activation de Raf1 se conclut par la phosphorylation de la boucle d'activation de son domaine kinase, au niveau des résidus T491 et S494 du segment d'activation du domaine kinase, par des kinases encore inconnues. Ces résidus importants sont conservés entre les trois isoformes de Raf (résidus T452 et T455 pour A-Raf et résidus T598 et S601 pour B-Raf) et sont nécessaires pour l'activité kinase de Raf.
La cristallisation de B-Raf avec l'inhibiteur pharmacologique BAY43-90006 a permis de montrer que ces phosphorylations stabilisent la conformation active du domaine kinase (469). Chez l'homme, 90% des formes oncogéniques de B-Raf portent la mutation V599E, mutation phosphomimétique qui rend B-Raf constitutivement active (92).

d) L'inhibition de Raf

L'arrêt d'activation de Raf-1 par détachement de Ras vient de sa phosphorylation sur le résidu S43 ce qui diminue l'affinité de Ras pour Raf-1 (120, 490). Récemment il a été montré que les kinase MAPK1/3 induisent une boucle de rétrocontrôle qui inhibe Raf par phosphorylation du résidu S43 ainsi que d'autres résidus (S29, S289, S296, S301 et S642) (113).

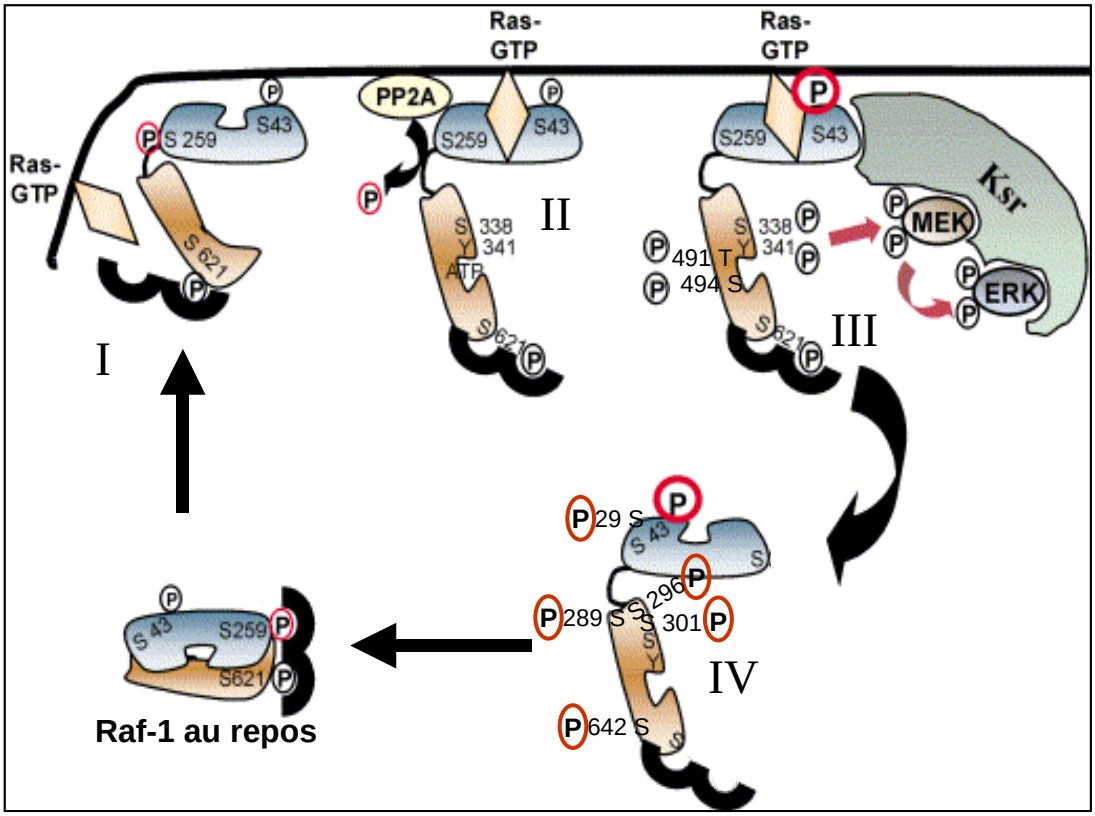

Schéma n°12 : le modèle d'activation de Raf-1

La kinase Raf-1 est activée en trois étapes. Etape I : la fixation de RasGTP permet la relocalisation membranaire de Raf. Etape II : Raf est déphosphorylée sur sa sérine 259 par PP2A. Etape III : Raf est activée par phosphorylation au niveau du domaine CR2 (S338/Y341) et du segment d'activation du domaine kinase T491/S494). L'inactivation de Raf1 se fait par phosphorylation de différents résidus (étape IV)

3 Les kinases MEK1 et MEK2

MEK1 et MEK2 sont des protéines kinase à double spécificité sérine/thréonine. MEK1 (45KDa) et MEK2 (47KDa) présentent 80% d'homologie entre elles et diffèrent au niveau de leur extrémité carboxy-terminale (521). Il existe une forme épissée de MEK1, MEK1b, qui ne présente plus d'activité kinase (521). Ces deux kinases ne partagent pas le même profil d'expression. Chez la souris il a été montré que MEK2 est exprimée fortement dans tous les tissus embryonnaires alors que MEK1 semble être exprimée plus fortement chez l'adulte (5). En plus de leur domaine kinase, les kinases MEK possèdent trois domaines importants : un domaine de liaison aux MAPK, un domaine NES d'export nucléaire et un domaine riche en proline (pour revue (74)).

Le domaine D de fixation aux MAPK se situe à l'extrémité amino terminale des MEK et contient des résidus basiques et hydrophobes qui interagissent avec le domaine CD des MAPK, qui lui contient des résidus acides. Le domaine NES d'export nucléaire est lui aussi situé dans la partie amino terminale de MEK. Ce domaine favorise la localisation cytoplasmique des kinases MEK (241, 450) et contribue à augmenter l'export nucléaire des MAPK (2). La délétion de cette séquence augmente d'ailleurs l'activation des MAPK ainsi que les capacités de transformation de MEK (140).
Le domaine riche en proline est situé dans la partie carboxy terminale et permet l'interaction avec des protéines à domaine SH3 comme MP-1 (385) et Grb10 (307).

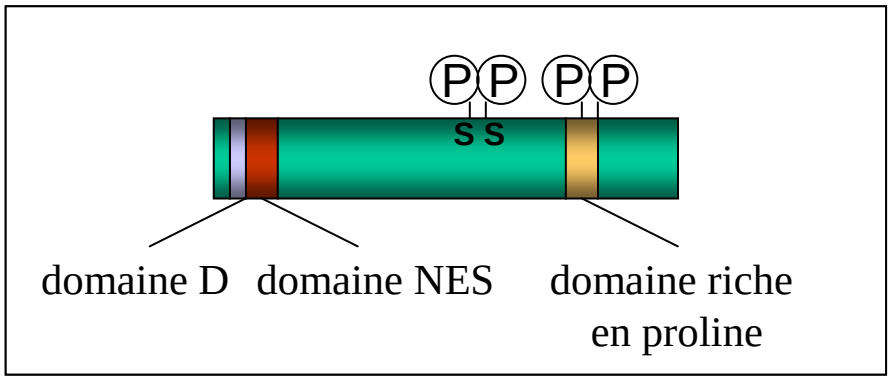

Schéma n°13 : La kinase MEK

3.1 L'activation des MEK

Les kinases MEK1/2 sont phosphorylées par Raf sur deux résidus sérine, les résidus S218 et S222 dans le cas de MEK1 et S222/226 pour MEK2 (520). Le remplacement de ces deux résidus par des résidus chargés négativement permet l'activation constitutive des MEK (268). Les trois isoformes de Raf n'activent pas les kinases MEK avec la même efficacité. La kinase A-Raf est l'isoforme qui active le moins bien MEK tandis que B-Raf est la meilleure. B-Raf présente la meilleur affinité de liaison à MEK1/2 et présente la plus forte activité kinase envers MEK (270, 324, 350).
MEK1 est aussi phosphorylée sur son résidu S298 par PAK, ce qui augmente l'association de MEK avec Raf et avec MAPK1 (139, 408). A l'inverse, la phosphorylation de MEK1 par les MAPK sur son résidu T292 empêche la phosphorylation de MEK par PAK, diminuant ainsi l'activité de MEK (122).

3.2 Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK et leurs limites

Il existe des inhibiteurs spécifiques des kinases MEK. Ces inhibiteurs, le U0126 (133), le PD98059 (7, 118) et le PD184352 (391) sont des inhibiteurs non compétitif de la fixation de l'ATP qui bloquent la kinase MEK dans une forme inactivable par Raf. De nombreux travaux de recherche sue la voie des MAPK1/3 sont basés uniquement sur l'utilisation de ces inhibiteurs, et l'interprétation de ces travaux présente des limites. Tout d'abord il faut savoir que l'inhibiteur le plus utilisé, le PD98059, a une durée de vie courte (inf. à 24h) (389) et n'inhibe pas la forme active de MEK (7). De plus, plusieurs études dont celle du groupe du Dr P Cohen (93) montrent que ces inhibiteurs peuvent avoir des effets non spécifiques importants. Les inhibiteurs PD98059 et U0126 inhibent la kinase MEK5 (201). Dans des vésicules pré-synaptiques (synaptosomes) isolées, le PD98059 bloque l'influx de calcium induit par la dépolarisation et le U0126 augmente la sortie de glutamate indépendamment du calcium (333). Certaines préparations commerciales de PD98059 activent de façon non spécifique le récepteur aux oestrogènes (259), récepteurs qui ont été impliqués dans la mort cellulaire. Le PD98059 peut aussi inhiber les cyclooxygénases 1 et 2, qui jouent un rôle important dans l'agrégation des plaquettes (37, 333), mais aussi dans la survie cellulaire en stabilisant la protéine survivin (224).

L'inhibiteur U0126 a des effets non spécifiques sur des résultats expérimentaux basés sur la fluorescence, comme la quantification de la mort par fixation de l'annexine V couplée au FITC. La composition chimique aromatique du U0126 peut augmenter la fluorescence et donc le signal de mort. (33). Enfin, il a été montré qu'en absence de glucose, le U0126 et le PD184161 ont un effet inhibiteur sur la sous-unité F0F1ATPase de l'ATP synthétase mitochondriale, ce qui induit une chûte de la production d'ATP et une augmentation de la mort des cellules par nécrose. Les auteurs n'excluent pas une inhibition de la phosphorylation de l'ATP synthétase dépendante de MEK. Cependant, en absence de glucose, les kinases de la voie de signalisation MAPK1/3 sont inactives (512).

Ces résultats peu discutés sont, à mon avis, importants, et doivent nous conduire à prendre des précautions sur les conclusions basées uniquement sur les effets de ces inhibiteurs.

4 Les MAPK1/3

Les MAPK1/3 aussi nommées ERK2/1 (pour Extracellular Regulated Kinase) ou p42/p44 MAPK (p42 et p44 correspondant à leur poids moléculaire respectif de 42 et 44KDa) sont les premiers membres de la famille MAPK à avoir été caractérisés (359). MAPK1 et MAPK3 sont exprimées de façon ubiquistes. Il existe un variant d'épissage alternatif de MAPK3, MAPK3b (513) qui n'interagit pas avec MEK, ainsi qu'un variant d'épissage alternatif de MAPK1 (150). Les MAPK possède à leur extrémité carboxy terminale un domaine CD riche en résidus acides, qui permet d'interagir avec leurs substrats au niveau de sites de fixation formés par des résidus basiques comme le domaine D de MEK.

4.1 L'activation des MAPK

Les MAPK sont activées par la phosphorylation concomitante des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation. MEK phosphoryle les résidus T202/Y204 pour MAPK1 et T185/Y187 pour MAPK3 (329, 365). Cette double phosphorylation est nécessaire à leur activité (346). Le mécanisme de phosphorylation pourrait nécessiter la dissociation et la ré association du complexe MEK/MAPK (54). Le premier résidu phosphorylé semble être le résidu tyrosine (134). Une fois activées, les MAPK se détachent de MEK et vont phosphoryler de nombreux substrats dans différents compartiments subcellulaires comme le récepteur à l'EGF membranaire, la protéine calnexine du réticulum endoplasmique, la phospholipase A2 cytosolique, la carbamyl phosphate synthetase mitochondriale ou encore les facteurs de transcription dans le noyau (pour revue (74)). Les MAPK phosphorylent les résidus sérine et thréonine de leurs substrats uniquement s'ils sont adjacents d'une proline et de préférence s'ils possèdent un autre résidu proline en position -2 (séquence consensus P-X-S/T-P). La phosphorylation des substrats permet de contrôler leur activité. Elle est souvent impliquée dans le contrôle de leur stabilité soit en empêchant leur dégradation par le protéasome comme dans le cas de c-Fos (315) ou de MKP1, soit en augmentant leur taux de dégradation comme pour MKP3 (272).

4.2 Le contrôle de l'activité des MAPK par les phosphatases

L’activité des MAPK qui nécessite leur phosphorylation sur les deux résidus thréonine et tyrosine de la boucle d'activation (346), est finement contrôlée par l’équilibre entre l’activité des kinases et des phosphatases qui ciblent ces deux résidus. Trois familles de phosphatases peuvent déphosphoryler les MAPK : les sérine /thréonine phosphatases comme PP2A (8), les phosphatases tyrosines spécifiques comme PTP-SL , STEP (439) ou HePTP (339), et les phosphatases à double spécificité DUSP (pour DUal Specificity Phosphatase) ou MKP (pour MAP Kinases Phosphatases). Cette famille de phosphatases comprend les phosphatases nucléaires MKP1/DUSP1 et MKP2/DUSP4 qui déphosphorylent les MAPK mais aussi P38MAPK et JNK, ainsi que la phosphatase cytosolique MKP3/DUSP6 qui ne déphosphoryle que les MAPK1/3 et MAPK5 (pour revue (59, 209, 347)). La voie MAPK induit l’expression de MKP1 et 2 (46) et leur stabilisation par phosphorylation directe (47). A l’inverse la phosphorylation de MKP3 par les MAPK favorise sa dégradation (272). Enfin il faut noter que les MKP1 (407) et MKP3 (60) sont activées par changement de conformation lors de leur association avec les MAPK1/3.

4.3 Localisation des MAPK

Les MAPK1/3 se déplacent de façon continue entre le cytoplasme et le noyau par simple diffusion (140), indépendamment de leur état d’activation (466). Il semble cependant que la localisation nucléaire des MAPK soit liée à leur capacité de dimériser (210). Selon les cellules et le type de stimulation, les MAPK peuvent s’accumuler dans l’un ou l’autre de ces compartiments. L'association des MAPK à MEK favorise leur localisation cytosolique à cause du domaine NES de MEK (2). Lors de leur activation par les agents mitogènes, les MAPK se détachent de MEK pour s'accumuler dans le noyau, une étape nécessaire pour la prolifération (241). Dans les astrocytes, l’expression de la protéine cytoplasmique PEA15 séquestre les MAPK dans le cytoplasme pour empêcher la prolifération (137).

4.4 La durée d’activation des MAPK

L’intensité et la durée d’activation des MAPK jouent un rôle majeur dans la réponse MAPK. Selon l’intensité du niveau d’activité des kinases MAPK, la voie Raf/MAPK favorise à la fois l’entrée en phase G1 du cycle en induisant la cycline D1 et le blocage des cellules en phase G1 en induisant l’inhibiteur de cdk2, p21. Ainsi une stimulation de faible intensité des MAPK permet d'induire la cycline D1 et favorise l’entrée des cellules en phase S (320). A l’inverse une forte activation des MAPK favorise l'induction de p21 et l’arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, par inhibition de l'activité de cyclin-cdk (394, 488).

La différenciation des cellules PC12 est l’exemple le plus utilisé pour illustrer la relation entre l'intensité de stimulation MAPK et la réponse biologique. Dans ce modèle cellulaire, la stimulation transitoire des MAPK avec des agents mitogéniques comme l’EGF permet la croissance, alors que l’activation prolongée des MAPK suite à la stimulation par des facteurs neurotrophiques comme le NGF entraîne l'arrêt du cycle de division et la différentiation des cellules en neurones. (274, 509).

5 Les protéines d'échafaudage de la voie Raf/MAPK

La spécificité d'action de la voie Raf/MAPK est assurée par des protéines d'échafaudage ou "scaffold protein". Les scaffolds assemblent les différents composant d'une cascade de signalisation pour former un module de signalisation, ce qui permet de séparer les différentes cascades de signalisation les unes des autres pour leur donner plus de spécificité.

5.1 14-3-3

La protéine 14-3-3 est une petite protéine ubiquiste, très conservée au long de l'évolution, qui joue de nombreux rôles dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la prolifération, la différentiation et l'apoptose. 14-3-3 est monomérique et se fixe par sa partie amino terminale à d'autres protéines changeant ainsi leur localisation subcellulaire ou leur association avec leurs partenaires. Cette fixation de 14-3-3 se fait sur de courtes séquences, et pour certaines, seulement si elles possèdent un résidu phosphorylé (303, 499). Raf-1 est la première protéine décrite s'associant à 14-3-3 et cette association stabilise à la fois les formes inactives et actives de Raf-1. Fixée aux S259 et S621 phosphorylées, 14-3-3 maintient Raf-1 dans une forme inactive auto inhibée. A l'inverse, 14-3-3 qui est dimérique, permettrait la dimérisation de Raf-1 et pourrait stabiliser la forme active de Raf (264, 448).

5.2 MP-1

La petite protéine MP1 (pour MEK1 Partner 1) se fixe spécifiquement à MAPK3 et MEK 1 mais pas à MAPK1, ni à MEK2, ni à Raf. La surexpression de MP1 augmente l'activation du module MEK1/MAPK3 par Raf et permet de les localiser au niveau des endosomes (385). MP1 interagit avec p14 une petite protéine de 14KDa localisée dans les endosomes tardifs (492). L'extinction de p14 par transfection de siRNA diminue fortement l'activation de la voie MAPK en réponse à l'EGF et empêche son activation dans les endosomes (442). MP1 se lie à MORG-1 (pour MAPK Organizer), une protéine composée de 7 domaines WD40. En plus de MP1, MORG1 s'associe *in vitro* avec les kinases MEK1/2, MAPK1/3 B-Raf et Raf-1 et se comporte comme une protéine scaffold (467).

5.3 Sur-8

Le gène de Sur-8 a été clôné chez le *C elegans*. Sur-8 jouerait le rôle de scaffold pour Ras et Raf en se fixant au domaine catalytique de Raf et en augmentant son activation par Ras. (404). Chez les mammifères, Sur-8 augmente l'activation de la voie Raf/MAPK en réponse à l'EGF en interagissant avec Ras et Raf-1 (246).

5.4 RKIP

RKIP (pour Raf Kinase Inhibitor Protein), peut se lier aux domaines kinases de Raf-1 et MEK et fonctionne comme un inhibiteur compétitif de l'activation de MEK par Raf1 (506). Lors de la stimulation mitogénique, l'interaction entre RKIP et Raf1 est inhibée par les PKC classiques et atypiques qui phosphorylent RKIP sur la sérine 153 (84). Cette phosphorylation permet alors à RKIP de se fixer à la kinase GRK-2 (pour G-protein-coupled Receptor Kinase 2) et d'inhiber l'activité kinase de GRK-2. Cela a pour conséquence de diminuer l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G et donc de prolonger l'activation de la voie Raf/MAPK (260).

5.5 KSR

KSR (pour Kinase Supressor of Ras) a été cloné chez la drosophile (444) et chez *C elegans* (219) (427) en cherchant un supresseur de Ras. Le rôle de KSR serait de rapprocher les kinases Raf, MEK et MAPK pour stabiliser leur association et créer un module de signalisation unique. MEK semble être associée à KSR de façon constitutive (300, 422), tandis que les MAPK1/3 et Raf-1 ne s'y associent que lorsque Ras est activé (55, 300, 445, 498). KSR présente toutes les caractéristiques d'une protéine scaffold. D'une part, lorsque elle est faiblement exprimée, KSR facilite l'activation de la voie Raf/MAPK, tandis qu'elle l'inhibe lorsque elle est surexprimée (55). Bien que le domaine carboxy terminal de KSR présente des homologies avec le domaine kinase de Raf, il ne possède pas les résidus nécessaires au site de fixation de l'ATP d'un domaine catalytique de protéine kinase (444).

L’invalidation de KSR chez la souris ne cause aucun problème de développement embryonnaire ni de fertilité, bien que l’activation de la voie MAPK1/3 par l’EGF soit diminuée (309). Cependant il faut noter qu’il existe deux isoformes de KSR chez *C elegans* et que seule la suppression simultanée des deux isoformes inhibe totalement l’activation de la voie MAPK (314). On pourrait émettre l’hypothèse qu’il existe chez les mammifères, une autre fonction redondante de KSR qui puisse compenser l’effet du KO.
Enfin il faut noter que l’équipe de White a découvert récemment la protéine IMP (pour Impedes Mitogenic signal Propagation) qui se lie à KSR et la séquestre sous une forme hyperphosphorylée hors de la membrane plasmique, ce qui inhibe l’activation des MAPK (280).

5.6 β-arrestine

Les β-arrestines sont des protéines scaffold impliquées dans le recrutement de complexes protéiques aux récepteurs couplés aux protéines G. Le domaine SH2 des β-arrestines peut recruter Src au récepteur β2-adrénergique qui l’activera et Src pourra alors participer à l’activation de Raf-1 (265). Raf-1 et MAPK1/3 se lient aussi à la β-arrestine suite à l’activation du récepteur PAR-2 (pour Proteinase–Activated Receptor), ce qui permet d’optimiser leur activation à la membrane (97). Il faut noter que β-arrestine sert aussi en parallèle de scaffold aux kinases de la voie JNK, JNK3 et ASK1 et permet de stimuler l’activation de la voie JNK, en parallèle au recrutement de kinases de la voie Raf/MAPK (284).

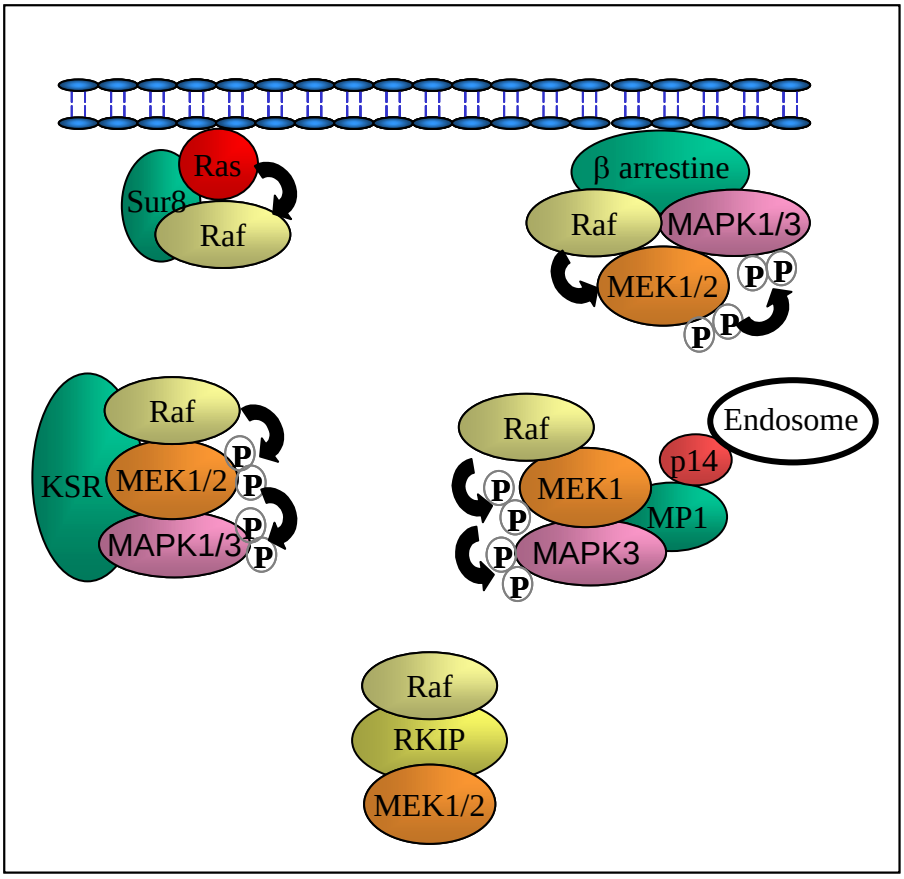

Schéma n°14 : Les protéines d'échafaudage de la voie MAPK

Les protéines d'échafaudage ont pour fonction de regrouper différentes protéines d'une même cascade de signalisation. La protéine KSR se fixe à Raf, MEK et MAPK et favorise l'activation de la voie des MAPK1/3. La protéine Sur8 se fixe à ras et Raf et favorise l'activation de Raf. La βarrestine se fixe à Raf et MAPK1/3 et favorise l'activation de la voie MAPK par les récepteurs couplés aux petites protéines G. MP1 se fixe à MEK1 et MAPK3 et favorise leur activation au niveau des endosomes.

6 Les fonctions de la voie des MAPK

6.1 MAPK et prolifération cellulaire

Lorsque l'on stimule des fibroblastes quiescents avec du sérum, les MAPK sont activées de façon biphasique avec un premier pic d'activation de 5 minutes, suivi d'un second pic atténué qui dure environ 1h, et un retour progressif au niveau basal avant la fin de la phase G1. Le second pic d'activation des MAPK est en correlation avec la progression des cellules en phase S (320). Cette activation permet l'induction de cycline D1 et l'activation du complexe Cdk4/cycline D1 nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire (233). L'activation des MAPK1/3 augmente la synthèse des nucléotides, en régulant l'activité de la CPSII (pour Carbamoyl Phosphate Synthetase II) (153), ainsi que la traduction en activant le facteur de traduction eIF4E (pour revue (356)). La voie Raf/MAPK favorise également la réorganisation de la chromatine et l'activation de certains gènes en phosphorylant le résidu serine 10 de l'histone H3 (523). Enfin les MAPK augmentent la prolifération cellulaire en activant directement les facteurs de transcription Elk, c-Fos, c-Jun, Ets1/2 et cMyc ou encore le facteur CREB via l'activation de Rsk (pour revue (71, 95).

6.2 La différenciation cellulaire

La voie MAPK joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire. Ainsi l'invalidation de *mapk1* provoque la létalité embryonnaire entre les jours embryonnaires J6.5 et J11.5 suite à l'absence de développement de l'ectoderme extra-embryonnaire, du cône ectoplacentaire, à l'absence de différentiation de la lignée conduisant au développement du mésoderme (373, 503), et à des défauts dans le développement du placenta (169)**.** L'invalidation de *mapk*3 provoque une altération de la différenciation des thymocytes en lymphocytes simples positifs CD4+ CD8+ (319). La voie Raf/MAPK a été impliquée aussi dans la différenciation de l'épithélium intestinal (441), des cellules musculaires (154) et des adipocytes (345).

6.3 La migration cellulaire

La voie des MAPK1/3 joue un rôle important dans la migration cellulaire et dans le remodelage de la matrice extracellulaire. L'invalidation de *mek1* (147) et de *raf*-1 (123) provoque un défaut de migration cellulaire. L'activation des MAPK favorise la migration en phosphorylant la kinase MLCK (pour Myosin Light Chain Kinase) (214) , la paxiline (256) et la calpain (148) qui sont impliquées dans la dynamique des adhésions focales. Les MAPK sont aussi impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire en activant les métalloprotéases (pour revue (183, 360)).

6.4 Fonctions neuronales

La voie Raf/MAPK est activée lors de la stimulation des récepteurs NMDA par le glutamate (494)**.** Les MAPK sont impliquées dans la modulation de la transmission synaptique en particulier lors de la libération de neurotransmetteurs (pour revue (431))**.** La voie Raf/MAPK joue un rôle dans la plasticité synaptique, notamment au cours du processus de potentialisation à long terme dans l'hippocampe qui permet l'apprentissage et la mémorisation (pour revue (431))**.** Ainsi les souris invalidées *mapk*3 ont une augmentation de leur capacité de mémorisation (281).

C Le contrôle de la mort cellulaire par la voie des MAPK

I Rôle antiapoptotique de la voie Raf/MAPK

1 La voie Raf/MAPK joue un rôle antiapoptotique dans les cellules tumorales

Les oncogènes, qui activent les voies de signalisation, contrôlent la prolifération mais aussi la survie des cellules tumorales. Plusieurs oncogènes sont impliqués dans l'activation de la voie des MAPK1/3. C'est le cas par exemple de récepteurs aux facteurs de croissance comme le récepteur HER2-Neu/c-erbB-2 qui est muté dans 30% des cancers du sein (185). En aval des récepteurs, la kinase Raf et les protéines impliquées dans son activation comme Shc, Grb2, Src, 14-3-3, PKC, PAK vont aussi être la cible de mutations oncogéniques. Le gène Ras qui joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie des MAPK1/3, est muté dans 15% à 30% des cancers (3, 477) (voir tableau 1, au dos de la p11) et l'isoforme B-Raf présente des mutations dans 8% des cancers (94). Ensemble, ces oncogènes favorisent l'activation constitutive de la voie des kinases MAPK1/3 dans près de 36% des lignées tumorales humaines (178). L'activation de la voie des MAPK1/3 est impliquée dans la dérégulation du cycle cellulaire et dans le caractère invasif des cellules tumorales pour revue (360).

Origine tumorale	Gène muté
colon	K-*ras* (45%), B-*raf* (12%)
pancréas	K-*ras* (90%)
ovaire	B-*raf* (30%)
prostate	-
mélanome	N-*ras* (15%), B-*raf* (66%)
poumon	N-*ras* (35%)
gliome	-
thyroïde	H-*ras*, N-*ras*, N-*ras*, (60%), B-*raf* (35-70%)
leucémie lymphoïde et myéloïde chronique	N-*ras* (*30-60%)

Tableau n°1: Les mutations de la voie Ras/MAPK dans les tumeurs ((238, 392))

1.1 Mutations oncogéniques dans la voie des MAPK chez l'homme

v-*raf* a été identifié à partir du génome du rétrovirus murin MSV-3611 (355) et B-*raf* a été isolé en même temps chez l'homme après transfection de cellules NIH3T3 par l'ADN humain d'un sarcome d'Ewing (186) et chez le poulet (où B-Raf a été nommé c-Rmil) après transduction rétrovirale (276, 277). Un autre cas d'activation de B-Raf par transfection de cellules NIH3T3 avec l'ADN d'un carcinome hépatocellulaire de souris a été rapporté (289). Chez l'homme seul B-raf a été retrouvé muté. B-raf présente diverses mutations dans 8% des lignées tumorales de toutes origines (voir tableau 2). Les mutations de B-raf ont une forte prévalence dans les mélanomes où elles sont présentes dans 80% des cas (94). Parmi les 45 mutations associées à B-raf, la mutation V599E d'un résidu de la boucle d'activation du domaine kinase est retrouvée dans 90% des cas. Cette mutation, qui favorise la transformation tumorale in vitro, rend l'activité kinase de B-Raf constitutive et augmente le niveau d'activité des kinases MEK et MAPK1/3. La cristallisation de B-Raf avec l'inhibiteur pharmacologique BAY43-90006 a permis de montrer que la mutation V599E mime la phosphorylation du résidu Thréonine 598 nécessaire à la conformation active du domaine kinase (469). Il est intéressant de noter que certaines mutations oncogéniques de B-Raf, comme la mutation G465V, n'augmentent pas l'activité kinase de B-Raf mais favorisent l'activation de Raf-1, et

par conséquent celle de MAPK1/3 (469). Enfin il faut noter que moins de 1% des lignées testées présentent à la fois des mutations de Ras et de B-Raf (94), ce qui indique une complémentation fonctionnelle entre ces gènes tous deux à l'origine de l'activation des MAPK1/3.

L'activité des kinases MEK et MAPK est souvent associée à la prolifération cellulaire mais, de façon paradoxale, on n'a pas trouvé de mutation oncogénique de leurs gènes. Une étude des polymorphismes associés aux gènes mek1 et mek2 dans des tumeurs humaines a révélé l'existence d'une seule mutation de l'isoforme MEK2, mutation qui conduit à un changement d'acide aminé (P298L), sans pour autant modifier son activité (21). Pourtant l'introduction in vitro des mutations S218D et S222D qui entraîne l'activation constitutive de MEK1, permet la transformation des cellules fibroblastiques et leur confère un caractère tumoral chez la souris (51, 86, 269). La boucle d'activation des kinases MEK et MAPK requiert la phosphorylation simultanée de deux résidus pour être pleinement active, la probabilité d'apparition de mutations activatrices de ces kinases est certainement plus faible que celle de l'apparition de mutations dans les voies de signalisation qui activent la voie des MAPK1/3 en amont ou au niveau de Raf.

Résidu muté	Fréquence*	Origine tumorale[#]
M116	0.1	mélanome (1)
I325	0.1	sein (1)
K438	0.2	poumon (2)
T439	0.1	poumon (1)
V458	0.1	poumon (1)
R461	0.1	colorectal (1)
I462	0.1	colorectal (1)
G463	0.5	colorectal (3), foie (1), ovaire (1)
G465	0.9	mélanome (7), poumon (2)
F467	0.1	Colo (1)
G468	1.9	mélanome (4), leucémie (4), colorectal (3), lymphome non Hodgkin(3), foie (2), poumon (2), adénocarcinome de Barret (1)
K474	0.1	mélanome (1)
N580	0.1	colorectal (1)
E585	0.1	ovaire (1)
D586	0.1	colorectal (1)
D593	1.0	colorectal (6), estomac (2), mélanome (1), lymphome non Hodgkin (1)
F594	0.3	colorectal (2), liver (1)
G595	0.2	colorectal (2)
L596	0.8	mélanome (3), poumon (3), foie (1), ovaire (1)
T598	0.1	colorectal (1)
T598-insertion	0.1	mélanome (1)
V599	91	mélanome (442), thyroïde(187), colorectal (179), ovaire (24), foie (11), sarcome (7), estomac (5), gliome (4), adénocarcinome de Barret (2), sein (1), épendyme (1), poumon (1)
V599-insertion	0.1	mélanome (1)
V599-délétion		
K600	1.0	thyroïde (4), mélanome (3), colorectal (3)
R681	0.1	endomètre (1)
A727	0.1	leucémie myéloïde chronique (1)

Tableau n°2 : Les mutations de B-Raf dans les tumeurs (pour revue (144))

* : fréquence de mutation du résidu par rapport à l'ensemble des mutations B-Raf

: le chiffre indique le nombre de fois où la mutation a été trouvée dans le type de cancer donné

a) L'oncogène B-Raf favorise la survie des mélanomes

Une étude menée par le NIH sur différentes lignées tumorales humaines a montré que les mélanomes sont les cellules les plus sensibles à l'inhibiteur pharmacologique de MEK, le PD98059 (218). Dans les mélanomes, l'inhibition de la voie des MAPK1/3 par le PD98059 ou le U0126, un autre inhibiteur pharmacologique de MEK, induit la mort cellulaire (218, 519). Dans les mélanomes exprimant B-Raf muté sur la valine 599, l'inhibition de l'activité Raf par l'inhibiteur pharmacologique BAY 43-9006 (203) ou l'extinction de B-Raf à l'aide de siRNA bloque la prolifération et induit aussi la mort cellulaire (57, 173, 203). Donc, dans les cellules mélanocytaires, la mutation du gène B-raf apporte un avantage sélectif à la transformation en mélanome en activant la voie des MAPK1/3 qui inhibe la mort cellulaire. Il serait intéressant de vérifier systématiquement si les formes oncogéniques de B-Raf favorisent la survie dans des tumeurs d'origines différentes.

b) L'activation de la voie des MAPK1/3 favorise la survie des cellules leucémiques

La voie des MAPK1/3 est activée de façon constitutive dans 50 à 70% des tumeurs de type leucémie myéloïdes ou lymphoïdes chronique (pour revue : (212, 238, 285). Une étude clinique de ce type de leucémie, révèle que les patients dont les tumeurs présentent une forte activation de la voie des MAPK1/3 ont un mauvais pronostique de survie (285). Dans ces tumeurs, la voie des MAPK1/3 est activée de façon constitutive en réponse à l'activité kinase de la protéine chimérique oncogénique BCR-Abl, qui résulte de la translocation chromosomique t(9;22). L'activation constitutive de la voie des MAPK1/3 est également marquée dans les lignées leucémiques qui surexpriment des récepteurs aux facteurs de croissance comme les récepteurs à l'IL-3 au, PDGF ou au GM-CSF (238). Enfin la voie des MAPK peut être activée par l'oncogène Ras qui est muté avec une prévalence de 20 à 60% dans les leucémies myéloïdes chroniques (238). L'inhibition pharmacologique de MEK par le PD98059 ou le PD184352, un troisième inhibiteur de MEK, arrête la croissance et suffit pour induire la mort cellulaire dans ces lignées tumorales (263, 285, 292).

Le PD184352 induit la mort plus rapidement et plus fortement en association avec d'autres drogues comme le STI571 (ou Gleevec), qui est un inhibiteur de BCR-Abl (510), ou comme, le UCN-01 une drogue dérivée de la staurosporine qui inhibe plusieurs kinases dont les PKC

(88, 89). D'autres études de combinaison du PD184352 avec l'ATRA (pour all-trans-retinoic-acid) (292) ou avec l'HA14-1, un inhibiteur de Bcl2 (291), obtiennent des résultats similaires. Dans les tumeurs de type leucémies myéloïdes chroniques, l'activation de la voie des MAPK1/3 par des oncogènes, joue donc un rôle important dans la survie cellulaire. Dans ce type de tumeur, les inhibiteurs de MEK comme le PD184352 pourraient améliorer l'efficacité des drogues chimiothérapeutiques comme le STI571 qui donne des résultats spectaculaires dans les tumeurs de type leucémie myéloïde chronique (116), mais aussi dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (98).

1.2 L'activation constitutive de la voie des MAPK favorise la croissance indépendante d'ancrage

Les cellules tumorales ayant la plus forte activité de la voie des MAPK sont souvent issues de tumeurs invasives et très agressives comme les carcinomes ou les sarcomes de Kaposi (287). Cela s'explique en partie par le rôle important que joue la voie des MAPK1/3 dans la migration cellulaire et dans le remodelage de la matrice (pour revue (183, 360)). In vitro, l'activation constitutive de la voie des MAPK permet également la croissance indépendante d'ancrage des lignées de cellules tumorales. La survie des cellules adhérentes requiert leur interaction avec la matrice extracellulaire et la perte d'ancrage chez ces cellules entraîne une forme de mort cellulaire programmée appelée anoïkis. Le contrôle de l'anoïkis fait l'objet de nombreuses études pour essayer de comprendre les mécanismes impliqués dans la survie des cellules tumorales métastatiques qui ont perdu le contact avec leur matrice d'origine (pour revue (424)). L'adhérence des cellules normales à leur matrice maintient l'activité des voies de signalisation nécessaires à la survie et réciproquement, l'activation soutenue de la voie des MAPK1/3 permet de bloquer la mort induite par la perte d'adhérence dans les cellules endothéliales HUVEC (12), les fibroblastes CCL39 (235), les cellules épithéliales MDCK (372) et les cellules de tumeur du sein MCF10 (388). Dans des cellules de carcinome de colon, l'activation constitutive de la voie des MAPK1/3 protège contre la mort cellulaire induite par la perte d'adhérence en permettant le maintien de l'expression du facteur de transcription Fra-1 (464). En bloquant la mort induite par perte d'ancrage, l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 favorise donc la croissance indépendante d'ancrage, une des caractéristiques de la transformation tumorale.

2 Rôle de la voie des MAPK dans la survie cellulaire durant le développement embryonnaire

La mort cellulaire programmée joue un rôle crucial à de nombreuses étapes du développement embryonnaire puisque l'invalidation des gènes codant pour les protéines proapoptotiques conduit à des défauts du développement mais elle doit être parfaitement contrôlée pour éviter la mortalité embryonnaire (18). Par exemple, l'invalidation de bcl-xL provoque une mortalité embryonnaire à partir du jour embryonnaire J 12.5, conséquence d'un excès d'apoptose pendant le développement du système vasculaire et du cerveau (299).

L'invalidation des gènes qui régulent la voie des MAPK a été réalisée dans plusieurs modèles génétiques et montre que l'activité de cette voie de signalisation est impliquée dans la survie cellulaire durant le développement embryonnaire.

2.1 L'invalidation de ras chez la souris

Chez la souris, l'invalidation de H-ras (130) (191), N-ras (457) ou la double invalidation H-ras N-ras (130) n'a aucune conséquence sur le développement et sur la mort cellulaire développe mentale. Par contre, l'invalidation de K-ras conduit selon le fond génétique à une mortalité entre les jours embryonnaires J12.5 et J18.5. Les défauts de développement du foie et du système nerveux sont dus à une augmentation de la mort cellulaire des cellules hépatiques et des motoneurones (198, 215). L'invalidation spécifique de l'isoforme K-ras 4A n'ayant pas de conséquence au niveau du développement (343), on peut conclure que l'isoforme K-Ras 4B est la seule isoforme de Ras impliquée dans la survie cellulaire au cours du développement. Il faut noter cependant que, contrairement à K-ras 4A, la surexpression de K-ras4B qui active pourtant fortement la voie des MAPK, ne permet pas la croissance des cellules en agar (465).

Il serait intéressant de vérifier au moins in vitro si l'invalidation de K-ras, qui affecte particulièrement l'activation de la voie des MAPK1/3, peut être compensée par des formes constitutivement activées de Raf-1 ou MEK.

2.2 L’invalidation de raf chez la souris

L’invalidation de A–raf conduit selon le fond génétique des souris, soit à une mortalité 21 jours après la naissance à la suite de malformations de l’appareil digestif, soit à des souris viables et fertiles avec cependant des dysfonctionnements neuronaux. L’invalidation de A-Raf ne provoque aucune modification au niveau de la mort cellulaire ni chez l’embryon, ni chez l’adulte (348).

L’invalidation de B-raf ou c-raf-1 par contre provoque une létalité embryonnaire associée à une augmentation de la mort cellulaire. Dans le cas de B-raf, l’arrêt du développement embryonnaire entre J10.5 et J12.5 est du à la mort des cellules endothéliales qui provoque une hémorragie massive (487). Dans le cas de c-raf-1, les embryons meurent entre les jours embryonnaires J9.5 et J13.5, à la suite de défauts du développement des vaisseaux sanguins, du placenta, du cerveau et du foie. Des coupes de tissus d’embryons c-raf-1-/- révèlent une augmentation de l’apoptose des cellules neuronales à J9.5 (184) et des cellules du foie à J12.5 (290). L’étude in vitro des cellules c-raf-1-/- montre une augmentation de la mort cellulaire spontanée des cellules hématopoïétiques (290) et fibroblastes embryonnaires (290), ainsi qu’une sensibilisation des fibroblastes embryonnaires à l’apoptose induite par enlèvement de sérum, par stimulation du récepteur Fas et par le traitement à l’étoposide, à l’actinomycine D ou à la doxorubicine (184, 290, 522). Il faut noter cependant que cette augmentation de la mort cellulaire dépend du fond génétique des souris, puisque l'invalidation de c-*raf* dans les souris de fond génétique MF1 ne provoque pas de défaut de mort cellulaire(286).

Enfin, il faut noter qu’il existe une mutation hypomorphique (hypo) de c-raf-1 qui conduit chez la souris à l’expression faible d’une protéine tronquée du coté amino-terminal, possédant toujours une activité kinase. Le remplacement des deux allèles de c-raf-1 par deux allèles hypo provoque l’arrêt du développement entre les jours embryonnaires J10.5 et J12.5 (485, 486). Le croisement entre des souris B-*raf* -/+ et *raf*-1 hypo/+ ne permet pas d'obtenir d'embryons B*raf*-/- , *raf*-1 hypo/hypo, ce qui montre que ces deux isoformes B-Raf et Raf-1 jouent un rôle primordial durant le développement embryonnaire (485).

Ces résultats montrent que B-Raf et Raf-1 jouent un rôle important dans la survie des cellules embryonnaires durant le développement et dans la résistance cellulaire aux stimuli

apoptotiques. La différence dans les phénotypes associés aux invalidations de B-raf et c-raf-1 indique que ces deux gènes ont des fonctions spécifiques en fonction des lignées embryonnaires.

a) c-raf-1 joue un rôle antiapoptotique indépendamment des kinases MEK et MAPK

Dans les fibroblastes embryonnaires B-raf -/- (349) et dans un modèle d'invalidation conditionnelle dans les cellules B (50), la perte de B-raf provoque une diminution de moitié du niveau d'activation des MAPK1/3. Il est peu probable que la perte d'activité des MAPK1/3 soit à elle seule responsable du phénotype des souris B-raf -/-. En effet, il a été montré que l'invalidation du gène ksr, codant pour une protéine d'échafaudage impliquée dans l'activation de la voie des MAPK1/3, provoque aussi une diminution de 50% de l'activation de la voie MEK/MAPK1/3, mais sans affecter la survie cellulaire et le développement de la souris (309). On peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la mort cellulaire embryonnaire dans les souris B-raf -/- ne s'expliquerait pas seulement par une diminution de l'activation de la voie des MAPK mais résulterait en partie de la perte de fonctions de survie spécifiques de l'isoforme B-Raf.

L'invalidation de c-raf-1 ne modifie pas l'activation de la voie MEK/MAPK, aussi bien in vitro que in vivo (50, 184, 290). Cela démontre que l'augmentation de la mort cellulaire dans les embryons de souris c-raf-1 -/- provient de la perte d'un mécanisme de survie indépendant de l'activation des kinases MEK et MAPK. Il faut noter que chez C Elegans, le gène lin-45 codant pour l'homologue de raf, contrôle le facteur de transcription lin-31 (181) indépendamment des kinases MEK et MAPK.

b) Le rôle antiapoptotique de c-raf-1 dépend-il de l'activité kinase de Raf-1 ?

La substitution in vitro des tyrosines 340 et 341 de Raf-1 par des résidus phénylalanine non phosphorylables chez le mutant Raf-FF affecte sévèrement ses fonctions (279). Le groupe du Dr Pritchard montre néanmoins que le knock-in de Raf-FF est capable de remplacer les fonctions de Raf-1 chez la souris c-Raf-1-/- (184). Cette forme mutante de Raf-1 est inactive en essai kinase in vitro (184), ce qui laisse supposer que la fonction kinase de Raf-1 ne soit pas nécessaire à la survie des embryons. Cependant quand le mutant Raf-FF est fusionné à un

domaine CAAX de localisation membranaire, il phosphoryle MEK aussi bien que la forme sauvage Raf-1CAAX (167). On ne peut donc pas considérer Raf-FF comme un vrai mutant dépourvu d'activité kinase. Il existe d'ailleurs un mutant de Raf-1 dépourvu d'activité kinase, Raf-1 K375M, qui est muté sur le site de fixation de l'ATP (9). Pour conclure définitivement que l'activité kinase de Raf-1 n'est pas requise pour ses fonctions antiapoptotiques pendant le développement embryonnaire, il faudrait montrer que le transgène Raf-1 K375M peut complémenter le phénotype c-raf-1-/- chez la souris. Si ces résultats indiquent que l'activité kinase de Raf-1 n'est pas forcement essentielle à son rôle protecteur contre un excès d'apoptose pendant le développement embryonnaire, il reste à élucider quel serait l'interacteur de Raf-1 qui remplit cette fonction.

2.3 L'invalidation de mek chez la souris

L'invalidation de mek2 chez la souris n'a pas d'effet sur le développement ni sur l'activation des kinases MAPK1/3, ce qui pourrait s'expliquer par un effet compensatoire de MEK1 (25). En revanche, l'invalidation de mek1 provoque la mort embryonnaire à J10.5, à cause d'un défaut de vascularisation du placenta (147). Cette différence de phénotype implique que le complexe MEK1/MAPK joue un rôle spécifique durant le développement. Alors que l'invalidation de c-raf-1 entraîne la mort des cellules endothéliales, il faut préciser que l'arrêt du développement placentaire des embryons mek1 -/- est causé par un défaut de migration des cellules endothéliales vers le placenta. Ce défaut de migration a par ailleurs été confirmé dans les fibroblastes mek1 -/- en culture (147). Les fibroblastes embryonnaires mek1 -/- ou mek2 -/- ne présentent aucun défaut dans la survie cellulaire. Les deux kinases MEK pourraient donc avoir une fonction redondante pour la survie cellulaire au cours du développement. Il faut noter que la surexpression par transgénèse de la forme constitutivement active MEK1 S217D/S221D dans le tissu cardiaque favorise la survie des cardiomyocytes contre la mort cellulaire induite par ischémie/réoxygénation cardiaque (53). Cependant comme l'expression de MEK1 S217D/S221D provoque une hypertrophie du cœur et une augmentation des fonctions cardiaques, on ne peut pas déterminer si la protection contre l'ischémie vient d'un contrôle des mécanismes de survie ou de l'augmentation des fonctions cardiaques.

2.4 L’invalidation de mapk chez la souris

Les deux isoformes MAPK1 et MAPK3 sont généralement considérées comme interchangeables. Cependant l’invalidation de leurs gènes respectifs provoque des phénotypes différents. L’invalidation de mapk3 n’a pas d’effet sur le développement général des souris, ni sur la survie cellulaire développementale (319) ce qui indique que la seule présence de MAPK1 suffit à contrôler la survie développementale, ainsi que les autres fonctions liées aux MAPK1/3. Seules l’activation des thymocytes par le TCR et leur différenciation en lymphocytes simples positifs CD4+ CD8+ sont légèrement altérées chez les souris mapk3 -/-. L’invalidation de mapk1 provoque la létalité embryonnaire entre les jours embryonnaires J6.5 et J11.5 suite à l’absence de développement de l’ectoderme extra-embryonnaire, du cône ectoplacentaire, à une absence de différentiation de la lignée conduisant au développement du mésoderme (373, 503), et à des défauts dans le développement du placenta (169). L’analyse des fibroblastes embryonnaires mapk1 -/- montre que le niveau d’activité résiduelle provenant de MAPK3 n’est pas suffisant pour compenser la diminution de l’activité globale MAPK (503). Bien que les embryons mapk1 -/- présentent une augmentation de la mort cellulaire dans de nombreux tissus (503), il n’y a aucune étude sur la mort cellulaire des fibroblastes mapk1 -/-. Ces résultats nous montrent que, des deux isoformes mapk1 et mapk3, mapk1 à des fonctions prépondérantes dans le développement embryonnaire et dans la survie cellulaire embryonnaire, fonctions que mapk3 ne peut pas compenser. On ne connaît pas vraiment l’expression ni l’activité relative des deux isoformes dans les différents tissus et on ne peut encore pas déterminer si mapk3 a un niveau d’activité trop faible ou si les deux kinases ont une certaine spécificité de substrats.

2.5 L’invalidation de rsk2 chez la souris

La kinase RSK qui existe sous quatre isoformes est activée en réponse à la phosphorylation par les MAPK1/3, phosphorylation qui la rend accessible à la kinase PDK1. RSK2 joue un rôle dans la survie cellulaire en activant le facteur de transcription CREB et en inhibant la fonction proapoptotique de Bad par phosphorylation (35, 398, 401). Chez l’homme, une

mutation dans le gène rsk2 est associée au syndrome de Coffin-Lowry caractérisé par des désordres neurologiques affectant la motricité et des malformations osseuses (452). Cependant ce syndrome n'est pas lié à une augmentation de la mort cellulaire. Chez la souris, seule l'invalidation de rsk2 a été réalisée ; elle provoque des défauts de croissance post-natale suite à des problèmes de tolérance au glucose, ainsi que des défauts neurologiques dans la mémorisation et la coordination. Là encore, aucune modification n'est détectée au niveau de la mort cellulaire (119, 125), alors que RSK2 est impliquée dans la phosphorylation de Bad suite à l'activation de la voie des MAPK (35, 398).

2.6 Voie MAPK et survie cellulaire chez la drosophile

Chez la drosophile, la voie des MAPK est impliquée dans la polarisation dorso ventrale de l'embryon, ainsi que dans le développement de nombreux tissus. La perte de fonction des gènes de la voie EGFR/Ras/MAPK conduit à une létalité embryonnaire comme par exemple l'invalidation de D-Raf (109). L'étude de la voie de signalisation de la MAPK (rolled) dans l'œil de drosophile a mis en évidence le contrôle de la protéine proapoptotique Hid (pour head involution defective). Hid induit la mort cellulaire mitochondriale en inhibant la protéine de survie DIAP dont la fonction est de bloquer l'homologue de la caspase 9, Dronc. L'activation de la voie MAPK réprime le gène hid (228) et inhibe son activité par phosphorylation directe (27). La drosophile a permis de montrer pour la première fois que la voie des MAPK permet de bloquer la mort mitochondriale en contrôlant l'activation des caspases.

3 Les mécanismes impliqués dans la survie cellulaire dépendante de la voie des MAPK

L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de MEK a mis en évidence le rôle antiapopototique de la voie des MAPK1/3 non seulement dans les cellules tumorales leucémiques ou issues de mélanomes, mais aussi dans un grand nombre de cellules non transformées (pour revue (19). Ainsi, différentes études ont démontré le rôle important de la voie des MAPK1/3 dans le blocage de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort et par la voie mitochondriale.

3.1 Les kinases de la voie des MAPK1/3 sont dégradées durant l'apoptose

Pendant la phase d'exécution de la mort cellulaire, les fonctions vitales de la cellule, en particulier les voies de signalisation qui contrôlent la survie, sont les cibles des activités de dégradation. Plusieurs études montrent que Raf-1 et B-Raf sont dégradées par un mécanisme dépendant des caspases dans différents modèles de mort cellulaire (63, 85, 195, 267, 481). Raf-1 est la cible de l'activité de caspase 1 (195) de caspase 9 (85) et du protéasome (195, 267). Le clivage de Raf-1 par la caspase 1 intervient dans le modèle de mort cellulaire induite lors de l'infection de macrophages avec des bactéries Salmonelle. Dans ce modèle, la perte de Raf-1 augmente la mort cellulaire, ce qui suggère que Raf-1 joue un rôle protecteur lors de l'infection. Dans les cellules hématopoïétiques, la privation en facteurs de croissance induit le clivage de Raf-1 par la caspase 9 au niveau de son résidu aspartate 279. Le fragment carboxy-terminal ainsi généré, Raf-1 Δ279, qui possède une forte activité kinase, se retrouve localisé majoritairement à la mitochondrie. La surexpression de ce fragment Raf-1 Δ279 ralentit l'apoptose, mais seulement s'il est dirigé vers la mitochondrie par fusion avec un domaine de localisation mitochondrial (85). Dans un modèle de mort cellulaire induite par l'adaphostin, un inhibiteur de kinases à tyrosine, Raf-1 est également dégradé mais par un mécanisme indépendant des caspases (511).

Les MAPK1/3 sont ubiquitinées et dégradées lors de l'apoptose induite par le stress osmotique (261). L'ubiquitination cible les résidus aspartates 316 et 319 des MAPK par un mécanisme dépendant de la kinase MEKK1, qui possède un domaine ubiquitine ligase. L'induction de la mort dépend de l'ubiquitination des MAPK puisque la surexpression d'une forme mutée D316/319N de MAPK1 protège les cellules. La dégradation des composants de la voie des MAPK1/3, mais également d'autres kinases impliquées dans la survie comme Akt (481), assure l'amplification et la complétion du phénomène apoptotique.

3.2 Le contrôle du métabolisme cellulaire par les MAPK1/3

La mort cellulaire est liée à l'arrêt des fonctions métaboliques (voir pour revue (342). La privation en facteurs de croissance qui est un moyen couramment utilisé pour induire la mort des cellules en culture, diminue l'activité des transporteurs du glucose et les fonctions métaboliques liées à la mitochondrie. Les travaux du groupe du Dr Thompson ont démontré que la protéine antiapoptotique Bcl-xL ou la voie de survie dépendante de AKT jouent un rôle important dans le maintien de la production de l'ATP en conditions apoptotiques. La voie des MAPK1/3 peut aussi réguler le métabolisme cellulaire à plusieurs niveaux. En phosphorylant l'enzyme carbamoyl phosphate synthétase II, elle augmente la synthèse des nucléotides et en phosphorylant le facteur de traduction Eif-4E, celle des protéines. Parmi les gènes dont l'expression est régulée par la voie MAPK1/3, on trouve de nombreux gènes directement impliqués dans le métabolisme comme les gènes codant pour la PGDH ou la glycerol kinase. La voie des MAPK1/3 agit aussi en amont des voies métaboliques en induisant directement l'expression des facteurs de croissance comme le VEGF, les TGFα et β, EphA2 dans les cellules épithéliales (156, 389, 395) ou l'IL-3 et le GM-CSF dans les cellules hématopoïétiques ou leucémiques (32, 282). Ainsi la voie des MAPK1/3 pourrait favoriser la survie cellulaire en permettant le maintien du métabolisme intracellulaire soit directement soit en activant les voies de signalisation de façon autocrine.

3.3 Inhibition de la voie des récepteurs de mort

a) Contrôle transcriptionnel de l'inhibiteur FLIP

La protéine FLIP est un inhibiteur de l'activation de la caspase 8 qui bloque le recrutement de la procaspase 8 aux récepteurs de mort (pour revue (337)). L'activation de la voie des MAPK1/3 induit l'expression de l'ARNm de flip (207), par un mécanisme dépendant de l'activité de MEK (12, 473, 504). L'induction de FLIP par la voie des MAPK1/3 est liée à l'inhibition de l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas (473, 504) ou par la surexpression de FADD (504), deux constituants majeurs de la voie de récepteurs de mort. L'induction de FLIP par la voie des MAPK1/3 entraîne aussi l'inhibition de la mort cellulaire par la perte d'ancrage à la matrice extracellulaire (12), ce qui laisse supposer l'implication de la caspase 8 dans cette forme de mort. L'induction transcriptionnelle de FLIP n'est cependant pas le seul mécanisme d'inactivation de la voie des récepteurs de mort par les MAPK1/3 puisque l'inhibition de la caspase 8 dans les cellules épithéliales MCF-10, n'implique pas l'induction du messager de flip (388).

b) Inhibition post traductionnelle de la caspase 8

L'équipe du Dr JE Eriksson a montré dans plusieurs études que l'activation de la voie des MAPK1/3 protège les cellules HeLa et Jurkat de la mort induite par les récepteurs de mort.
Dans les cellules Hela, l'inhibition de l'activité MEK est suffisante pour augmenter la mort induite par le récepteur Fas. A l'inverse, l'activation constitutive de la voie des MAPK1/3 par surexpression de forme constitutivement activée de MEK diminue la mort induite par les récepteurs de mort (177, 451). Dans les cellules T Jurkat ou U937, ou les cellules dérivées de lymphome T, l'inhibition de MEK n'augmente pas la mort induite par Fas (176, 177), mais bloque l'effet protecteur du TPA et du récepteur CD3 contre les récepteurs de mort (175) (176, 177) (411). Dans les deux modèles cellulaires, l'activation de la voie des MAPK1/3 bloque le clivage de la caspase 8 par un mécanisme indépendant de la synthèse protéique (175, 177, 411, 451). Ce mécanisme protecteur ne semble affecter ni la redistribution du récepteur Fas à la membrane (177), ni la formation du DISC et le recrutement de la caspase 8 (176) (411). On peut envisager que la voie des MAPK1/3 inhibe directement l'activité de la caspase 8 par phosphorylation.

Cependant on ne peut pas totalement exclure une inhibition du DISC. En effet d'autres études ont impliqué la voie des MAPK1/3 dans la phosphorylation de l'adaptateur FADD (221, 285). Cette phosphorylation induit une relocalisation de FADD des compartiments subcellulaires insolubles au Triton vers des compartiments solubles. (285).

Dans de nombreux cas, l'apoptose initiée par les récepteurs de mort requiert une amplification par la voie mitochondriale. L'activité de la voie MAPK1/3 protège de la mort induite par TRAIL les cellules de mélanome et de cancer du sein en inhibant la sortie du cytochrome c de la mitochondrie sans modifier ni le clivage ni l'activité de la caspase 8 (382, 519). Ainsi la voie des MAPK1/3 bloque aussi la mort induite par les récepteurs de mort en agissant au niveau de la mitochondrie.

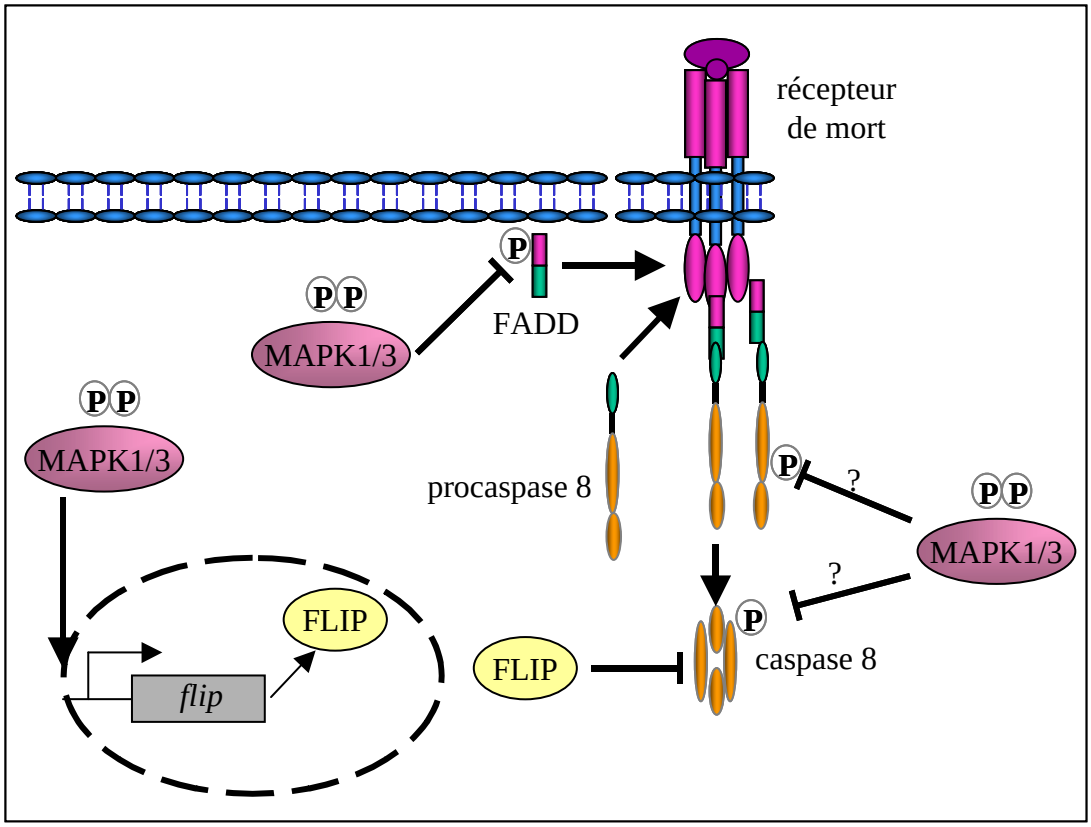

Schéma n°15: La voie MAPK inhibe l'apoptose induite par les récepteurs de mort

La voie Raf/MAPK bloque l'apoptose induite par les récepteurs de mort à plusieurs niveaux. D'une part l'induction du gène de *flip* permet ou la phosphorylation de FADD inhibe le recrutement de FADD aux récepteurs et l'activation de la caspase 8. D'autre part la voie MAPK pourrait inhiber directement la caspase 8 par un mécanisme indépendant du contrôle de FLIP et de FADD.

3.3 Inhibition de la voie mitochondriale

a) La voie des MAPK1/3 inhibe les protéines proapoptotiques Bad, Bax et Bim

La voie des MAPK1/3 inhibe par des mécanismes post-traductionnels l'activité et l'expression des protéines proapoptotiques Bad, Bim et Bax. Ainsi, l'activation de la voie des MAPK entraîne la phosphorylation de la protéine Bad sur sa sérine 112, par RSK1 (35, 398, 401) et RSK2 (35, 398, 401) et diminue le taux de mort cellulaire induit par la privation de facteurs de survie (35, 398, 401). La phosphorylation de Bad provoque sa liaison à la protéine 14-3-3, sa délocalisation à l'écart de la mitochondrie (pour revue (36)) et sa dissociation de la protéine antiapoptotique Bcl-xL (398).

L'activation de la voie des MAPK1/3 induit aussi la phosphorylation de BimEL sur la sérine 69, ce qui provoque sa dégradation par le protéasome (244, 262, 271, 479). Il faut noter que la kinase MAPK1 est capable de phosphoryler directement la sérine 69 in vitro (297). Cette augmentation de la dégradation de Bim par la voie des MAPK permettrait de lever l'inhibition exercée par Bim sur la protéine antiapoptotique Bcl-xL (262). Enfin, dans les fibroblastes CCL39, l'activation de la voie des MAPK1/3 induit une inactivation de Bax (479). Dans les cellules de tumeur du sein MCF7, l'activation de la voie des MAPK par les PKC entraîne la relocalisation de la protéine Bax de la mitochondrie vers le cytosol, ce qui inhibe la sortie du cytochrome c et l'apoptose induite par TRAIL (382). Il faut noter que la phosphorylation de la sérine 184 de Bax par AKT inhibe sa localisation mitochondriale (142). Il serait donc intéressant de vérifier si Bax est aussi la cible de l'une des kinases de la voie MAPK. L'activation de la voie des MAPK affecte l'activité des protéines proapoptotiques de la famille de Bcl-2 par des mécanismes post-transcriptionnels, en inhibant la localisation mitochondriale de Bad et Bax et en augmentant la dégradation de Bim.

b) La voie des MAPK1/3 induit les protéines de survie Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1

Le rôle antiapoptotique de la voie des MAPK est associé à l'induction des protéines de survie Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans différents modèles cellulaires et notamment dans les cellules tumorales issues de leucémie (292, 293, 510), de mélanome (519) ou de tumeur du pancréas

(39). Ce contrôle des protéines antiapototiques permet d'inhiber la sortie du cytochrome c (510, 519). Cette induction des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dépend à la fois de mécanismes transcriptionnels et post-tranductionnels. Dans les cellules leucémiques, l'activation de la voie des MAPK par le GM-CSF est impliquée dans l'induction des ARNm de mcl-1 et bcl-xL (387). Dans les neurones de la rétine, l'activation de la voie des MAPK par le FGF2 induit les ARNm de bcl-2 et bcl-xL (105). L'utilisation d'un ARN antisens montre que l'induction de bcl-xL est nécessaire pour l'effet antiapoptotique du FGF2 contre la mort par enlèvement de facteurs de croissance (105). L'induction transcriptionnelle des gènes de survie bcl-2, mcl-1 et bcl-xL pourrait être liée à l'activation du facteur de transcription CREB suite à la phosphorylation de sa sérine 133 par RSK (35), (pour revue (19))

Dans les cellules endothéliales humaines HUVEC, il a été montré que l'activation de la voie des MAPK1/3 empêche la dégradation de Bcl-2 par le protéasome et la mort induite par le TNFα, en phosphorylant Bcl-2 sur ses résidus thréonine 56, thréonine 74 et sérine 87 (45, 111). Dans les cellules myéloïdes NSF/N1, il a aussi été décrit que la voie des MAPK phosphoryle la sérine 70 de Bcl-2 ce qui permet de dissocier Bcl-2 de Bax , protégeant ainsi les cellules de l'apoptose induite par la staurosporine (99).

La protéine antiapoptotique Mcl-1, qui est sensible au protéasome (104), est aussi stabilisée après la phosphorylation de son résidu thréonine 163 par la MAPK1 en réponse au TPA (112). Cependant le rôle antiapoptotique de cette phosphorylation stabilisatrice n'a pas été démontré. Enfin, la voie des MAPK1/3 augmente aussi l'expression de la protéine Bcl-xL par un mécanisme post-traductionnel (388), qui pourrait là encore être lié à l'inhibition de sa dégradation par le protéasome (39).

Ces résultats montrent que la voie des MAPK1/3 régule la survie cellulaire en maintenant le ratio des protéines de la famille de Bcl2 en faveur de l'intégrité de la membrane mitochondriale. L'activité de la voie des MAPK1/3 entraîne la délocalisation ou la perte d'expression des protéines de mort et augmente l'expression des protéines de survie. Cependant dans certains types cellulaires comme les cellules épithéliales MCF-10, l'activation de la voie des MAPK1/3, bien qu'elle favorise la survie cellulaire, ne suffit pas à empêcher la sortie du cytochrome c (372). Cette observation indique que le contrôle de l'intégrité de la membrane mitochondriale n'est pas le seul mécanisme d'inhibition de la mort mitochondriale par les MAPK1/3.

c) La voie des MAPK1/3 inhibe l'activation des caspases en aval de la mitochondrie

♦ *La voie des MAPK1/3 inhibe l'apoptosome*

L'activation de la voie des MAPK1/3, en réponse à la stimulation de ΔRaf-1:ER par le tamoxifène dans les cellules épithéliales MCF-10 (372) ou par la surexpression de B-Raf dans les fibroblastes Rat-1(129), inhibe la mort cellulaire induite par détachement ou par privation de sérum, sans empêcher la sortie du cytochrome c de la mitochondrie. Le contrôle de l'intégrité de la membrane mitochondriale n'est pas le seul mécanisme d'inhibition de la mort mitochondriale par les MAPK1/3. Dans ces modèles cellulaires, l'activation de la voie des MAPK1/3 inhibe directement l'activation de la caspase 3. Dans des extraits de fibroblastes surexprimant B-Raf (129) ou d'oocytes de Xénope en phase M du cycle cellulaire (440), il a été montré que la forte activité de MEK présente dans ces extraits peut bloquer l'activation in vitro de caspase 3 induite par l'ajout de cytochrome c. In vitro, le cytochrome c provoque la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 qui active la caspase 3. La caspase 9 est un substrat direct de MAPK1 et la phosphorylation du résidu thréonine 125 par la MAPK1 purifiée inhibe son auto activation in vitro (10). La phosphorylation de la caspase 9 pourrait inhiber son activité enzymatique et son clivage autocatalytique, bloquer sa dimérisation ou empêcher son recrutement par Apaf1. Dans les cellules en culture, la caspase 9 est bien phosphorylée sur la thréonine 125 en réponse à l'activation de la voie des MAPK1/3 ; toutefois l'implication de cette phosphorylation dans l'inhibition de la mort cellulaire n'a pas encore été démontrée (10). Il pas n'est exclu que l'activité de la voie des MAPK1/3 puisse aussi affecter les autres composants de l'apoptosome comme Apaf1 ou XIAP, l'inhibiteur de caspase 9 associé au complexe (42).

♦ *La voie des MAPK augmente l'expression des IAP*

Les IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) sont des pseudo-substrats des caspases qui possèdent une activité de ligation à l'ubiquitine, elles bloquent l'exécution de l'apoptose en diminuant l'activité des caspases (pour revue (252)). Dans les motoneurones issus d'embryons de souris invalidées pour A-raf, B-raf ou raf-1, la survie induite par les facteurs neurotrophiques qui

dépend de l'isoforme B-Raf, est liée au maintien de l'induction des gènes de cIAP2 et de XIAP (482). L'activation de la voie des MAPK est aussi liée à l'augmentation de l'expression de la protéine XIAP dans les cellules d'origine monocytaire (249) , dans les cellules leucémiques (292, 461) dans les neutrophiles (143), dans les mélanomes (519) et les fibroblastes (325). Chez la drosophile, la protéine proapoptotique Hid qui est nécessaire au développement, induit l'apoptose des cellules gliales en provoquant la dégradation de l'homologue de XIAP par le protéasome. L'expression de mutants de Ras qui activent exclusivement la voie MAPK bloque la mort cellulaire en inhibant à la fois l'expression de Hid et sa fonction par phosphorylation directe (27, 228). Chez les mammifères, la dégradation de XIAP est contrôlée par les protéines mitochondriale Smac/Diablo et HtrA2/Omi (pour revue (252)). La régulation directe de Smac ne semble pas être un mécanisme conservé puisque dans les cellules Jurkat, l'activation de la voie des MAPK bloque la mort induite par surexpression de Hid, mais pas par surexpression de Smac (462). Néanmoins dans des cellules de cancer du poumon, l'activation de la voie des MAPK1/3 contrôle la sortie de Smac hors de la mitochondrie sans inhiber la sortie du cytochrome c. Cela permet de stabiliser cIAP1 et XIAP dans le cytosol où leur présence est nécessaire à l'effet protecteur du facteur de survie (325). La régulation de HtrA2/Omi par la voie des MAPK n'a pas encore été étudiée. La stabilisation de XIAP est donc un mécanisme impliqué dans la survie cellulaire dépendante de la voie des MAPK1/3. En l'absence de Smac, XIAP est recrutée dans l'apoptosome (454) où elle pourrait empêcher l'activation de la caspase 9.

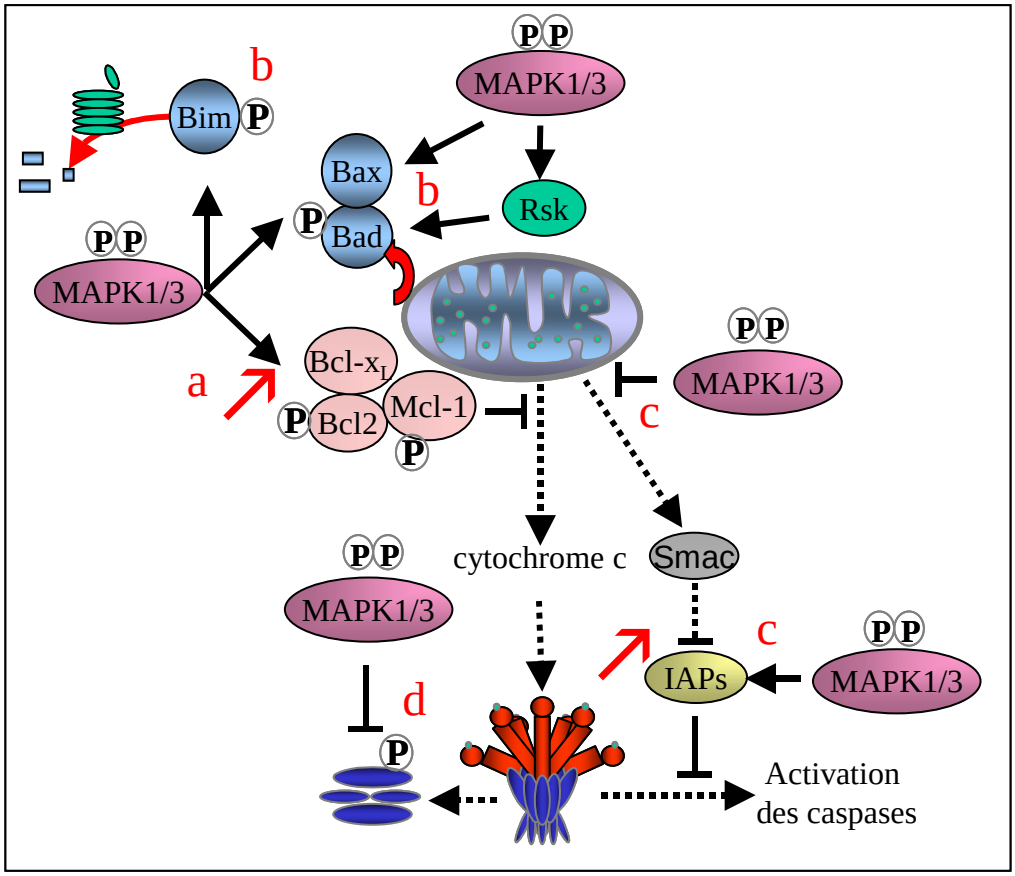

Schéma n°16: La voie MAPK inhibe l'apoptose mitochondriale

La voie Raf/MAPK inhibe l'apoptose mitochondriale à différents niveaux. D'une part la voie MAPK inhibe la sortie du cytochrome c en en contrôlant le ratio des protéines de la famille Bcl-2. La voie MAPK induit l'expression des protéines antiapoptotiques Bcl-2 $Bclx_L$ et Mcl-1 et stabilise Bcl-2 et Mcl-1 par phosphorylation (a). A l'opposée la voie MAPK délocalise les protéines proapoptotiques Bax et Bad hors de la mitochondrie et entraine la dégradation de la protéine Bim par le protéasome (b). D'autre part la voie MAPK inhibe l'activité des caspases en aval de la sortie du cytochrome c : elle induit les IAP cIAP1, cIAP2, XIAP et évite leur dégradation en inhibant la sortie de Smac (c), et inhibe directement la caspase 9 par phosphorylation (d).

3.4 Raf joue un rôle antiapoptotique indépendamment des kinases MEK/MAPK

L'invalidation de c-raf-1 est liée à une augmentation de l'apoptose, qui n'est pas liée à une inhibition de l'activation des MAPK1/3(50, 184, 290). Ces résultats génétiques suggèrent que Raf-1 peut jouer un rôle dans la survie cellulaire indépendamment des MAPK1/3 (pour revue (16, 106, 172).

Dans les cellules NIH 3T3, la transformation par l'oncogène v-Abl provoque une activation constitutive de Raf-1, de la voie des MAPK1/3 ainsi que l'induction de c-myc. Le traitement de ces cellules transformées avec du 8-Cl-AMPc provoque la mort cellulaire en restaurant l'activité de cMyc. Le 8-Cl-AMPc active la PKA qui inhibe l'activité de Raf-1, sans inhiber l'activation des MAPK par v-Abl. A l'inverse l'induction de ΔRaf-1 est capable de bloquer la mort induite suite à l'induction de MycER. Ainsi l'activité de Raf-1 serait nécessaire à la transformation par v-Abl en inhibant l'apoptose dépendante de c Myc, indépendamment de l'activation des MAPK1/3 (478). Dans le modèle de mort cellulaire induit par l'infection des macrophages par la bactérie Salmonella, Raf-1 est dégradée par un mécanisme impliquant la caspase 1. Alors que l'invalidation de Raf-1 sensibilise les macrophages à la mort induite par l'infection, l'inhibition de MEK par le PD98059 n'a pas d'effet particulier (195). Ce modèle montre aussi que Raf-1 peut jouer un rôle protecteur indépendamment de l'activation des MAPK1/3.

Dans les cellules endothéliales HUVEC, le groupe du Dr Cheresh a suggéré que le rôle antiapoptotique de Raf-1 pouvait dépendre ou non de l'activation des kinases MAPK1/3 (4). Ainsi l'activation de Raf-1 par le VEGF bloque la mort induite par le récepteur au TNF par un mécanisme dépendant de l'activité MEK. Cette activation de Raf-1 dépend de sa phosphorylation sur ses résidus tyrosines 340 et 341 par un mécanisme dépendant de Src. A l'inverse, l'activation de Raf-1 par le FGF protège les cellules de la mort mitochondriale indépendamment de l'activité MEK. Cette activation de Raf-1 dépend de sa phosphorylation sur ses résidus sérine 338 et 339 par un mécanisme dépendant de PAK et implique la relocalisation de Raf-1 à la mitochondrie. D'autres études avaient décrit auparavant un rôle protecteur de Raf lié à sa localisation mitochondriale. La translocation de Raf lui permettrait d'exercer une action directe sur des substrats mitochondriaux.

a) Le rôle antiapoptotique de Raf est lié à sa localisation mitochondriale

♦ *Ciblage mitochondrial de Raf-1*

Dans les cellules leucémiques dépendantes d'Il-3, la localisation mitochondriale forcée du domaine carboxy-terminal de Raf-1 par fusion au domaine de localisation mitochondriale de Mas70, M-ΔRaf-1, diminue la mort induite par enlèvement d'IL-3 (85, 237, 470). L'utilisation du mutant kinase dead de Raf, M-ΔRaf K375W, montre que la protection de la forme mitochondriale de Raf dépend de son activité kinase. La surexpression du mutant M-ΔRaf K375W diminue aussi l'effet protecteur de Bcr-Abl, suggérant que la forme mitochondriale de Raf est impliquée dans la survie liée à l'oncogène Brc-Abl (308). Le rôle protecteur de la forme mitochondriale de Raf-1 implique la phosphorylation de Bad (378, 470) (308). La transfection de la forme dominante négative MAPK1 K72R suggère que la phosphorylation de Bad par Raf-1 est indépendante de l'activité MAPK1 (308). Même si M-ΔRaf-1 a été décrit comme pouvant phosphoryler Bad en essai kinase (237), la phosphorylation de Bad requiert plutôt l'activation de la voie AKT (308).
Enfin le canal mitochondrial VDAC, dont l'activité est sensible à la privation des facteurs de survie, est également une cible du mécanisme de protection dépendant de la localisation mitochondriale de Raf-1 (237).

♦ *La forme endogène de Raf-1 est associée à des fractions mitochondriales*

Le fractionnement cellulaire a montré que la forme endogène de Raf-1 copurifie avec la fraction subcellulaire contenant des mitochondries (4, 336, 378). Le mode de localisation de Raf-1 à la mitochondrie n'est pas entièrement élucidé, il dépend de la phosphorylation de résidus sérine 338 et 339 et pourrait être favorisé par la protéine adaptatrice Grb10, qui est localisée à la mitochondrie et qui peut se lier au domaine amino-terminal de Raf (306). D'autres mécanismes pourraient intervenir indépendamment de Grb10. Le clivage de Raf-1 par la caspase 9 produit un fragment carboxy-terminal Raf-1 Δ279 qui ne contient plus le site d'interaction avec Grb10 mais qui présente toujours les sites de phosphorylation par PAK. Ce fragment peut être localisé dans des fractions contenant des mitochondries (85).
Il a été montré en microscopie confocale que la surexpression de Bcl-2 entraîne la localisation mitochondriale de la partie carboxy-terminale de Raf-1 fusionnée à la GFP (470). La liaison

entre Bcl-2 et Raf-1 implique le domaine CR3 de Raf-1, le domaine BH4 de Bcl-2 (470) et pourrait dépendre de la protéine Bag1 qui se lie à la fois à Raf-1 (471) et à Bcl2 (434). Cette liaison de Raf-1 à Bcl-2, reste cependant controversée (236, 316, 378, 522).

♦ *La localisation mitochondriale Raf-1 a-t-elle une signification physiologique ?*

L'étude de la localisation de la forme endogène de Raf-1 en microscopie confocale donne des résultats contradictoires. Raf-1 semble associée aux mitochondries dans les motoneurones (482), mais pas dans les macrophages (195). De plus, il faut noter que les fractions dites mitochondriales contiennent aussi des protéines de la membrane plasmique ce qui soulève la possibilité d'une contamination de la forme membranaire de Raf-1 dans les mitochondries (195). Par ailleurs des études utilisant des techniques biochimiques spécifiques (traitement protéinase K) et la microscopie électronique sur mitochondries purifiées (514) montrent clairement que Raf-1 n'est pas une protéine localisée à la mitochondrie. En revanche l'isoforme A-Raf se retrouve localisée dans l'espace inter matriciel de la mitochondrie en se liant à la protéine mitochondriale hTOM (514), mais le rôle qu'elle y joue n'est pas connu. Si la localisation mitochondriale forcée de Raf-1 protège les cellules d'origine hématopoïétique contre la mort induite par privation d'Il-3, le rôle de la forme endogène de Raf-1 n'est pas encore clairement établi.

b) Les activités kinases régulées par Raf-1

♦ *Raf inhibe la kinase de mort ASK1*

ASK1 (pour apoptosis signal-regulating kinase 1) est impliquée dans la mort cellulaire induite par la voie mitochondriale, par la voie du récepteur au TNF, par stress oxydatif et par le stress protéique au niveau du réticulum endoplasmique (pour revue (435)). L'étude génétique chez la souris montre que l'invalidation d'ask1 protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire provoquée par l'invalidation conditionnelle de c-raf-1 dans le tissu cardiaque (500). Ce résultat indique que le rôle protecteur de Raf-1 durant le développement embryonnaire implique l'inhibition d'ASK1. Dans les cellules en culture la surexpression de Raf-1 bloque la mort cellulaire induite par la surexpression d'ASK1, par un mécanisme qui dépend ni de l'activité MEK, ni de l'activité kinase de Raf-1. L'interaction entre Raf-1 et l'extrémité amino-terminale d'ASK1 suffit à inhiber la mort induite par ASK1 (73). On peut imaginer

que la fixation de Raf-1 empêche ASK1 d'interagir avec ses substrats. Le contrôle de la kinase ASK1 par Raf-1 est donc un exemple de mécanisme de survie assuré par Raf-1 indépendamment des kinases MEK/MAPK.

♦ *Raf-1 inhibe la protéine proapoptotique MST2*

Récemment il a été montré que la kinase MST2 qui est hyperactive dans les fibroblastes Raf-1 -/-, joue un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire par Raf-1 indépendamment de la voie MEK/MAPK. La stimulation du récepteur Fas active MST2.
Le domaine CR2 de Raf-1 se fixe à MST2 et inhibe son activité en empêchant son homodimérisation. Le contrôle de MST2 par Raf-1 ne dépend ni de la voie MEK/MPAK ni de l'activité kinase de Raf (317).

♦ *Raf-1 active la voie antiapoptotique NFκB*

L'un des mécanismes de protection de Raf-1, indépendant des kinases MEK/MAPK, pourrait être l'activation de la voie NFκB qui joue un rôle important dans la survie cellulaire, notamment dans l'induction des IAPs (pour revue (204)). La transfection de la forme active de Raf, BXB-Raf, permet d'activer l'activité transcriptionnelle de NFκB (126). L'activation de la voie NFκB indépendamment des kinases MEK/MAPK a été montrée par surexpression d'une forme constitutive active de Raf-1 ne liant plus MEK, BXB-Raf-1 T481A (330). L'activation de la voie NFκB par Raf-1 est liée à l'activation de la kinase IKK2 par un mécanisme dépendant de l'activité kinase de Raf-1 et de la kinase MEKK1 (23). Cette activation de IKK2 joue un rôle dans la transformation des fibroblastes 3T3 par v-Raf. Une étude basée sur l'activation de Raf-1 par un activateur pharmacologique, le GW5074, montre que l'activation de la voie NFκB par Raf-1, indépendamment des kinases MEK/MAPK, joue un rôle antiapoptotique dans les cellules neuronales (76). Cependant il faut noter que l'activation de la voie NFKB n'est pas inhibée dans les cellules Raf-1-/- (290).

♦ *Raf active la voie de survie MEK5/MAPK5*

La kinase MAPK5 qui appartient à la famille des MAPK, présente dans sa partie amino-terminale des homologies de séquences avec les autres MAPK. Sa partie carboxy-terminale

par contre est différente et lui permet de lier les facteurs de transcription de la famille MEF2 (205). Comme les MAPK1/3, MAPK5 est activée par une kinase à double spécificité de la famille de MEK1, MEK5 (295). La voie MEK5/MAPK5 est impliquée dans la survie des cellules endothéliales (341) et des cellules neuronales embryonnaires (255). La voie MEK5/MAPK5 induit la phosphorylation de Bad sur les résidus serine 112 et 136 et son inactivation (341). L'invalidation de erk5 entraîne une malformation du système cardiovasculaire qui provoque la létalité embryonnaire entre les jours J9.5 et J10.5 (361, 413). L'invalidation conditionnelle de erk5 dans l'endothélium provoque la mort des cellules endothéliales et conduit à une létalité par hémorragie massive (170). Il faut noter que ce phénotype est similaire au phénotype des souris invalidées de B-raf (487). La voie MEK5/MAPK5 joue donc un rôle protecteur dans les cellules en particulier dans les cellules endothéliales lors du développement.

Plusieurs résultats montrent des liens entre la voie MEK5/MAPK5 et l'activation de Raf. D'une part, la voie MEK5/MAPK5 est activée par les mêmes ligands que la voie des MAPK1/3, comme le BDNF, le NGF, l'EGF, le bFGF et le VEGF (66, 170, 193). D'autre part, Raf-1 se lie à ERK5 et participe indirectement à son activation par un mécanisme dépendant de Ras (128). L'utilisation d'une forme dominante négative (ERK5KM et MEK5KM), montrent d'ailleurs que la voie MEK5/MAPK5 joue un rôle dans la transformation des cellules fibroblastiques 3T3 par Raf-1 (128). Enfin, il a été montré que les inhibiteurs de MEK, U0126 et le PD 98059, bloquent également la kinase MEK5 (66) (430). Il est donc possible qu'une part du rôle protecteur attribuée à la voie MEK/MAPK dépende de l'activation de la voie MEK5/MAPK5 par Raf. La seule façon de différencier la voie MEK/MAPK1/3 de la voie MEK5/MAPK5 est d'utiliser l'inhibiteur de MEK PD184161 qui n'a pas d'effet sur la voie MEK5/MAPK5 (391). Il serait néanmoins intéressant de vérifier si l'expression des formes dominantes négatives de MAPK5 ou MEK5 bloque la survie cellulaire induite par l'activation de Raf-1:ER ou par la transfection d'une forme constitutive de Raf.

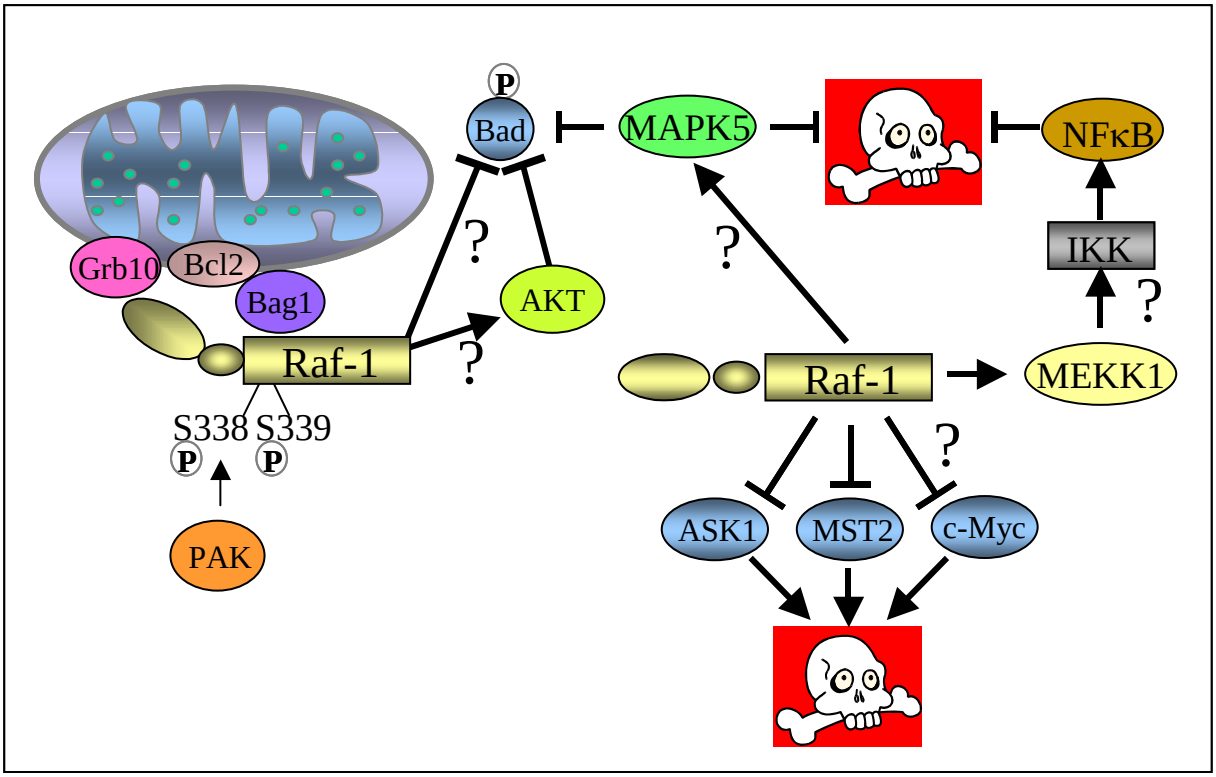

Schéma n°17: Raf-1 inhibe l'apoptose indépendamment de la voie MEK/MAPK

La kinase Raf-1 inhibe l'apoptose à différents niveaux par des mécanismes indépendant de l'activité des kinases MEK et MAPK. L'association de Raf-1 à la protéine Grb10 permet sa localisation mitochondriale où elle inhibe la protéine Bad par phosphorylation directe ou via la voie AKT. Raf-1 inhibe aussi les protéines proapoptotiques cMyc, ASK1 et MST2. Raf-1 pourrait aussi inhiber l'apoptose en activant d'autres voies de signalisation comme la voie NFκB et la voie MAPK5.

II La voie des MAPK1/3 favorise la mort cellulaire

1 La voie des MAPK est impliquée dans l'induction de la mort cellulaire au cours du développement

1.1 Le développement des membres chez le poulet

Durant le développement des bourgeons conduisant à la formation des membres chez le poulet, la phosphatase MKP3/DUSP6, qui déphosphoryle les MAPK1/3, est fortement induite. L'extinction de l'ARNm de mkp3 ou la surexpression d'une forme constitutivement active de MEK1 entraîne l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 et l'arrêt du développement des bourgeons par augmentation de la mort cellulaire (206). Cependant l'inhibition totale de la voie des MAPK1/3 par surexpression de MKP3 bloque aussi le développement des membres (121). Chez le poulet, la voie des MAPK régule à la fois la prolifération et l'induction de la mort lors du développement des membres.

1.2 Le U0126 inhibe la mort cellulaire développementale chez l'ascidie

Lors de son développement larvaire, Ciona Intestinalis, un invertébré appartenant à la famille de l'ascidie, passe d'un stade de nage, à un stade où elle reste fixée à son substrat. Durant cette métamorphose, l'animal perd sa queue par un mécanisme dépendant de l'induction et de l'activité d'une caspase homologue à caspase 3. Dans la zone touchée par la mort cellulaire, de nombreuses cellules présentent une accumulation nucléaire de la forme phosphorylée de MAPK et le traitement des larves au U0126 empêche la perte de la queue (69). L'activation soutenue de la voie MAPK, en particulier sa localisation nucléaire, semble donc nécessaire à l'induction de la mort cellulaire dans une phase du développement chez Ciona Intestinalis.

1.3 Mort des cellules germinales chez Caenorhabditis Elegans

Chez C Elegans, la voie MAPK joue un rôle essentiel durant le développement, notamment dans la différentiation cellulaire (508), l'invalidation des gènes codant pour les kinases de la voie de signalisation bloque tout développement (165) (166). Durant l'oogenèse chez le C Elegans hermaphrodite, les cellules germinales sont protégées de la mort cellulaire par un mécanisme dépendant de CED-9 l'homologue de bcl-2, cela tant qu'elles restent arrêtées en méiose au stade prophase I. Lors de la maturation, la reprise du cycle cellulaire entraîne la mortalité de la moitié des oocytes par un mécanisme dépendant de l'activation de CED-3, l'homologue de caspase 3. L'utilisation de mutants de la voie MAPK montre que la voie MAPK n'est pas impliquée dans la survie dépendante de CED-9. A l'inverse, la voie MAPK est nécessaire pour faire sortir les cellules germinales de leur arrêt en méiose, permettant ainsi l'induction de la mort (161). Chez le C Elegans, l'activation de la voie MAPK est donc nécessaire pour faire entrer les cellules germinales dans un stade développemental où elles deviennent sensibles à la mort.

1.4 Mort des cellules germinales chez l'étoile de mer

Chez l'étoile de mer Asterina pectinifera, la voie MAPK est directement impliquée dans la mort cellulaire des oocytes non fécondé, par un mécanisme proche du modèle C Elegans. Les cellules germinales arrêtées en méiose au stade prophase I, reprennent leur division lors de la ponte et meurent par un mécanisme dépendant d'une activité caspase de type DEVDase si elles ne sont pas fécondées. La reprise de la division cellulaire s'accompagne d'une activation prolongée de la voie des MAPK par un mécanisme dépendant de l'induction de la kinase MOS (383). Lors de la fécondation qui permet la survie des oocytes, la voie des MAPK est rapidement inhibée (433). Par ailleurs, le traitement des oocytes non fécondés au U0126 et au PD98059 empêche leur mort (383). A l'inverse, la réactivation de la voie des MAPK par injection de la kinase MOS (qui active MEK) dans des oocytes fécondés est suffisante pour induire la mort cellulaire (383). Le modèle de l'oocyte d'étoile de mer montre donc que l'activation soutenue de la voie des MAPK est responsable de la mort cellulaire, et que la survie des embryons requiert son inactivation.

2 La voie MEK/MAPK est inactivée dans les tumeurs

Lorsque la stimulation des MAPK1/3 est trop forte, l'activation prolongée qui en résulte, induit l'arrêt du cycle cellulaire. Ce blocage de la prolifération est impliqué dans les processus de différentiation (240), mais peut conduire aussi à la sénescence(368). Dans les cellules humaines non transformées (132, 247, 394, 488, 525) et dans les cellules tumorales (132, 357, 358), l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par un mécanisme dépendant de pRb et des inhibiteurs des cyclines-CDK, p16 et p21. L'entrée en sénescence dépend de l'induction de p53. On a vu que l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 est nécessaire à la survie cellulaire de certains types de tumeurs comme les leucémies myéloïdes chroniques ou les mélanomes. Le fait que ces cellules prolifèrent malgré une forte activité de la voie de signalisation, implique qu'elles ont subi des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeur qui contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux MAPK1/3. Dans les cellules transformées qui n'ont pas subi ces modifications, le dérèglement de la voie des MAPK1/3 pourrait bloquer le développement tumoral.

2.1 Inactivation de la voie des MAPK dans certains modèles tumoraux

L'étude du Dr M Kohno sur l'activation de la voie des MAPK1/3 dans des échantillons de lignées tumorales humaines montre que si la voie des kinases MAPK1/3 est activée de façon constitutive dans près de 36% de lignées tumorales humaines, 19% des lignées tumorales ont un niveau d'activité ou d'activation des kinases MAPK1/3 plus faible que celui retrouvé dans des lignées non transformées (178). Il s'agit de cellules issues de tumeur du cerveau, de l'œsophage, de l'estomac, du foie, et de certains types de leucémie (178). Une partie de ces lignées tumorales présente un défaut d'activation des MAPK1/3 en réponse à une stimulation mitogénique, ce qui indique que ces tumeurs ont sélectionné des mutations qui affectent l'activation de la voie de signalisation. Les études sur les mutations de B-Raf dans les lignées tumorales ont montré qu'il existe des mutations n'activant pas la voie des MAPK1/3, comme les mutations D593V, G595R et G468E. La surexpression de ces mutants dans les fibroblastes

3T3 montre de façon surprenante qu'ils inhibent l'activation de la voie des MAPK en réponse au sérum (187, 188, 469). Ces résultats indiquent que la voie des MAPK1/3 est inhibée dans certains types de tumeurs. Dans ces tumeurs, la voie des MAPK peut être considérée comme une voie supresseur de tumeur, cela même si le mutant RasV12 est exprimé (178). Cela laisse supposer que les mécanismes de rétro contrôle de l'activité de la voie des MAPK1/3 en aval de Ras , comme les phosphatases, sont suractivés.

a) Les phosphatases MKP1 et MKP2 sont surexprimées dans certaines tumeurs

Les phosphatases MKP1 et MKP2 sont fortement exprimées dans des lignées tumorales humaines de différentes origines (voir tableau 3, au dos de la p41) (20, 100, 258, 266, 416, 472, 507). Dans le cas de MKP1 il faut noter que son expression est particulièrement augmentée durant les premiers stades du développement tumoral, elle est même considérée comme un marqueur de mauvais pronostique (100). Cependant, ces phosphatases sont exprimées dans des tumeurs présentant une forte activité de la voie des MAPK1/3, ce qui implique que leur expression n'affecte pas le niveau global d'activité des MAPK1/3, bien qu'elle inhibe la réactivation des MAPK1/3 par le sérum (20, 507). Puisque l'expression de ces phosphatases nucléaires n'affecte pas le niveau global d'activité des MAPK1/3 il serait intéressant de déterminer son effet sur le niveau des formes actives nucléaires des MAPK1/3. La surexpression des phosphatases nucléaires dans les tumeurs indique que c'est l'activité nucléaire des MAPK1/3 qui serait un frein au développement tumoral.
Il faut noter que chez la drosophile, il existe un mutant gain de fonction de MAPK/Rolled, le mutant D319N sevenmaker (52) qui est une forme insensible aux phosphatases et donc constitutivement activée. La mutation correspondante D319N a été réalisée in vitro sur MAPK3, dans les cellules de mammifère et permet l'activation prolongée de MAPK3 en inhibant son association aux phosphatases MKP1 et MKP2 (81). Bien que cette mutation soit la conséquence d'une simple substitution G/A, elle n'apparaît jamais dans les cellules tumorales. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle cette mutation est contre-sélectionnée.
Enfin, l'expression de MKP1 corrèle avec une résistance des cellules tumorale à l'apoptose (266, 416), ce qui suggère que l'activité nucléaire des MAPK pourrait avoir comme rôle antiprolifératif d'augmenter l'apoptose.

Phosphatase	Origine tumorale	Référence
MKP1/DUSP1	adenocarcinome gastrique	(20)
	vessie	(258)
	sein	(258)
	tumeurs primaires du sein	(472)
	colon	(258)
	prostate	(258, 266)
	lignée tumeur de prostate DU145	(416)
	carcinome ovarien + lignées OAW-42 et CAOV-3	(100)
MKP2/ DUSP4	tumeurs primaires du sein	(472)
	lignées tumeur pancréas BxPc-3, Capan-1 et Capan-2	(507)

Tableau n° 3: Lignées tumorales surexprimant les MPKs

2.2 La mort induite par les drogues chimiothérapeutiques dépend de l'activation de la voie des MAPK1/3

Les drogues chimiothérapeutiques sont utilisées dans le traitement des cancers pour leur effet sur l'arrêt de la division cellulaire et l'induction de la mort cellulaire. De nombreuses études montrent que la voie des MAPK1/3 est activée en réponse à ces drogues et que cette activation favorise l'apoptose.

a) La mort cellulaire induite par le Taxol dépend de l'activation de la voie des MAPK

Le Taxol, un inhibiteur de la formation des microtubules, est utilisé en chimiothérapie pour son rôle antimitotique et ses effets proapoptotiques (pour revue (453)). Dans une lignée issue de tumeur du sein (MCF7) ainsi que dans des cellules issues de neuroblastomes, le Taxol induit l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3. Dans ces cellules, l'inhibition de la voie des MAPK par le PD98059 diminue la mort cellulaire induite par le Taxol et dépendante des caspases (17, 160). Dans une autre lignée de tumeur du sein (MDA-MB-231), l'induction de MKP1 par la dexamethasone est directement impliquée (siRNA anti MKP1) dans la résistance contre la mort induite par le Taxol (491). Cela suggère que l'activation nucléaire des MAPK joue un rôle dans la mort induite par cette drogue et expliquerait pourquoi MKP1 est un facteur de mauvais pronostique dans les tumeurs (100). Cependant les mécanismes d'activation de la voie MAPK par le Taxol ne sont pas connus.

b) La voie des MAPK favorise l'apoptose induite par les agents génotoxiques

L'induction de dommages à l'ADN crée un stress génotoxique. Ce stress active des complexes mutiprotéiques, qui entraînent l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN. Lorsque les dommages sont irréparables il y a activation de l'apoptose mitochondriale par un mécanisme dépendant généralement de p53. Les principaux traitements anticancéreux, la radiothérapie et la chimiothérapie, sont utilisés pour leur effets génotoxiques. L'étoposide par exemple, agit en inhibant la topoisomérase II, une enzyme

impliquée dans la réparation de l'ADN. Le cisplatine interagit avec les sites nucléophiles des bases purine de l'ADN entraînant la formation de liaisons entre molécules d'ADN.
Plusieurs études sur des lignées tumorales ou transformées (421, 437, 474, 484, 505), mais aussi sur des cellules primaires ou immortalisées (14, 78, 437) montrent que le traitement avec des agents génotoxiques induit une activation de la voie des MAPK1/3 qui est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire.

Drogue	Origine cellulaire	Référence
étoposide	fibroblastes embryonnaires transformés	(421)
	MEF et NIH3T3	(437)
adriamycine	NIH3T3	(437)
cisplatine	lignée immortalisée tubule proximal de rein (TKPTS)	(14)
	Adénocarcinome cervix (HeLa)	(474)
	carcinome poumon (A549)	(474)
	ostéosarcome (Saos-2)	(484)
	neuroblastome (Kelly)	(484)
doxorubicine	tumeur du sein (MCF7)	(505)
	neuroblastome (SK-N-SH)	(160)
Taxol	tumeur du sein (MCF7)	(17)
	tumeur du sein (MDA-MB-231)	(491)
	neuroblastome (SK-N-SH)	(160)
PITC	tumeur de la prostate (PC3)	(495)
irradiation		
rayons γ	fibroblates L929	(78)
rayons UV	NIH3T3	(437)

Tableau n° 4 : la voie des MAPK1/3 et l'apoptose induite par les agents anticancéreux

Cette mort cellulaire, qui survient en moins de 24h, implique la relocalisation des phosphatidyl sérines sur la face externe de la membrane plasmique (14, 421, 495), ainsi que l'activation de la caspase 3 (14, 421) ce qui est caractéristique de l'apoptose. La sortie de cytochrome c dans le cytosol (474) et l'inhibition de la mort par Bcl-2 et Bcl-xL (437) indiquent que l'activation des MAPK est principalement impliquée dans l'induction de l'apoptose mitochondriale.

L'activation des MAPK1/3 par les agents génotoxiques est caractérisée par une activation prolongée sur plusieurs heures (jusqu'à 24h) (14, 421, 495, 505), qui dépend de l'activité des kinases MEK1/2 (78, 437, 474, 484). Dans le cas du cisplatine, l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 dépend de l'activité du récepteur à l'EGF, de la voie des kinases de la famille Src (14) ainsi que de la production de ROS (474). Dans le cas de l'étoposide, l'activation de la voie des MAPK1/3 implique aussi les polyamines (421). La kinase ATM (pour ataxia telangiectasia mutated), qui fait partie des protéines induites en réaction à des dommages à l'ADN (524), est impliquée dans l'induction de la voie des MAPK par l'étoposide (437) et par la doxorubicine (323).

Ces résultats indiquent que certains des traitements majeurs du cancer reposent en partie sur l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 et dans ce cas l'inhibition de la voie des MAPK pourrait être associée à la résistance des cellules tumorales aux drogues. Bien que dans certains cas, l'activité de la voie des MAPK1/3 permette le maintien de l'intégrité mitochondriale, la dérégulation des MAPK1 et 3 lors de l'induction de la mort par les agents génotoxiques favorise au contraire l'apoptose mitochondriale.

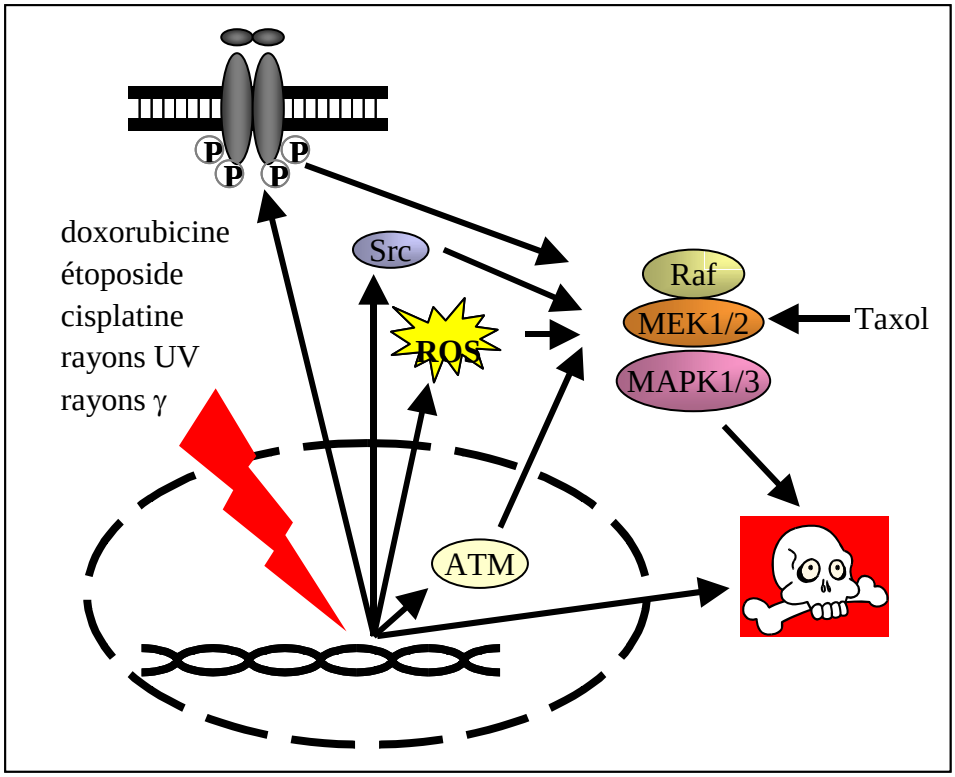

Schéma n°18: La voie des MAPK1/3 est impliquée dans l'apoptose induite par les agent chimiothérapeutiques

La voie des MAPK1/3 est activée de façon prolongée par différents agents utilisés dans les traitements chimiothérapeutiques comme le Taxol, l'étoposide le cisplatine. Ces agents activent les MAPK par des mécanismes impliquant le récepteur à l'EGF, les kinases Src, les radicaux libres et la kinase ATM. Dans la plupart des cas, l'apoptose dépend de la voie mitochondriale.

3 La voie des MAPK est impliquée dans la mort cellulaire induite par les radicaux libres

Les dérivés oxygénés ou ROS sont synthétisés dans les cellules sous la forme d'H2O2 par la NADPH oxydase, de péroxynitrite ONO2- par oxydation de la L-arginine, ou de NO par la NO synthase. Les ROS par leur nature chimique interagissent avec les groupements nucléophiles des protéines, comme les groupements thiol des résidus cystéines, ainsi qu'avec les métaux contenus dans certaines protéines, comme le fer dans les groupements hémiques. Ces modifications régulent les fonctions des protéines impliquées dans de nombreuses réponses physiologiques, comme la régulation de la ventilation respiratoire et la réponse immunitaire. Cependant le stress oxydatif consécutif à la production dérégulée de ROS provoque la mort cellulaire en induisant l'apoptose par la voie mitochondriale. Le stress oxydatif est impliqué dans certaines pathologies et en particulier les maladies neurodégénératives (pour revue(115, 151, 443)).

3.1 L'apoptose induite par les ROS dépend de l'activité MEK/MAPK

Dans différents modèles de cellules en culture (voir tableau 5), la production de ROS intracellulaire par l'enlèvement de sérum (406) ou par hyperoxygénation (517) provoque une mort dépendante de l'activation de la voie des MAPK1/3. On obtient un résultat similaire par l'ajout dans le milieu de culture d' H2O2 (31, 41, 239), de ONO2- (304, 517), ou de donneurs de NO (58, 296, 305). Il faut noter que les cellules neuronales sont particulièrement sensibles à la mort induite par les ROS, en réponse au zinc (326, 393), à l'EGF (67) ou lors de la diminution de potassium extracellulaire (426) (425). La présence de glutamate dans le milieu de culture des neurones primaires ou des lignées neuronales entraîne une diminution du glutathion ce qui augmente la concentration intracellulaire des ROS. En réponse au glutamate l'accumulation des ROS induit l'activation prolongée de la voie des MAPK et une mort cellulaire bloquée par les inhibiteurs de MEK (243, 302, 419, 420).

ROS et Inducteurs de ROS	Origine cellulaire	Référence
H_2O_2	cellules dérivées d'oligodendrocytes (CG4)	(31)
	cellules dérivées d'oligodendrocytes (OLN 93)	(41)
	fibroblastes (L929)	(239)
ONO_2^-	myofibroblates	(517)
	cellules épithéliales transformées de bronche	(304)
	mélange neurones + cellules gliales	(305)
donneurs de NO S-nitrosogluthathione	macrophages (RAW 264 et RES)	(296)
donneurs de NO sodium nitropruside	mélange neurones + cellules gliales	(305)
hypoxie/réoxygénation	mélange neurones + cellules gliales	(305)
hyperoxie	cellules épithéliales transformées de poumon	(518)
enlèvement de sérum	culture primaire cellules de tubule proximal de rein	(406)
zinc	mélange neurones + cellules gliales	(326)
	cellules PC12 différenciées	(393)
EGF	mélange neurones + cellules gliales	(67)
enlèvement de potassium	mélange neurones + cellules gliales	(425, 426)
glutamate	mélange neurones + cellules gliales	(243)
	cellules neuronales immortalisées hippocampe (HT22)	(243, 419, 420)
	neurones primaires hippocampe	(302)
hémine	culture primaire astrocytaire	(362)
peptide βamiloïde	neurones primaires hippocampe	(354)
6-hydroxydopamine	cellules système nerveux central (B65)	(226)

Tableau n° 5: La voie des MAPK1/3 et la mort cellulaire induite par les ROS

3.2 Les ROS activent la voie des MAPK par un mécanisme biphasique

La production des ROS entraîne une activation biphasique de la voie des MAPK1/3 (58, 163, 518) avec une activation précoce forte et transitoire (31, 239, 305, 362, 393, 517), suivie d'une activation prolongée pendant plusieurs heures (41, 243, 304, 406, 419, 420, 425, 426). Cette cinétique caractéristique correspond à différents niveaux d'intervention des ROS dans l'activation de la voie des MAPK1/3. Ils entraînent la prolongation de l'activité des récepteurs aux facteurs de croissance, comme ceux du PDGF et de l'EGF (239, 517) (pour revue (115)). Les ROS peuvent aussi activer la voie des MAPK1/3 par un mécanisme dépendant de la voie des kinases Src (239), de la voie des PKC notamment PKCδ (239), de la voie du GMPc (58). L'oxydation de la cystéine 118 de Ras en réponse au NO permet d'augmenter le recrutement et l'activation de Raf-1 (101, 231). Au niveau de Raf-1, l'oxydation des cystéines du domaine CRD de Raf-1 par un mécanisme dépendant du rétinol permet de lever son auto inhibition (179). Enfin le ONO_2^- provoque la nitrosylation et l'autophosphorylation d'une forme recombinante de MEK (517). Ces modifications correspondent à la phase d'activation forte et transitoire de la voie des MAPK1/3. La phase d'activation prolongée des MAPK1/3 par les ROS fait intervenir l'inhibition des phosphatases responsables de la régulation négative des MAPK1/3 (58, 243) (pour revue (141)). Les tyrosines phosphatases possèdent toutes un site catalytique contenant une cystéine cruciale pour l'activité (pour revue (209)). Du fait de leur faible pKa, les cystéines des phosphatases à double spécificité thréonine/tyrosine sont très sensibles à l'oxydation et sont facilement inactivées par les ROS (377, 460). Ainsi l' H_2O_2 oxyde la cystéine C258 du site catalytique de MKP1 et la cystéine C293 du site catalytique de MKP3, et inhibe leur activité vis à vis des MAPK1/3 (202). Ainsi les ROS activent la voie des MAPK1/3 de façon transitoire au niveau des kinases Raf-1 et MEK et maintiennent l'activité prolongée des MAPK en inhibant leurs phosphatases.

Il faut noter que, parmi les études sur l'activation prolongée de la voie des MAPK lors du traitement par les drogues chimiothérapeutiques, certaines montrent une activation progressive des MAPK (14, 421, 437, 474) avec parfois plusieurs heures de décalage entre la stimulation des cellules par la drogue et le début de l'activation de la voie des MAPK (17, 160, 474, 484). Dans le cas du taxol, il a été montré que l'activation des MAPK était biphasique (17, 160). De plus les ROS sont impliqués dans l'activation des MAPK par le

cisplatine (474). On pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle, l'induction de la mort par les agents chimiothérapeutiques soit favorisée par l'activation prolongée nucléaire des MAPK par les ROS.

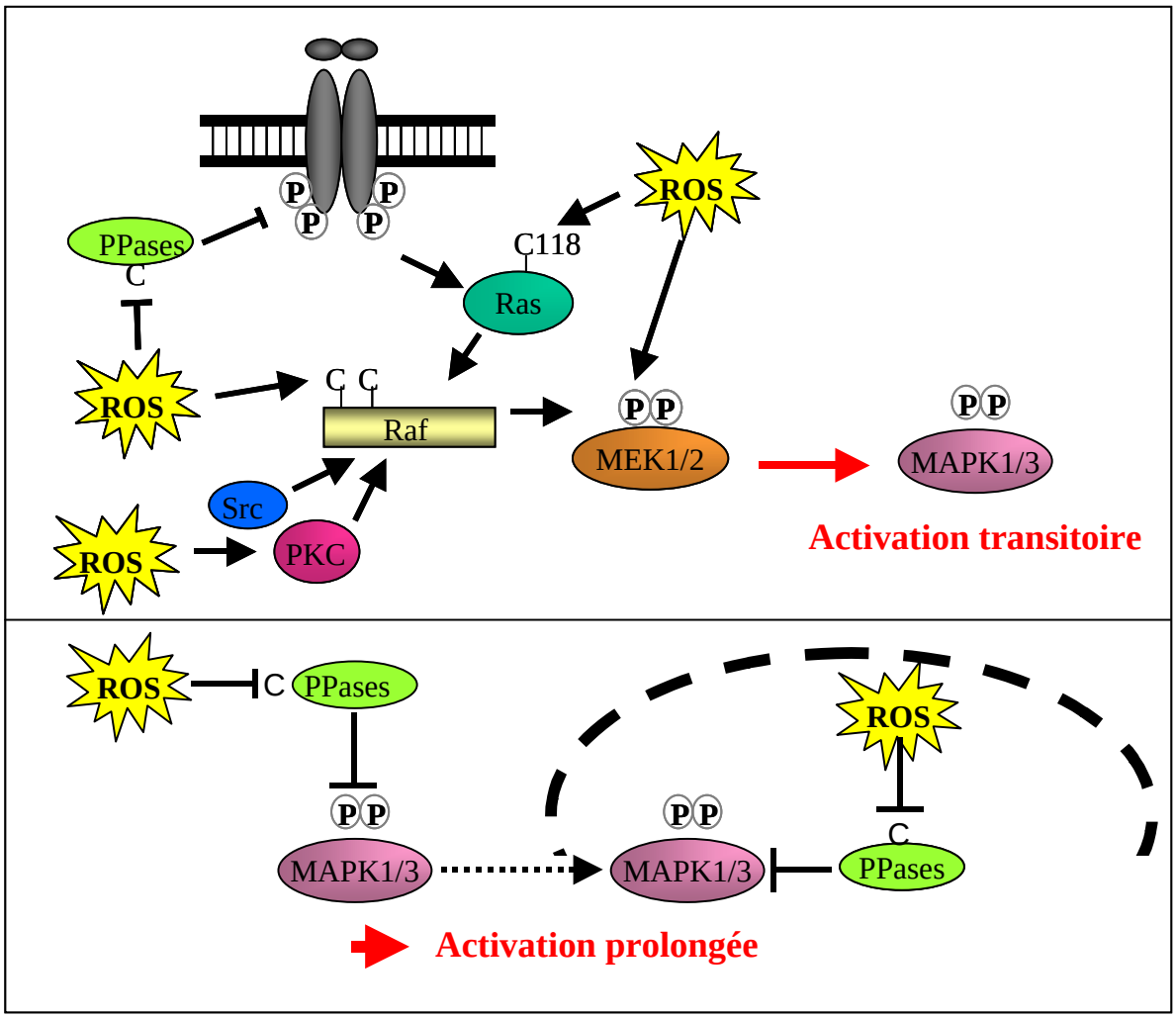

Schéma n°19: Les radicaux libres activent la voie des MAPK en deux phases

L'activation de la voie des MAPK est impliquée dans la mort cellulaire induite par les ROS (radicaux libres). Ces ROS ont pour particularité d'activer la voie des MAPK en deux phases. Les ROS activent de façon forte et transitoire les MAPK1/3 par différents mécanismes impliquant les récepteurs membranaires, les kinases Src et PKC et l'activation directe de Ras et MEK. Dans un second temps les ROS permettent une activation plus faible mais prolongée des MAPK1/3. Cette activation prolongée des MAPK provient de l'inhibition des sites catalytiques des phosphatases cytosoliques et nucléaires par les ROS.

3.3 La mort induite par les ROS dépend de l'activation nucléaire prolongée des MAPK

Dans les cellules astrocytaires (362) et dans les neurones (419, 426), la mort dépendante des ROS est caractérisée par la rétention nucléaire prolongée de la forme active des MAPK1/3. Dans les neurones, la localisation cytoplasmique forcée des MAPK1/3 par surexpression de la forme inactivée de la phosphatase cytoplasmique MKP3, MKP3 C293S, bloque la mort induite par le glutamate. Ce mutant de MKP3 n'ayant pas d'effet sur l'activité cytoplasmique des MAPK1/3, on peut conclure que l'activité nucléaire prolongée des MAPK1/3 est nécessaire à l'induction de la mort. Le maintien de l'activité nucléaire des MAPK1/3 est lié à l'inhibition de l'activité des MKP nucléaires par les ROS (243). En revanche le mécanisme d'accumulation nucléaire des MAPK reste encore inconnu. Les MAPK1/3 pouvant transloquer librement entre le cytoplasme et le noyau (480), leur rétention nucléaire nécessiterait un ancrage nucléaire. En réponse au glutamate, l'accumulation nucléaire de la forme active des MAPK1/3 dépend de la synthèse protéique (419). De plus cette relocalisation des MAPK peut aussi être induite par un inhibiteur du protéasome, ce qui laisse supposer que l'ancre nucléaire est une protéine à courte durée de vie.

Enfin il faut noter que l'activation nucléaire prolongée des MAPK a aussi été impliquée dans la mort des fibroblastes embryonnaires murins en réponse à la surexpression des formes dominantes négatives des petites protéines G Rac et Cdc42 (370, 532), et pourrait aussi être lié à l'apoptose induite par le Taxol dans les cellules tumorales MDA-MB-231 (491).

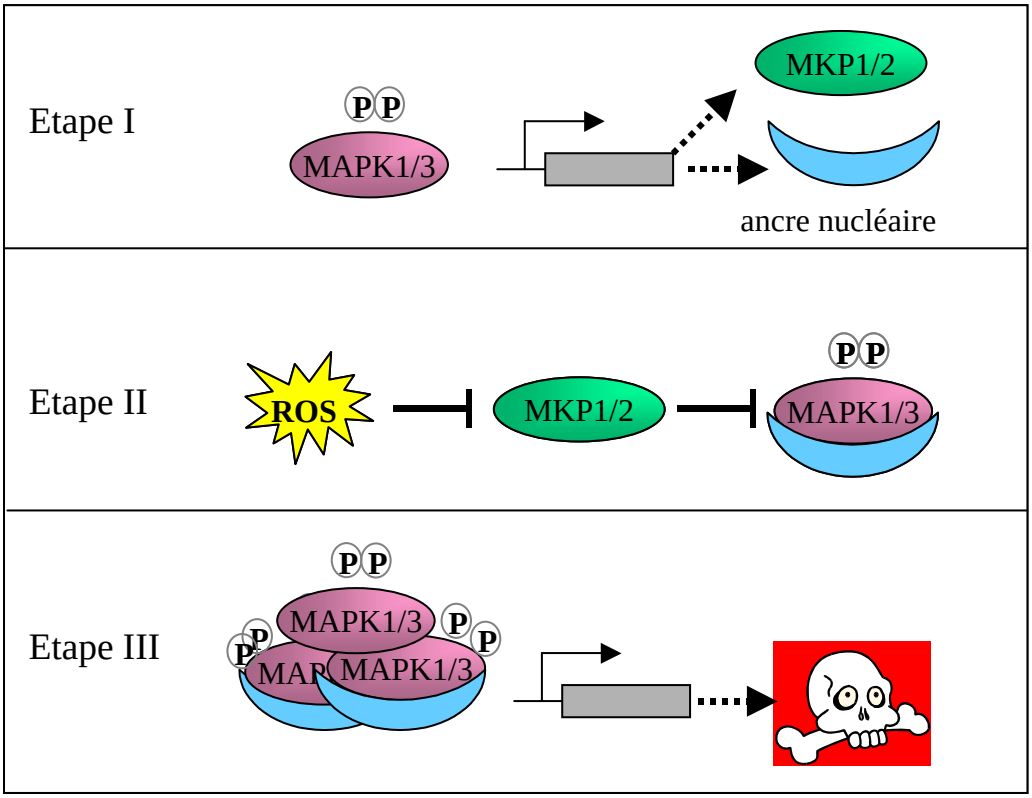

Schéma n°20: Modèle hypothétique d'induction de la mort cellulaire par les MAPK
L'apoptose induite par les ROS (radicaux libres) est dépendante de l'activité prolongée nucléaire des MAPK1/3. Lors de leur activation les MAPK sont capables de transloquer dans le noyau où elles induisent l'expression de nombreux gènes parmi lesquels des ancres nucléaires et des phosphatases (étape I). Lorsque les cellules sont stimulée ou produisent des ROS les phosphatases nucléaires sont inhibées par les ROS (étape II). IL se produit alors une accumulation anormale des formes actives des MAPK1/3 dans le noyau. Cette activitée prolongée entraîne alors l'induction de gènes conduisant à la mort des cellules (étape III).

3.4 L'activation des MAPK par les ROS induit l'apoptose mitochondriale

L'apoptose mitochondriale est l'un des principaux mécanismes de mort induite par les ROS. Lorsque le niveau intracellulaire de ROS est trop élevé, le stress oxydatif mitochondrial provoque la sortie des protéines de mort mitochondriales (pour revue (136)). Certaines études montrent que l'activation de la voie des MAPK1/3 par les ROS induit rapidement (en moins de 12 h) l'activité des caspases (239), en particulier la caspase 3 (296, 518) et la caspase 9 (518).

L'activation des caspases est associée à la sortie du cytochrome c (518) et à la fragmentation de l'ADN internucléosomique (239, 518). La mort induite par les ROS et dépendante de la voie des MAPK1/3 correspondrait à l'apoptose par la voie mitochondriale. S'il est établi que

la voie des MAPK n'est pas impliquée dans l'augmentation intracellulaire des ROS (362, 393, 419, 425), on ne connaît pas encore le lien entre l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 par les ROS et l'apoptose mitochondriale.

a) La voie des MAPK1/3 est impliquée dans une mort indépendante de l'activité des caspases

Dans le modèle de mort cellulaire induite par la diminution du potassium extracellulaire dans des cultures primaires de neurones et de cellules gliales, l'activité de la voie MAPK1/3 est impliquée davantage dans la perméabilité et la condensation des noyaux que dans l'activation des caspases ou dans la dégradation de l'ADN (425, 426). Ce type de mort correspondrait à la paraptose, un modèle de mort cellulaire non apoptotique insensible aux inhibiteurs de caspase et à Bcl-$x_{L,}$ mais qui est inhibée par la cycloheximide(414). L'activation de la voie des MAPK1/3 par les ROS dans des cultures primaires de neurones et de cellules gliales a été aussi associée à la mort cellulaire par nécrose. Dans ce type de mort les noyaux restent intacts mais la membrane externe est endommagée, provoquant ainsi une perméabilisation des cellules (67). L'activation de la voie des MAPK par les ROS est donc associée à la mort par apoptose, paraptose ou par nécrose.

Il faut noter que plusieurs études sur la mort induite par les ROS et dépendante de la voie des MAPK ne donnent pas de précision sur les caractéristiques de la mort cellulaire, en ne montrant que la perméabilisation de la membrane externe des cellules ((3, 227, 243, 326) ou la perte du métabolisme (Test MTT) (67, 393, 406, 419 , 420 , 517)). Dans ces études on ne sait pas quel est le type de mort cellulaire.

4 La mort cellulaire induite par la voie des MAPK est impliquée dans les maladies neurodégénératives

L'activation de la voie des MAPK1/3 par le stress oxydatif pourrait être impliquée dans différentes pathologies impliquant la mort des cellules neuronales. Je vais détailler son rôle dans la mort au cours de l'ischémie cérébrale et pendant le développement des maladies neurodégénératives (pour revues(80 , 83, 283)) .

4.1 L'activation de la voie des MAPK est directement impliquée dans la mort des neurones après ischémie

L'ischémie suivie d'une oxygénation est un stress cellulaire hypoxique provoqué par l'arrêt transitoire de la circulation sanguine lors d'une attaque cardiaque ou cérébrale, ou encore lors des greffes d'organe. Les cellules touchées produisent alors des ROS, ce qui peut conduire selon l'intensité du stress à une mort cellulaire massive.

Dans des modèles murins d'ischémie-reperfusion par ligature des artères carotides ou cérébrales, on observe une activation des MAPK1/3 localisée dans les zones hypoxiques et qui est en relation avec la mort des neurones (6, 475), en particulier au niveau des neurones de l'hippocampe (138, 159) (305, 311, 318). L'implication directe de l'activité de la voie des MAPK1/3 dans la mort des neurones a pu être démontrée par l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de MEK. En effet, l'injection intra-cérébrale de PD98059 (6) ou intraveineuse de U0126 (305) diminue la destruction des neurones et réduit la taille de la zone affectée. Ces résultats montrent que l'activation de la voie des MAPK1/3 est directement impliquée in vivo dans la mort cellulaire neuronale suite à un stress oxydatif. Les souris transgéniques surexprimant la superoxide dismutase, une enzyme antioxydante, démontrent que la mort liée à l'activation de la voie des MAPK1/3 durant l'ischémie est directement liée à la production de ROS (311).

L'activation de la voie des MAPK1/3 a été impliquée in vivo dans la mort des cellules gliales de la rétine dans un modèle d'ischémie par surpression oculaire (369) et dans un modèle de neurodégénération suite à un traumatisme du cerveau (298). Dans ces deux modèles, là encore l'inhibition pharmacologique des MEK1/2 diminue la mort cellulaire.

a) La mort des neurones ischémiés est en relation avec la localisation nucléaire prolongée des formes actives des MAPK

Dans les différentes études sur l'ischémie cérébrale, la durée d'activation des MAPK1/3, de l'ordre de 6h, n'est pas aussi prolongée que dans les cellules en culture. Néanmoins, cette activation entraîne une localisation nucléaire prolongée des formes actives des MAPK1/3 (6, 138, 311). L'injection crânienne intraventriculaire de TGF-α, qui empêche l'activation prolongée des MAPK dans les noyaux cellulaires, protège les neurones de l'ischémie cérébrale (138). Ainsi l'accumulation nucléaire des formes phosphorylées des MAPK1/3 pourrait avoir un rôle dans la mort cellulaire in vivo provoquée par l'ischémie. Il serait intéressant de vérifier dans les souris surexprimant la superoxide dismutase si cette activation nucléaire pathologique des MAPK1/3 est liée à la production de ROS.

4.2 La voie des MAPK est activée durant les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson

La mort neuronale qui fait suite à un stress oxydatif est aussi à l'origine des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Plusieurs études in vitro et in vivo montrent que la voie des MAPK1/3 est aussi impliquée dans ces modèles de mort cellulaire. Les études post-mortem réalisées sur des coupes histologiques de cerveau de personnes ayant été atteintes par la maladie d'Alzheimer (15 , 135, 331, 371, 528) ou par la maladie de Parkinson (227, 475 , 526), montrent la présence des formes actives des MAPK1/3 dans les neurones des zones dégénérées et en particulier dans l'hippocampe. Toutefois leur localisation n'est pas la même que dans le modèle de neurodégénéréscence par ischémie, puisque l'on retrouve les formes phosphorylées des MAPK1/3 dans des inclusions granulaires cytoplasmiques (135, 526, 528). Dans les neurones en culture, l'inhibition des MAPK1/3 par le PD98059 bloque la mort induite par le peptide β-amyloïde (354) ou par la neurotoxine 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) (227). Ces composés, qui sont respectivement impliqués dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, induisent une mort cellulaire dépendante des ROS (226, 497), (pour revue (11)). Dans le cas de la 6-OHDA, l'induction des ROS entraîne l'activation de la voie des MAPK1/3 (226). Ces résultats indiquent que, comme dans l'ischémie cérébrale, l'activation des MAPK par les ROS serait impliquée dans la mort neuronale au cours des maladies neurodégénératives.

a) La voie des MAPK et la phosphorylation de Tau

La phosphorylation de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer provoquerait la formation de fibres neuronales caractéristiques de cette pathologie et responsables de la destruction des neurones (pour revue(110)). Il a été montré in vitro que l'activation de la voie des MAPK1/3 par le peptide β-amyloïde (354) entraîne la phosphorylation de la protéine Tau sur les résidus sérine 199 et sérine 202. Les études post mortem sur des coupes de cerveau de patients victimes de la maladie d'Alzheimer associent la phosphorylation de Tau avec l'activation des MAPK1/3 (135, 331). Dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer par surexpression de la protéine humaine apoE4, l'activation de la voie des MAPK et la phosphorylation de Tau apparaissent progressivement quelques mois après la naissance des souris (168). Si les neurones de ces souris présentent une augmentation de l'activité des MAPK1/3 dès le 5ème mois, la phosphorylation de Tau n'est détectée que entre le 9ème et le 18ème mois. Dans ce modèle murin, il reste à établir s'il existe une relation entre l'activation chronique des MAPK, la phosphorylation de Tau, et la neurodégénéréscence. Enfin, la phosphorylation de Tau a aussi été décrite dans des cellules de neuroblastome, lors de la mort dépendante de l'activation des MAPK par le taxol (160). Ainsi la phosphorylation de Tau pourrait être un mécanisme général de l'apoptose induite par la voie des MAPK dans les neurones.

5 Mécanismes impliqués dans l'effet proapoptotique de la voie des MAPK

Dans les paragraphes précédents, j'ai pu décrire plusieurs modèles impliquant la voie des MAPK dans la mort cellulaire, en particulier dans l'apoptose mitochondriale. Cependant il existe encore peu de mécanismes décrits faisant le lien entre la voie MAPK et l'induction de la mort cellulaire. J'ai regroupé dans cette dernière partie les mécanismes communs à différents modèles de mort cellulaire, en particulier les mécanismes impliquant des facteurs de transcription.

5.1 La voie des MAPK induit la mort cellulaire par perte d'ancrage

Dans la première partie de cette introduction, j'ai cité plusieurs études qui montraient un rôle protecteur de la voie des MAPK1/3 contre la mort induite par perte d'ancrage (12, 235, 271, 372, 388). L'activation soutenue de la voie des MAPK provoque la perte d'adhérence des cellules (379). Dans certains cas cette perte d'adhérence entraîne la mort cellulaire, comme lors de la stimulation chronique des cellules de tumeur du sein MDA-MB-468 par l'EGF (222), lors de la stimulation de ΔRaf-1ER chez les ostéoblates (436) ou suite à la surexpression de ΔRaf -1 dans cellules de tumeur de sein MCF-7 (124). Dans ces modèles, la mort cellulaire est liée à l'expression du récepteur Fas et à la perte de protéine Bcl-2 (436), ou à une activation de l'apoptose mitochondriale par un mécanisme indépendant du contrôle de Bcl-2 (222). La perte d'ancrage cellulaire peut donc être une des causes de la mort induite en réponse à une activation prolongée des MAPK1/3. Dans les fibroblastes embryonnaires de souris, il a même été montré que la perte d'ancrage induit une activation transitoire de la voie des MAPK1/3 qui est nécessaire à la mort cellulaire (532).

5.2 La voie des MAPK et la phospholipase A2

La phospholipase A2 cytosolique, cPLA2, est une enzyme impliquée dans la production d'acides gras insaturés comme l'acide arachidonique (pour revue (68)). L'activation de la voie des MAPK1/3 par stimulation du récepteur Fas dans les cellules de Sertoli (456), par la leptine dans les adipocytes (211) ou par le récepteur BCR dans des cellules de lymphome B (145) induit simultanément la mort cellulaire et l'activation de la phospholipase A2. Il a été montré que l'activité MEK est impliquée dans la phosphorylation (shift up) de cPLA2 (381, 432). L'utilisation d'un inhibiteur de cPLA2, le AACOCF3, montre que l'activation de la cPLA2 par les MAPK est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire, qu'elle est liée à l'augmentation du FasL, à la sortie du cytochrome c et à l'activation de la caspase 3 (211, 456).

5.3 Rôle des isoformes MAPK1 et MAPK3 dans la mort cellulaire

Dans les fibroblastes murins irradiés aux rayons γ, la surexpression de la protéine chaperonne HSP25 bloque la mort cellulaire en augmentant la dégradation des MAPK1/3. La surexpression de l'isoforme MAPK1 mais pas celle de MAPK3, empêche le rôle protecteur de HSP25 (78). Dans les cellules transformée 293T, la mort induite par activation du récepteur à la neurokinin-1 par la substance P, est bloquée en réponse aux siRNA contre l'ARNm de mek2 et mapk1 mais pas par ceux de mek1 et mapk3 (65). Enfin dans les cellules de médulloblastome, la transfection d'un ARN antisens spécifique de MEK1 diminue la mort induite par la geldanamycine (56). L'étude de la contribution des isoformes des MAPK dans l'induction de la mort cellulaire comprend encore trop peu d'exemples pour en tirer une conclusion définitive. Il ne semble pas y avoir de spécificité marquée des kinases MEK1 et MEK2 ce qui est en accord avec leur capacité à activer les MAPK. En revanche, il semblerait que l'isoforme MAPK1 joue un rôle prépondérant dans les cellules où l'activation de la voie des MAPK induit la mort cellulaire.

5.4 L'activité transcriptionnelle de la voie de signalisation des MAPK dans la mort cellulaire

Dans la plupart des cas où la voie des MAPK1/3 est impliquée dans l'induction de la mort cellulaire, on observe une activation prolongée des MAPK1/3. Il est probable que cette période est nécessaire à l'induction des gènes ou à l'accumulation des protéines responsables de la mort cellulaire. Dans les cellules épithéliales issues de cancer du sein, l'analyse des gènes régulés en réponse à l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 révèle l'induction de plusieurs gènes impliqués dans la mort cellulaire, comme fas, c-myc ou cd55/daf (156, 388).

a) L'apoptose induite par la voie des MAPK dépend de p53

La protéine p53 est un facteur de transcription dont le rôle est de contrôler l'intégrité du génome avant la réplication de l'ADN. L'expression de p53 est contrôlée en permanence par la protéine MDM2, qui se fixe à p53 et entraîne sa dégradation par le protéasome. Lorsque le génome subit des altérations, la liaison entre p53 et MDM2 est inhibée par différents mécanismes post-traductionnels et p53 s'accumule, induisant alors la protéine p21.

Lorsque les dommages causés sont trop importants, p53 déclenche la mort cellulaire en réprimant des gènes codant pour des protéines de survie comme Bcl-2 ou en induisant des gènes codant pour des protéines de mort comme le récepteur de mort DR5, ou la protéine de mort mitochondriales Bax (pour revue (410)). L'une des conséquences de la résistance des cellules tumorales à la mort est l'extinction de l'expression ou la perte de fonctionnalité de la protéine p53 et cela dans 50% des tumeurs humaines (174).

L'utilisation de fibroblastes embryonnaires p53-/- montre que la protéine p53 est nécessaire dans la mort induite par surexpression de RacN17 et Cdc42N17 et dépendante de la voie des MAPK1/3 (232). L'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 par le Taxol (17) et les agents génotoxiques (335, 397, 437, 484, 505) induit la protéine proapoptotique p53. Cette induction dépend de la phosphorylation de p53 par les MAPK1/3 sur son résidu sérine 15 (335, 397, 400), ce qui a pour effet de stabiliser p53 en empêchant sa liaison à la protéine MDM2 et sa dégradation par le protéasome. L'activation des MAPK1/3 par la doxorubicine est aussi impliquée dans la phosphorylation de la thréonine 55 de p53, ce qui pourrait augmenter son activité proapoptotique (505). L'induction et l'activation de p53 par la voie des

MAPK1/3 sont associées avec la diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 (17, 437) et avec la répression de son gène (505). Ainsi l'un des mécanismes d'induction de la mort par la voie des MAPK est de stabiliser p53 qui provoque l'activation de la mort mitochondriale par diminution du taux de Bcl-2. Cependant l'utilisation de cellules n'exprimant pas p53 (437, 484, 495) montre que l'apoptose induite par la voie des MAPK ne dépend pas uniquement de p53.

b) Le facteur de transcription Nur77

Le facteur de transcription Nur77/NGF1-B, qui appartient à la famille des récepteurs orphelins nucléaires, est impliqué dans l'induction de gènes qui régulent la mort cellulaire, notamment durant la sélection négative des lymphocytes T (pour revue (483)). Nur77 intervient également directement au niveau de la mitochondrie où son interaction directe avec Bcl-2 entraîne la mort cellulaire (248). Dans les lymphocytes T (458), et les cellules de la granulosa de l'ovaire (423) l'activation de la voie des MAPK induit nur77. La voie des MAPK1/3 augmente aussi l'activité transcriptionnelle de Nur77 en phosphorylant son résidu thréonine 142 (223, 409). L'utilisation de siRNA a montré que Nur77 est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'activation de la voie des MAPK1/3 en réponse à la neurokinine (65). Dans les lymphocytes T, l'induction de Nur77 par la voie des MAPK1/3 pourrait être impliquée dans l'induction du fasL (353, 458, 527). Il faut noter que nur77 est l'un des gènes les plus fortement induits après ischémie, en particulier dans les neurones de la région CA1 de l'hippocampe (62) et que son expression augmente l'efficacité des drogues chimiothérapeutiques (403). Il serait donc intéressant de vérifier si l'induction de nur77 par la voie des MAPK1/3 est impliquée dans la mort induite par l'ischémie et par les drogues chimiothérapeutiques.

c) Le facteur de transcription Egr-1

La protéine Egr-1 ou NGF1-A est un facteur de transcription impliqué dans la mort induite par les UV (449) et fait partie des gènes induits par la voie des MAPK dans les cellules épithéliales MCF10 (388) et dans les cellules B (363). La transfection d'un ARN antisens a montré que l'induction de egr-1 est nécessaire lors de la mort neuronale induite par le zinc et dépendante de la voie des MAPK1/3 (326). Il faut noter que comme nur77, egr-1 est

fortement induit lors de l'ischémie cérébrale (62). Ces facteurs de transcription sont de bons candidats pour assurer le relais entre l'activité des MAPK et la mort neuronale lors de l'ischémie.

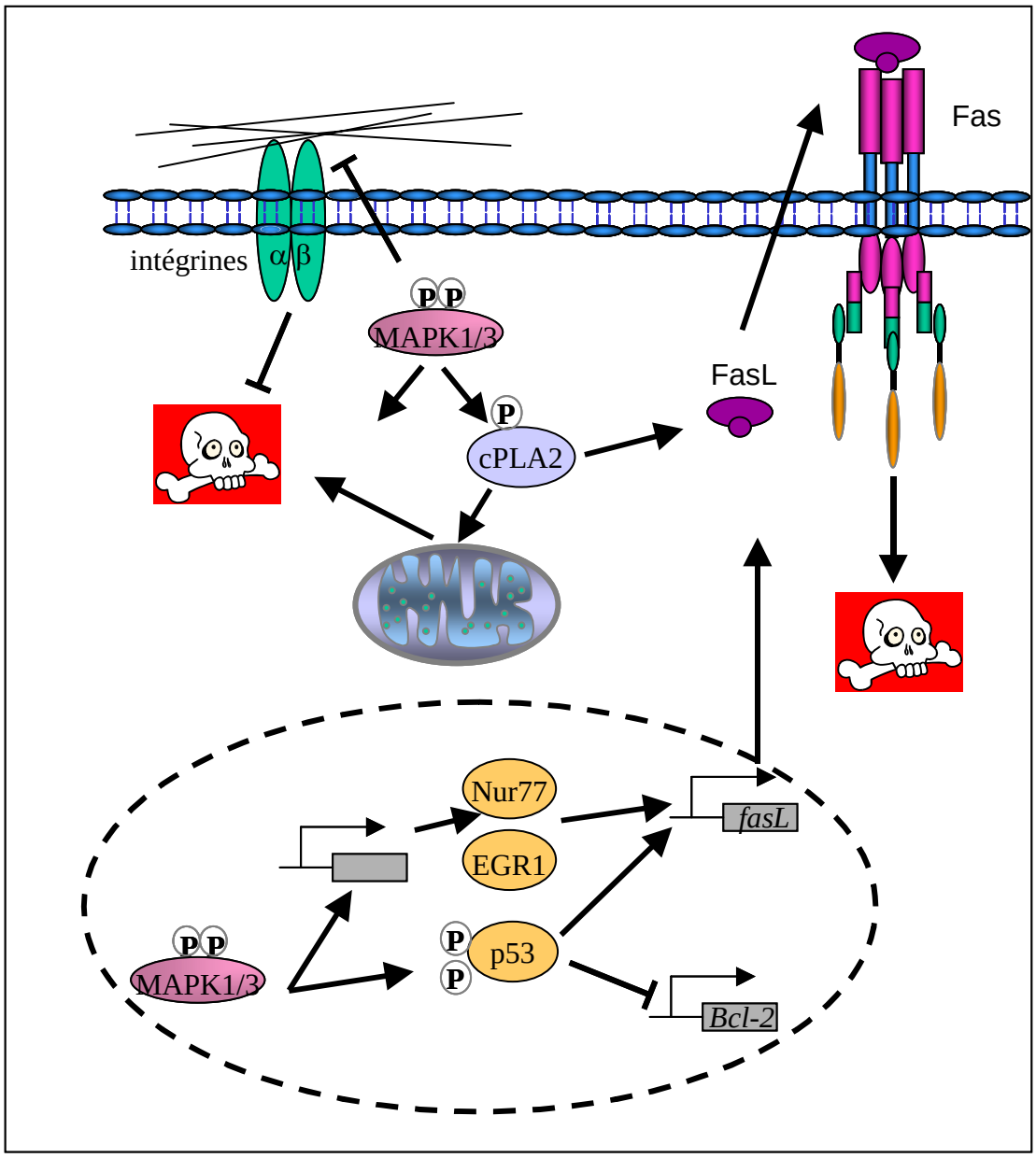

Schéma n°21: Les mécanismes impliqués dans la mort induite par la voie des MAPK
L'activité MAPK permet d'induire ou d'activer les facteurs de transcription Sp1, Nur77, Egr1 et p53 qui sont tous impliqués dans l'induction de gènes proapoptotiques comme le *fasL*. Dans le cytoplasme, l'activité prolongée des MAPK conduit aussi à la perte d'adhérence des cellules ce qui induit leur mort. Enfin les MAPK1/3 activent la phospholipase A2 qui induit l'apoptose.

d) L’apoptose des lymphocytes T : un modèle d'induction transcriptionnelle de l'apoptose par la voie des MAPK1/3

Durant leur processus de maturation, les lymphocytes reconnaissant les antigènes du soi, sont éliminés par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs T ou B, et durant ce processus, l’activité de la voie des MAPK1/3 est liée à la mort cellulaire.

Dans les thymocytes (273) ou dans des lignées cellulaires dérivées de lymphocytes T comme les cellules Jurkat (458, 527), la stimulation du TCR entraîne à la fois une activation transitoire (inférieure à 2h) des MAPK1 et 3 et la mort cellulaire. L’utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de MEK indique que cette activation des MAPK1/3 est nécessaire à la mort cellulaire en réponse au TCR (273, 458, 527) par un mécanisme lié à l’induction du gène codant pour le ligand de mort FasL (458, 527). Le contrôle transcriptionnel du FasL par les MAPK1/3 pourrait impliquer l’activation du facteur de transcription Sp1 (496) et l’induction du récepteur nucléaire orphelin Nur77 (458). Si la voie MAPK induit le FasL, en revanche l’inhibition de la voie des MAPK1/3 ne modifie pas la mort induite par activation directe du récepteur Fas, ce qui indique que la voie MAPK n’affecte pas la machinerie apoptotique activée par ce récepteur dans les lymphocytes (458, 527). Il faut noter que chez les lymphocytes T, l’activité de la voie des MAPK1/3, quand elle est liée à la mort cellulaire, n’a pas besoin d’être aussi prolongée que dans d’autres types cellulaires. Toutefois cette notion est subjective puisque l’activation mitogénique des MAPK chez les lymphocytes ne dure que quelques minutes(157).

L’activation transitoire des MAPK par le récepteur BCR joue aussi un rôle proapoptotique dans une lignée issue de lymphomes B, mais l’implication du FasL n’a pas été précisée(145). Enfin dans les cellules de Sertoli, la stimulation du récepteur Fas entraîne l’activation de la voie des MAPK1/3 nécessaire à l’induction du FasL, par un mécanisme dépendant de l’activation de la phospholipase cPLA2 (456). On peut ainsi établir un modèle selon lequel, l’activation de la voie des MAPK1/3 active indirectement le récepteur de mort Fas, en augmentant de façon transcriptionnelle la synthèse de son ligand le FasL.

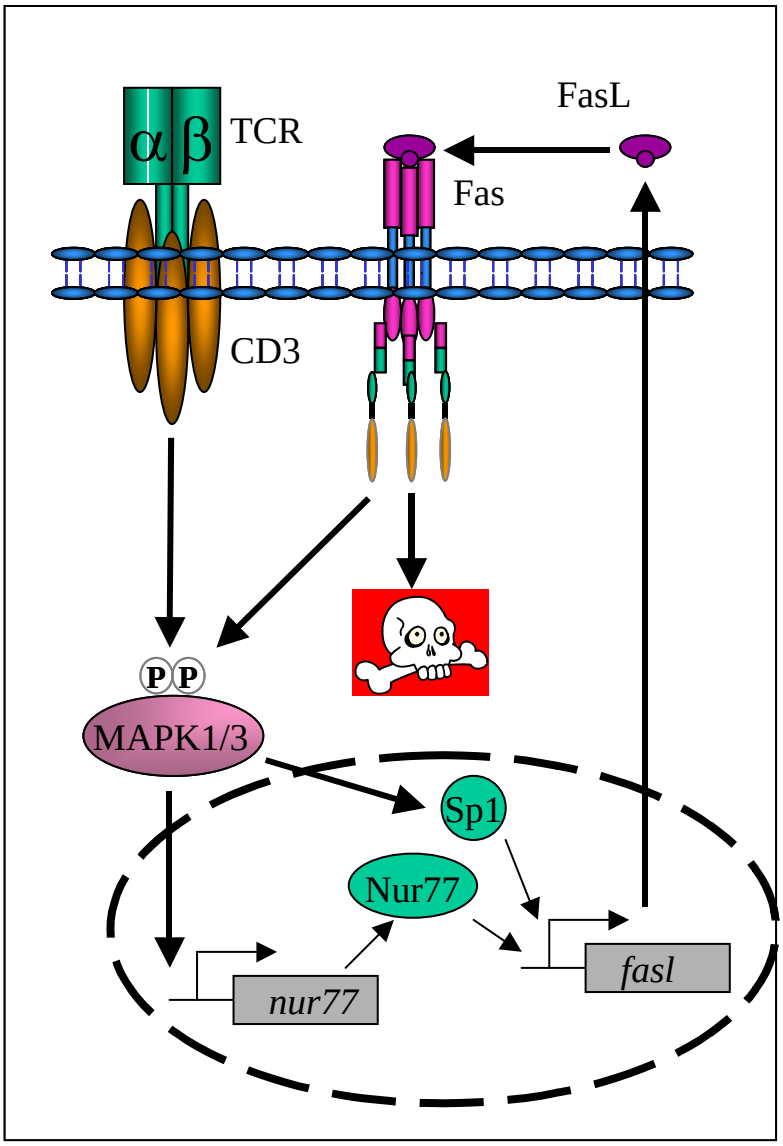

Schéma n°22 : Modèle hypothétique d'induction de la mort cellulaire par les MAPK
L'apoptose induite par les ROS (radicaux libres) est dépendante de l'activité prolongée nucléaire des MAPK1/3. Lors de leur activation les MAPK sont capables de transloquer dans le noyau où elles induisent l'expression de nombreux gènes parmi lesquels des ancres nucléaires et des phosphatases (étape I). Lorsque les cellules sont stimulée ou produisent des ROS les phosphatases nucléaires sont inhibées par les ROS (étape II). IL se produit alors une accumulation anormale des formes actives des MAPK1/3 dans le noyau. Cette activitée prolongée entraîne alors l'induction de gènes conduisant à la mort des cellules (étape III).

La voie Raf/MAPK joue un rôle important mais ambigu dans le contrôle de la mort cellulaire. D'un côté la voie Raf/MAPK joue un rôle antiapoptotique. Elle bloque l'apoptose induite par les récepteurs de mort en empêchant le recrutement de FADD aux récepteurs de mort et en inhibant l'activation de la caspase 8. Elle bloque aussi l'apoptose mitochondriale en contrôlant le ratio des protéines de la famille Bcl-2, ce qui empêche le relarguage du cytochrome c, et en inhibant l'activité des caspases en aval de l'Apoptosome. De façon paradoxale l'activation prolongée de la voie MAPK entraîne aussi l'activation de l'apoptose aussi bien par la voie des récepteurs de mort de par la voie mitochondriale. Cet effet proapoptotique de la voie Raf/MAPK est lié à la production de radicaux libres qui entraînent une activation nucléaire prolongée des MAPK. Le travail de thèse que je vais vous présenter est basé sur le contrôle ambivalent de l'apoptose par la voie des MAPK1/3. Dans deux lignées cellulaires d'origines différentes, l'activation artificiellement prolongée des MAPK grâce à la protéine chimérique ΔRaf-1:ER entraîne deux effets opposés. Dans les cellules fibroblastiques CCL39 ΔRaf-1:ER, l'activation de la voie Raf/MAPK protège les cellules contre l'apoptose induite par enlèvement de sérum. La voie MAPK inhibe l'activation de la caspase 9 en aval de la sortie du cytochrome c, par un mécanisme dépendant de la synthèse protéique et d'une activité soutenue des kinases MEKs. Dans les cellules 293 ΔRaf-1:ER, qui ont des caractéristiques proches des cellules neuronales, l'activation soutenue de la voie MAPK entraîne après 48h une activation de la caspase 8 indépendamment de FADD et des récepteurs de mort. Ce mécanisme proapoptotique requiert une phase précoce de synthèse protéique et une activité MEK soutenue.

Résultats

Article 1 : La voie des MAPK1/3 bloque l'activation de la caspase 9 au sein de l'apoptosome

(en préparation)

Contexte du travail

Les cellules CCl39 sont des fibroblastes de hamster aux caractéristiques non transformées dont la prolifération en culture requiert les facteurs de croissance du sérum et l'adhésion aux matrices extracellulaires. Pour former des tumeurs chez l'animal, ces cellules doivent acquérir la capacité de proliférer en l'absence d'ancrage et de facteurs de croissance (334). Deux observations sont à l'origine de nos travaux : les cellules CCL39 meurent d'apoptose quand elles sont privées d'ancrage et/ou de mitogènes, et l'activation prolongée de la voie Raf-1/MAPK1,3 induit le détachement des cellules mais elles ne meurent pas, même en l'absence de facteurs de croissance (observation de P. Lenormand). Ces observations ont permis d'établir que l'activation *spécifique* de la voie des MAPK1/3 protège de l'apoptose dans ce modèle cellulaire(235). On peut considérer que l'élucidation du mécanisme moléculaire qui permet la survie des cellules en réponse aux MAPK1/3 pourrait contribuer à la connaissance des étapes qui conduisent à la formation des tumeurs.

La plupart des mitogènes activent la voie de signalisation des MAPK1/3, qui jouent un rôle fondamental dans la prolifération et la différentiation cellulaire. La dérégulation de cette voie de signalisation est aussi liée à la survie des cellules transformées, une étape essentielle dans le développement de certains types de tumeurs. Pour étudier les effets d'une activation prolongée des MAPK1/3 sur la survie cellulaire, nous utilisons un modèle de fibroblaste dérivé de CCL39 qui exprime de façon stable la protéine chimérique ΔRaf-1:ER. L'ajout de tamoxifène dans le milieu de culture cellulaire permet de stimuler spécifiquement l'activité de Raf-1 et offre l'opportunité de maintenir active la voie des MAPK1/3 en l'absence des facteurs de croissance. La mort des cellules CCL39 induite par la privation de sérum requiert l'activation de la voie d'apoptose mitochondriale car elle est bloquée par la surexpression de $Bclx_L$. Le projet de cet article a été de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans le blocage de la voie mitochondriale par la voie des MAPK1/3, en particulier dans le blocage de la caspase initiatrice de l'apoptose mitochondriale, la caspase 9.

Résumé du travail

Dans les cellules CCL39, nous déclenchons l'apoptose mitochondriale en enlevant le sérum du milieu de culture des cellules. Il en résulte une désactivation progressive de la voie des MAPK, liée avec une activation rapide (dès 6 heures) de la caspase 9. Après 24 heures, environ 60% des cellules sont mortes ; malgré ces conditions d'apoptose massive, l'activation de ΔRaf-1:ER inhibe totalement le clivage et l'activation de la caspase 9. La protection du clivage de caspase 9 par Raf-1 est sensible aux inhibiteurs pharmacologiques de MEK, une observation en accord avec l'identification par le groupe de P. Clarke d'un site de phosphorylation par les MAPK1/3 sur caspase 9 (10). Toutefois la mutation du site de phosphorylation n'empêche pas l'inhibition du clivage en réponse à ΔRaf-1:ER. Nous avons pu montrer qu'en fait, la protection du clivage de caspase 9 n'est pas un mécanisme purement post traductionnel puisqu'il requiert la synthèse des protéines et des ARN.

L'analyse par immunofluorescence des cellules privées de sérum révèle que l'activation de ΔRaf-1 bloque bien les événements en aval de l'activation de la caspase 9, comme le clivage de la caspase 3 ainsi que la fragmentation des noyaux, mais n'interfère pas avec la sortie du cytochrome c de la mitochondrie. Puisque le cytochrome c dans le cytosol entraîne la formation de l'apoptosome, ce résultat indique que le médiateur de ΔRaf-1 empêche l'activation de la caspase 9 par l'apoptosome. En analysant la formation de l'apoptosome par chromatographie d'exclusion, nous avons montré que ΔRaf-1 n'inhibe ni la multimérisation d'Apaf1, ni le recrutement de la procaspase 9 dans l'apoptosome. En choisissant des conditions qui maintiennent l'activité de la voie Raf-1/MAPK dans des extraits cytosoliques, on empêche l'activation *in vitro* de la caspase 9 par le cytochrome c et l'ATP. Dans des conditions qui provoquent la formation de l'apoptosome, l'activation de la voie Raf-1/MAPK pourrait ainsi limiter l'activation de la caspase 9 et bloquer la signalisation apoptotique. L'expression de XIAP, le principal inhibiteur de la caspase 9, n'étant pas affectée en réponse à ΔRaf-1 :ER, ces résultats suggèrent que la voie des MAPK1,3 régule d'autres inhibiteurs de la voie d'apoptose mitochondriale. En conclusion, nous avons montré dans les fibroblastes CCL39 ΔRaf-1 :ER, que l'activation de la voie des MAPK par ΔRaf-1 est capable de bloquer l'apoptose mitochondriale en aval de la sortie du cytochrome c, en inhibant l'activation de la caspase 9 au sein même de l'apoptosome. Le blocage de la voie mitochondriale au niveau de l'apoptosome est un mécanisme associé à la résistance des tumeurs contre les traitements

chimiothérapeutiques. Le mécanisme que nous avons décrit pourrait être une caractéristique des tumeurs présentant une activation constitutive de la voie des MAPK1/3.

Article 1 : Observations complémentaires

L'activation de la voie des MAPK1/3 inhibe la mort induite par surexpression de Bax

Nous avons recherché une méthode alternative à l'enlèvement du sérum pour induire l'apoptose mitochondriale dans les cellules CCL39 et confirmer le rôle antiapoptotique de la voie des MAPK en aval de la sortie du cytochrome c. Pour cela nous avons surexprimé la protéine Bax dans les cellules CCL39 qui expriment Raf-1:ER. Bax est une protéine proapoptotique de la famille Bcl-2 qui participe à la formation du pore de perméabilité mitochondrial et favorise la sortie du cytochrome c. Les cellules CCL39 étant difficiles à transfecter, nous avons cotransfecté Bax avec de la GFP et nous avons suivi l'induction de la mort cellulaire dans les cellules positives pour la GFP. Nous avons choisi comme critère de mort cellulaire la condensation et la fragmentation des noyaux après marquage au dapi.

Nos résultats préliminaires, présentés dans la figure S1, montrent d'une part que la surexpression de Bax induit la mort cellulaire et d'autre part que l'activation de Raf-1:ER par le tamoxifène permet d'inhiber l'effet proapoptotique de Bax. Il nous reste maintenant à vérifier, s'il est possible de détecter la relocalisation cytosolique du cytochrome c dans les cellules surexprimant Bax, et si l'activation de la voie des MAPK interfère ou non avec cette relocalisation.

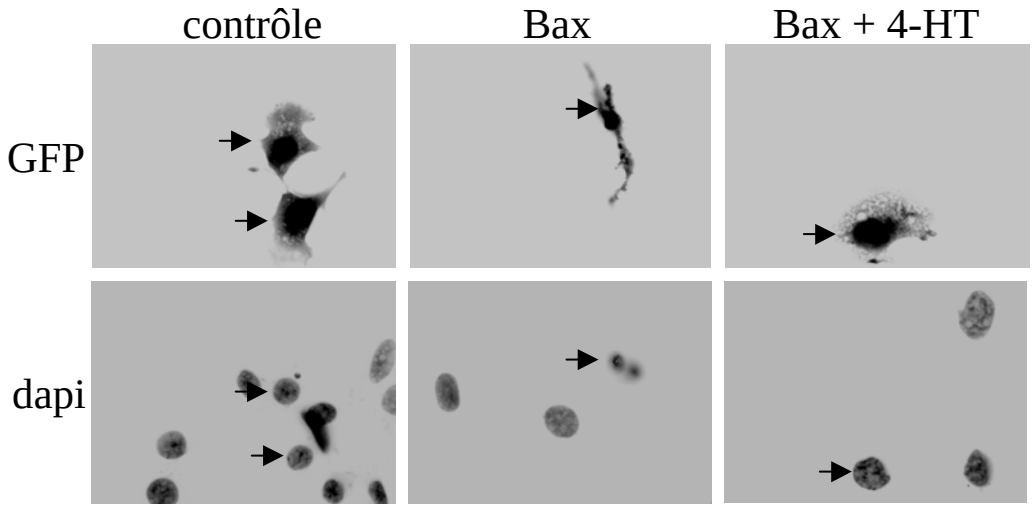

Figure S1. L'activation de la voie des MAPK1/3 inhibe la mort induite par surexpression de Bax

Les cellules CCL39 RER, ensemencées sur lamelles de verre, sont transfectées avec 0,5µg du vecteur d'expression de la GFP + 1µg du vecteur contrôle (CD8) ou 1µg du vecteur d'expression de Bax, par la méthode superfect (Quiagen). Les cellules transfectées avec Bax sont stimulées ou non avec du tamoxifène. Après 24h d'expression, les cellules sont fixées puis analysées en microscopie à fluorescence pour vérifier l'expression de la GFP et la morphologie des noyaux (marquage au dapi).

Le rôle antiapoptotique de ΔRaf-1 :ER dépend de l'activité kinase de Raf-1

Nous avons exprimé de façon stable dans les cellules CCL39 une protéine de fusion ΔRaf-1KD:ER dépourvue d'activité catalytique sur laquelle nous avons muté la lysine K375 du site de fixation de l'ATP(48). Dans ces cellules l'enlèvement de sérum pendant 14h induit la mort cellulaire en utilisant comme critère le marquage des cellules perméables à l'iodure de propidium. Ainsi nous avons pu montrer que l'activation de ΔRaf-1KD :ER ne protège pas les cellules de la mort (Figure S2). Cela signifie que l'activité kinase de Raf-1 est nécessaire à son effet antiapoptotique.

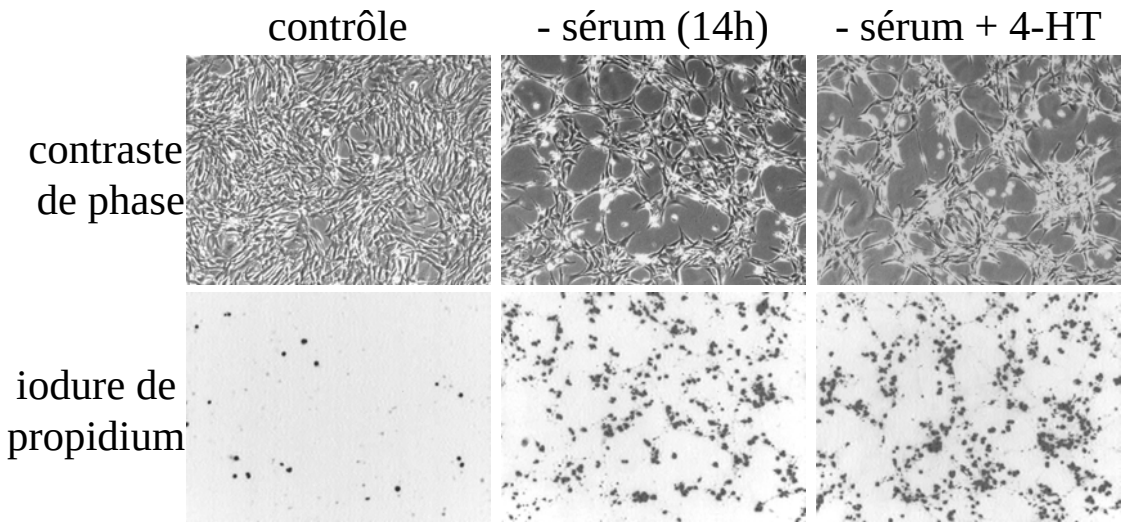

Figure S2. Le rôle antiapoptotique de ΔRaf-1:ER dépend de l'activité kinase de Raf-1
Des cellules CCL39 exprimant de façon stable l'isoforme ΔRaf-1:ER K325W, sont carencées en sérum en présence ou non de tamoxifène (4-HT). Après 14h, les cellules sont analysées en microscopie. Les cellules mortes sont marquées à l'iodure de propidium.

Etude du rôle des isoformes A-Raf et B-Raf dans l'inhibition de la caspase 9

Nous avons ensuite vérifié si l'effet protecteur était spécifique de l'isoforme Raf-1. Pour cela, nous avons utilisé des cellules CCL39 exprimant de façon stable les chimères A-Raf :ER ou B-Raf :ER (gentiment procurées le Dr Martin McMahon (38)). Ces cellules ont été privées de sérum pendant 14h en présence ou non de tamoxifène. La figure S3 montre que l'activation du domaine kinase de B-Raf active fortement la voie des MAPK et inhibe l'activation de caspase 9. A-Raf :ER n'active que très faiblement la voie des MAPK et n'inhibe que partiellement le clivage de la caspase 9. Ces résultats montrent que le rôle protecteur de Raf n'est pas limité à la seule isoforme Raf-1 et que ce rôle protecteur est lié à l'activation de la voie des MAPK.

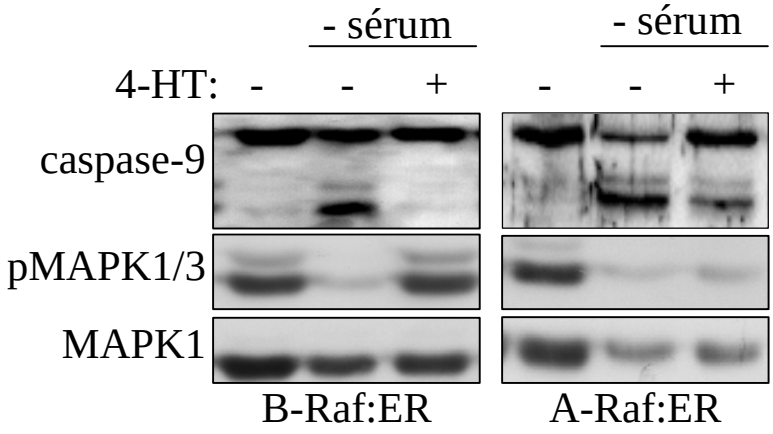

Figure S3. Inhibition du clivage de la caspase 9 par les isoformes A-ΔRaf :ER et B-Δ Raf :ER dans les cellules CCL39
Des cellules CCL39 exprimant de façon stable les isoformes A-ΔRaf :ER ou B-ΔRaf :ER sont carencées en sérum en présence ou non de tamoxifène (4-HT). Après 14h d'incubation, les cellules sont lysées dans du tampon Laemmli. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE. Le Western Blot est révélé avec les anticorps anti-caspase 9, anti phosphoMAPK1/3 et anti MAPK1.

L’apoptose induite par stimulation du récepteur au TNF provoque l’inactivation de la voie des MAPK1/3 et la dégradation de Raf-1 dans les cellules HeLa

Au début de notre étude sur l’inhibition de caspase 9 par la voie des MAPK, nous n’avions pas encore d’anticorps reconnaissant la caspase 9 de hamster. Nous avions alors débuté une série d’expériences sur les cellules HeLa d’origine humaine dans lesquelles nous pouvions détecter caspase 9. La stimulation par le TNFα de la voie des récepteurs de mort induit de l'apoptose matérialisée par le clivage de PARP. Nous avions remarqués que l’activité basale de la voie des MAPK diminuait proportionnellement à l’augmentation du clivage de PARP. En analysant les différentes kinases de la voie des MAPK, nous nous sommes rendu compte que la diminution de l’activité des MAPK1/3 correspondait à la perte de la kinase Raf-1 (FigS4). L’anticorps anti Raf-1 (Transduction Laboratories) reconnaît un épitope localisé dans la partie Nterm de Raf-1. Nous n’avons pas encore déterminé si cette perte de Raf-1 provient de son clivage par les caspases ou de sa dégradation par le protéasome.

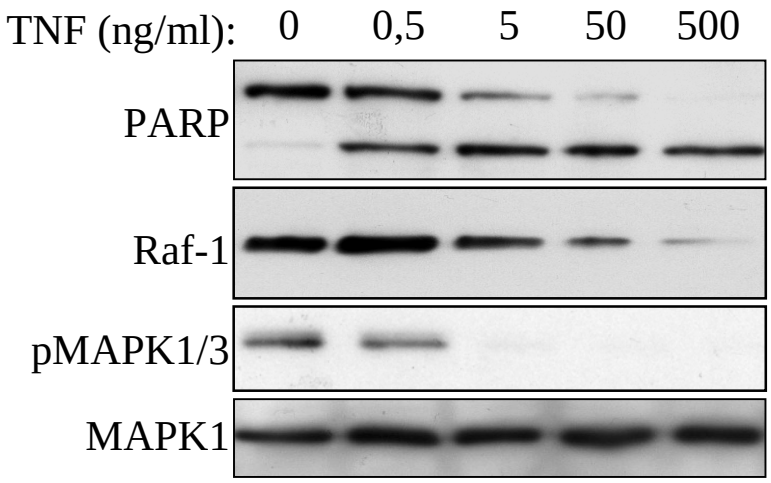

Figure S4. L’apoptose induite par stimulation du récepteur au TNF provoque l’inactivation de la voie des MAPK1/3 et la dégradation de Raf-1 dans les cellules HeLa
Des cellules HeLa sont traitées à la cycloheximide (5µg/ml) avec ou sans TNFα (doses croissantes). Après 14h d’incubation, les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE. Le Western Blot est révélé avec les anticorps anti-PARP, anti Raf-1, anti phosphoMAPK1/3 et anti MAPK1.

Conditions permettant d'étudier le rôle des MAPK dans l'activation de l'apoptosome *in vitro*

Le but des expériences d'activation *in vitro* de la capases 9 est de tester s'il est possible de bloquer l'activité de l'apoptosome avec des extraits cellulaires provenant de CCL39RER stimulées au tamoxifène. Pour activer l'apoptosome et induire le clivage de caspase 9, il faut incuber les extraits cytosoliques avec du cytochrome c et de l'ATP ou du dATP(530). Lors de la mise au point de notre modèle *in vitro*, nous avons remarqué que l'incorporation d'ATP activait de façon systématique la phosphorylation des MAPK1/3. Par contre l'ajout de dATP vient faire compétition avec l'activation des MAPK1/3 par l'ATP(figure S5A). Pour étudier l'influence de l'activité des MAPK sur le clivage de caspase 9 il faut donc systématiquement utiliser l'ATP plutôt que le dATP. L'utilisation de U0126 montre que l'activation *in vitro* des MAPK1/3 dépend de l'activité MEK (Figure S5B). Au cours de ces expériences, nous avons remarqué que l'incubation à 37° induit une déphosphorylation rapide des MAPK1/3 qui est fortement ralentie à 20°. Enfin, on ne peut pas utiliser le vanadate pour inhiber les phosphatases parce qu'il inhibe totalement l'activité de l'apoptosome.

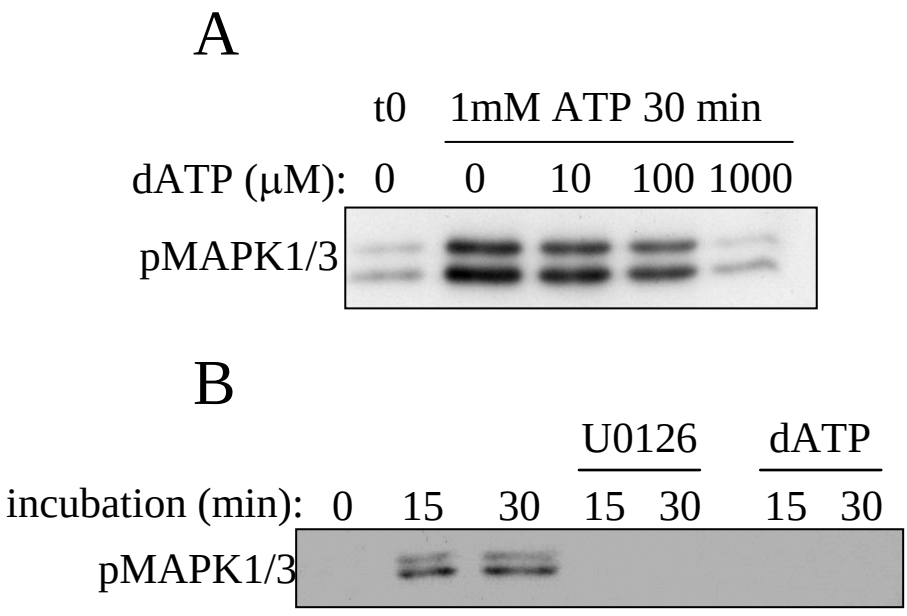

Figure S5. L'ajout d'ATP à des extraits cellulaires active les MAPK1/3
A, Des extrait cytosoliques de cellules HEK293 *(50 μg)* sont incubés à 20°C pendant 30min en présence de 1mM d'ATP et de quantité croissante de dATP. B, Les extraits cytosoliques sont incubés à 20°C en présence de 1mM d'ATP avec 1μM d'U0126 ou 1mM de dATP, pendant 15 ou 30 min. Les extraits sont ensuite dilués dans du tampon Laemmli et les protéines sont séparées par SDS-PAGE. Le Western Blot est révélé avec l'anticorps anti phosphoMAPK1/3.

Article 1: Discussion et Perspectives

La dégradation de Raf par TNF

Différentes études ont montré que la kinase Raf-1 est dégradée durant l'induction de la mort cellulaire par un mécanisme dépendant de l'activité caspase et du protéasome. Nous avons montré dans les cellules HeLa que l'induction de la mort cellulaire par stimulation du récepteur au TNFα entraîne la perte de la kinase Raf-1. Nous n'avons pas encore cherché à développer cette observation, qui présente un intérêt sur le rôle de la kinase Raf-1 dans le contrôle de la mort cellulaire. Dans les macrophages par exemple, la perte de Raf-1 favorise la mort cellulaire suite à l'infection par la bactérie Salmonelle (195). L'anticorps que nous avons utilisé est dirigé contre l'extrémité N-terminale de Raf-1. Or il a été montré que le clivage de raf-1 par la caspase 9 conduit justement à la perte du fragment Nterm de Raf-1 (85). Il reste à vérifier si l'activation des récepteurs de mort induit l'activation de caspase 9 dans les cellules HeLa. Pour déterminer si la perte de Raf-1 augmente l'effet proapoptotique du TNFα, nous allons vérifier si l'inhibition de la voie des MAPK1/3 par le U0126 favorise la mort par stimulation du récepteur au TNFα dans les cellules HeLa. Cependant le rôle protecteur de Raf-1 n'est peut-être pas lié à l'activation des MAPK1/3 (195). Il faudrait donc aussi tester la sensibilisation des cellules HeLa par transfection d'un siRNA anti Raf-1. Une autre méthode consisterait à exprimer, quand le ou les sites de clivage seront identifiés, une forme de Raf-1 mutée résistante à la dégradation.

Les régulateurs connus de l'activation de caspase 9

Dans notre modèle de protection de l'apoptose mitochondriale, nous avons montré que la voie des MAPK1/3 bloque l'activation de caspase 9 au sein de l'apoptosome, sans pour autant bloquer son recrutement. Le mécanisme d'inhibition de caspase 9 dépend à la fois de la régulation traductionnelle de protéine antiapoptotique pendant les premières heures et de l'activation continue de la voie des MAPK1/3. On peut imaginer qu'un inhibiteur de caspase 9 est induit et que son association à caspase 9 requiert une étape de phosphorylation. L'inhibiteur pourrait aussi être une protéine labile qui nécessiterait d'être phosphorylée pour se stabiliser.

Le seul inhibiteur connu de caspase 9 est XIAP. Nous avons cependant montré que l'activation de la voie des MAPK1/3 n'entraînait pas de modification du niveau d'expression de XIAP. Les autres IAP pourraient néanmoins jouer un rôle inhibiteur sur caspase 9 en

bloquant son clivage par caspase 3. cIAP1 et cIAP2 ont toutes deux été décrites comme pouvant être régulée de façon transcriptionnelle par la voie des MAPK1/3 (482). De plus, leur stabilité et leur activité est aussi régulée de façon post-traductionnelle. Un autre mécanisme de régulation de caspase 9 consisterait à inhiber l'activité des activateurs de caspase 9. Le principal activateur de caspase 9 est Apaf1 qui favorise la dimérisation de caspase 9. Dans les cellules stimulées au tamoxifène, nous avons montré que la caspase 9 est recrutée dans les fractions de haut poids moléculaire, ce qui suggère que l'activation des MAPK1/3 n'interfère pas avec l'association entre la procaspase 9 et Apaf1. La protéine Tvl-1 a été clonée par association à la partie C-terminale de Raf-1 en crible double hybride(250). Tvl-1 s'associe aussi avec la kinase Tpl-2. La phosphorylation de Tvl-1 par Tpl-2 et leur interaction avec Apaf1 favorise l'activation *in vitro* de caspase 3 par caspase 9 (327). On pourrait imaginer que l'association de Raf-1 avec Tvl-1 empêche la formation du complexe Tvl-1/Tpl2, défavorisant ainsi l'activité caspase 9. Cette association entre Raf-1 et Tvl-1 pourrait dépendre de l'induction d'un troisième partenaire.

Recherche d'inhibiteurs inconnus de caspase 9

En parallèle de la régulation des modulateurs connus de caspase 9, nous allons suivre une approche de purification de protéines en combinant la purification par chromatographie avec le système d'activation *in vitro* de caspase 9. Comme nous l'avons montré, l'activation de la voie des MAPK1/3 permet d'inhiber le clivage de caspase 9 induit par ajout de cytochrome c et d'ATP à des extraits cellulaires. Notre projet serait de pouvoir complémenter des extraits de cellules contrôles avec des fractions protéiques provenant de cellules stimulées au tamoxifène pendant le temps nécessaire à l'induction ou à l'accumulation de protéine antiapoptotique. L'activité MAPK étant nécessaire de façon continue durant la protection, les extraits de cellules contrôles proviendraient en fait de cellules stimulées au tamoxifène pendant un temps court permettant uniquement une activation optimale des MAPK1/3 (environ 30min de stimulation au tamoxifène).

Le rôle de l'inactivation de l'apoptosome dans les tumeurs

Nous nous intéressons au lien potentiel entre l'inhibition de l'apoptosome par les MAPK1/3 et la réponse des tumeurs aux traitements thérapeutiques. Il est déjà établi que les cellules tumorales qui n'activent pas l'apoptosome sont résistantes à la chimiothérapie(254). Dans un tiers des tumeurs, l'activation constitutive des MAPK1/3 est associée à l'invasion tumorale et à la survie cellulaire. Nous pourrons déterminer s'il existe un lien entre le niveau de phospho-MAPK et la présence de la forme clivée de caspase 9 sur les coupes histologiques avec les anticorps appropriés. Pour une mesure plus sensible de l'influence de l'activité antiapoptotique des MAPK1/3, nous pourrons déterminer l'activabilité *in vitro* de l'apoptosome dans les extraits de biopsies. Nous avons déjà mis en évidence que ces cytosols permettent le clivage d'une caspase 9 synthétique radiomarquée. Si nous pouvons identifier un inhibiteur de l'activation de caspase 9, nous rechercherons sa présence dans les tumeurs qui n'activent pas l'apoptosome.

Article 2 : L’activation prolongée de la voie des MAPK1/3 entraîne l'activation de la caspase 8 et la mort des cellules HEK293 par un mécanisme indépendant de FADD

Soumis à publication dans le journal Apoptosis

Contexte du travail

L’étude du rôle proapoptotique de la voie des MAPK1/3 dans les cellules humaines HEK293 provient d’une observation fortuite faite au laboratoire. Pour palier aux problèmes liés à l'utilisation des anticorps commerciaux à spécificité humaine dans notre modèle initial de fibroblastes de hamster, nous avons établi une lignée humaine exprimant de façon stable la protéine de fusion ΔRaf-1:ER (RER). Les cellules HEK293 ont été choisies pour leur grande efficacité de transfection. Ce sont des cellules non tumorales isolées de rein embryonnaire humain et immortalisées par l’adénovirus 5. Alors que nous pensions utiliser les cellules 293RER pour comprendre les mécanismes antiapoptotiques de la voie Raf-1/MAPK, nous avons découvert que au contraire, dans cette lignée cellulaire l’activation prolongée de la voie des MAPK1/3 entraîne une mort cellulaire massive.

Résumé du travail

Le niveau d'activation des MAPK1/3 dans les cellules HEK293 est très faible mais il peut être augmenté de façon transitoire par les mitogènes comme dans la plupart des cellules normales. Dans les cellules 293RER, l'activation continue des MAPK1/3 par le tamoxifène entraîne la mort de plus de 60% des cellules en trois jours. La mort des 293RER présente les caractéristiques habituelles de l'apoptose avec un marquage transitoire à l'annexineV, la dégradation de l’ADN et le clivage de PARP, un substrat de la caspase 3. Cependant le processus est relativement lent, puisque les premiers signes apparaissent après 36 heures

d'activation des MAPK1/3 et les cellules présentent une morphologie inhabituelle avec une condensation du noyau et du cytoplasme repoussés en périphérie d'une vacuole de taille importante.

Cette forme d'apoptose ne requiert la synthèse des protéines et des ARN que de façon précoce (avant les 14 premières heures), mais nécessite l'activation continue de MEK. Dans les cellules HEK293, la voie des MAPK1/3 est donc impliquée à la fois dans la régulation transcriptionnelle et post traductionnelle de protéines proapoptotiques. La mort des 293RER est dépendante de l'activité des caspases, mais indépendante de la voie mitochondriale puisque la transfection de la protéine de survie Bcl-Xl ne protège pas les cellules. En revanche on observe un clivage tardif de la caspase 8 qui correspond avec la mort cellulaire. La caspase 8 étant généralement activée par les récepteurs de mort, nous avons recherché si la mort induite par la voie MAPK dépendait de l'un d'eux. Nous avons montré que l'activation des MAPK potentialise l'effet proapoptotique du récepteur de mort Fas et induit la protéine FADD, qui est l'adaptateur de la caspase 8 à Fas. Cependant, la surexpression des formes dominantes négatives de FADD, du récepteur Fas, ainsi que l'extinction de FADD par la technique de siRNA, n'empêchent pas la mort des cellules. Cela suggère que l'apoptose médiée par la voie MAPK est indépendante des récepteurs de mort. En revanche, l'inhibition de la caspase 8 par l'inhibiteur chimique IETD-FMK ou par la transfection de CrmA démontre que cette caspase joue un rôle prépondérant dans l'apoptose.

En conclusion, ces résultats montrent que l'activation prolongée des MAPK1/3 dans les cellules HEK293 induit un mécanisme qui favorise l'activation de la caspase 8 indépendamment de FADD et des récepteurs de mort.

La production de radicaux libres en particulier lors de l'ischémie cérébrale, provoque une activation prolongée des MAPK1/3 qui entraîne la mort des neurones. Les cellules HEK293 sont en fait d'origine neuronale, et notre variant 293RER pourra servir de modèle cellulaire pour l'étude des mécanismes moléculaires impliquant la voie des MAPK dans la neurodégénération.

Article 2: Observations complémentaires

La mort induite par la voie des MAPK1/3 dans les cellules 293RER est inhibée dans les cellules en suspension

Dans certains modèles cellulaires, la perte d'ancrage cellulaire suite à l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 a été décrite comme induisant la mort cellulaire (124, 222, 436). Dans les cellules 293RER, l'activation de la voie des MAPK1/3 induit après 24h une perte d'adhésion et l'arrondissement des cellules (Article 2 Fig2a). Les cellules se détachent lorsque débutent les premiers signes de mort cellulaire. Dans le but de vérifier si l'apoptose est causée par le détachement des cellules, nous avons cultivé les cellules en suspension (spinner). La figure S5 montre que l'enlèvement d'ancrage dans les cellules 293 n'induit pas de clivage de PARP, même après 48h. Le détachement des cellules induit par l'activation prolongée de la voie des MAPK, n'est donc pas la cause de l'apoptose. De façon surprenante dans ces conditions, le clivage de PARP induit par l'activation de ΔRaf-1ER est bloqué, alors que les kinases MAPK1/3 sont bien activées. L'induction de l'apoptose par la voie des MAPK requiert l'adhérence des cellules.

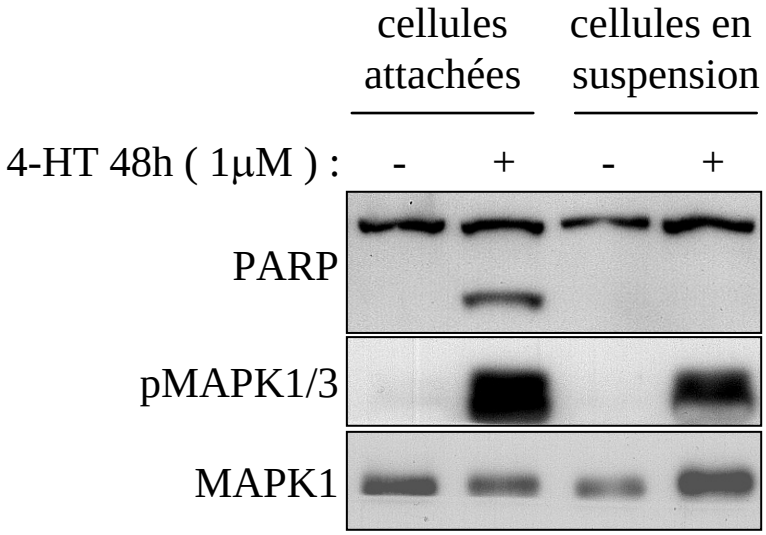

Figure S5. La mort induite par la voie des MAPK1/3 dépend de l'ancrage cellulaire
Les cellules 293ER sont trypsinées puis incubées à une densité de 10^5 cellules/100 ml, dans des bouteilles Spinner Flask (Bellco) qui permettent leur agitation. Le milieu contient 10 mg/ml de BSA afin d'éviter l'agrégation des cellules. Les cellules sont traitées ou non avec du tamoxifène. Après 48h de culture, les cellules sont lysées dans du tampon Laemmli. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur un gel à 9%. Le Western Blot est révélé avec les anticorps anti-PARP, anti-phospho MAPK1,3 et anti MAPK1

L'activation de la voie des MAPK1/3 augmente l'apoptose induite par les récepteurs Fas et DR4/DR5

Nous avons montré que l'apoptose induite par la voie des MAPK1/3 requiert l'activité de la caspase 8, ce qui pourrait impliquer une activation des récepteurs de mort. Nous avons analysé l'influence de l'activation de la voie des MAPK sur la réponse des cellules 293RER aux ligands des récepteurs de mort Fas (anticorps CH11), DR4/DR5 (ligand TRAIL) et du récepteur TNFR1 (ligand TNFα). La figure S6 montre qu'en absence de tamoxifène, les cellules 293RER sont peu sensibles à CH11, TRAIL ou TNFα. En revanche l'activation de la voie des MAPK pendant 26h combinée avec la stimulation des récepteurs Fas (par CH11) ou DR4/DR5 (par TRAIL) durant les 12 dernières heures, potentialise fortement le clivage de PARP. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie des MAPK favorise l'apoptose induite par les récepteurs Fas et DR4/DR5.

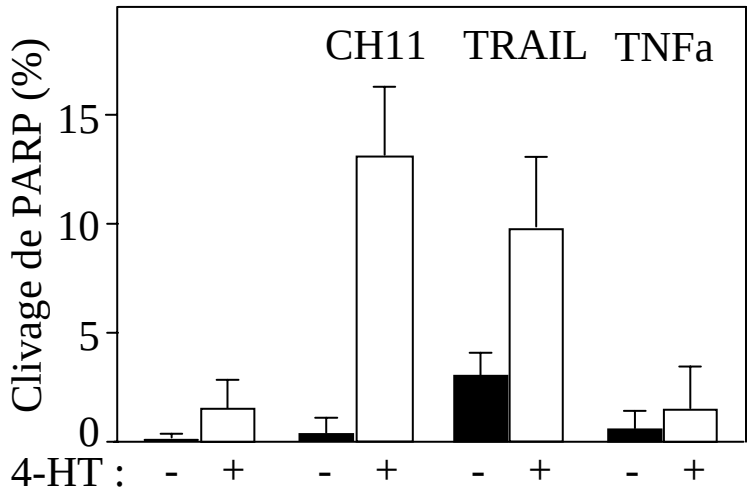

Figure S6. L'activation de la voie des MAPK1/3 augmente l'apoptose induite par les récepteurs Fas et DR4/DR5
Les cellules 293ER sont stimulées ou non avec du tamoxifène. Après 14h de stimulation les cellules sont traitées pendant 12h avec les ligands TRAIL (15 ng/ml), TNFα (100ng/ml) ou avec de l'anticorps CH11 (30 ng/ml). Les cellules sont lysées dans du tampon Laemmli et les protéines sont séparées par SDS-PAGE. Le Western Blot est révélé avec un anticorps anti-PARP. Le clivage de PARP est quantifié avec une caméra numérique. Les résultats représentent les moyennes provenant de 3 expériences indépendantes.

La voie des MAPK1,3 régule l'expression de FADD par un mécanisme post-transcriptionnel

Nous avons montré que l'activation de la voie des MAPK1/3 dans les cellules 293RER induit l'expression de la protéine FADD après 10h de stimulation au 4-HT (article 2, fig8B). FADD est l'adaptateur de la caspase 8 aux récepteurs de mort, il est commun à Fas et à DR4/DR5, son induction pourrait expliquer l'effet potentialisateur de la voie des MAPK1/3 sur l'activation des récepteurs de mort. Nous avons recherché quels pouvaient être les mécanismes d'induction de FADD. Dans un premier temps, nous avons analysé par RT-PCR l'effet de la voie MAPK sur la régulation de l'ARNm de FADD. L'induction de l'ARNm de FADD a été comparée à l'induction d'un ARN contrôle, 36B4 dans des conditions linéaires d'amplification. La figure S7A montre que l'activation de la voie des MAPK ne modifie pas les niveaux d'ARNm de FADD, ce qui indique que l'induction de FADD est un mécanisme post-transcriptionnel.

L'utilisation des inhibiteurs de synthèse protéique émétine et cycloheximide, et de l'inhibiteur de MEK U0126 montre que l'induction de FADD dépend de la synthèse protéique et de l'activité MEK (Fig S7B) Cette induction peut s'expliquer soit par une augmentation de la traduction de FADD, soit par une stabilisation de la protéine FADD.

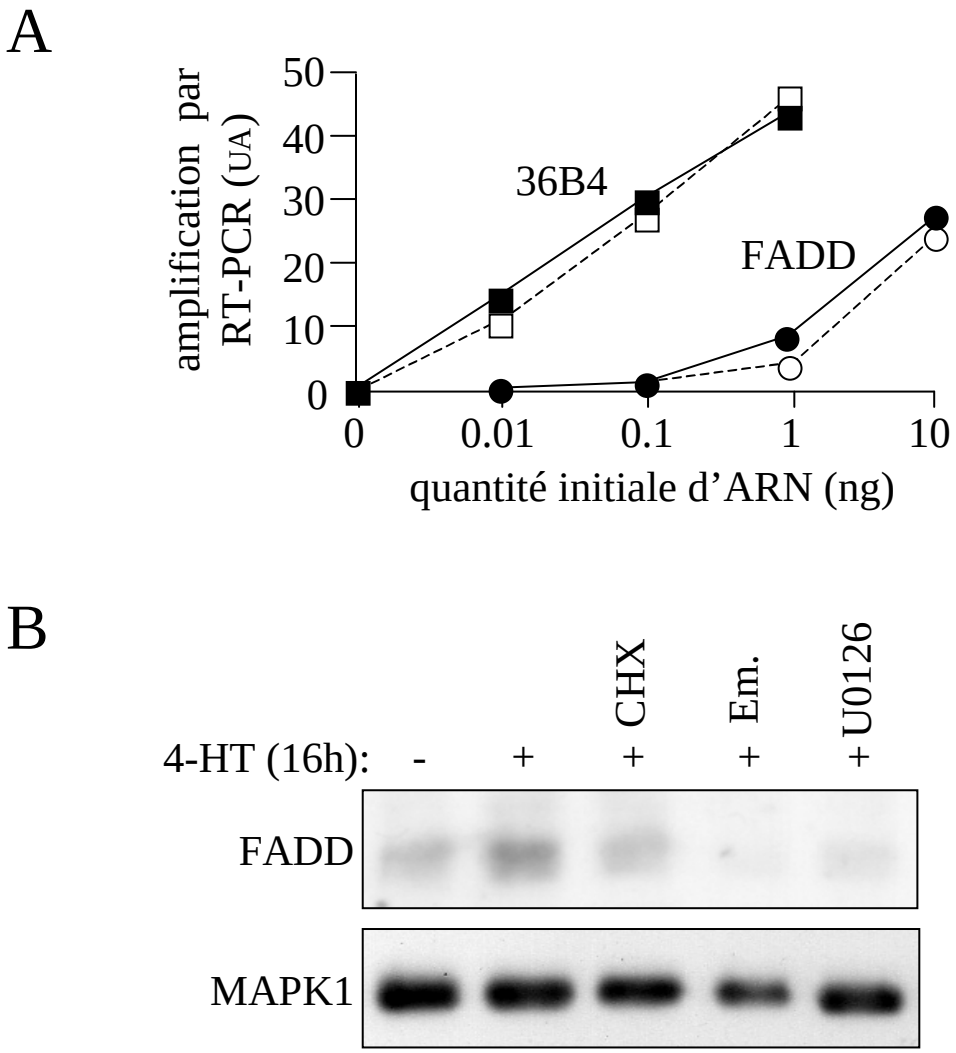

Figure S7. La voie des MAPK1/3 régule l'expression de FADD par un mécanisme post transcriptionnel.

A, les ARN totaux sont préparés à partir de cellules 293ER traitées (symboles pleins) ou non (symboles ouverts) au tamoxifène pendant 24h. Des quantités variables d'ARN sont soumises à une amplification par RT-PCR avec des séquences complémentaires des ADNc de FADD et de 36B4. Les produits d'amplifications sont marqués au Sybr gold, séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Le signal final est quantifié avec une caméra numérique. B, les cellules 293ER sont traitées avec du tamoxifène en présence des inhibiteurs de synthèse protéique cycloheximide (CHX 1µg/mL), émétine (Em 20µM) et de l'inhibiteur de MEK U0126 (10µM). Les cellules sont collectées par centrifugation puis lysées dans du tampon Laemmli. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE. Le Western Blot est révélé avec des anticorps anti-FADD et anti-MAPK1.

Détails des modifications morphologiques induites dans les cellules 293RER par l'activation prolongée de la voie des MAPK1,3

La mort induite par la voie des MAPK1,3 est caractérisée par des critères propres à l'apoptose, comme l'activation des caspases, la fragmentation de l'ADN ou encore la relocalisation des phosphatidyl sérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Cependant, les membranes ne présentent pas les protrusions caractéristiques décrites chez les cellules apoptotiques (blebbing). Les cellules présentent parfois une morphologie particulière avec un cytoplasme multi-vacuolé (Fig S8 a et b) ou prennent l'aspect d'une bulle avec le matériel cytoplasmique et nucléaire condensé et repoussé en périphérie (Fig S8 c,d et e).

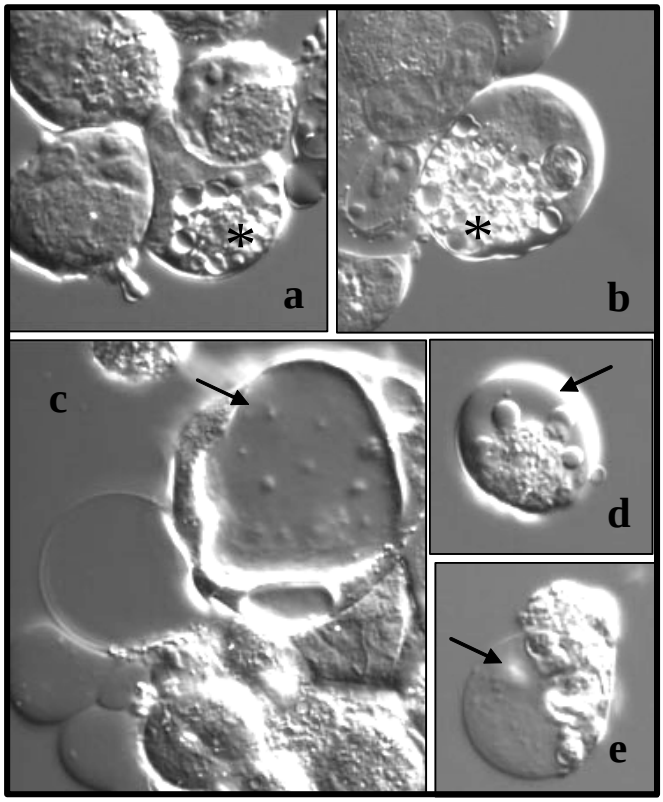

Figure S8. Détails des modifications morphologiques induites dans les cellules 293RER par l'activation prolongée de la voie des MAPK1,3
Les cellules 293ER ont été stimulées au tamoxifène pendant 48h. Les cellules flottantes ont été récupérées et analysées par microscopie en Nomarsky.

Article 2: Discussion et Perspectives

La caspase 8 peut être activée indépendamment de FADD

Dans notre modèle d'apoptose induite par l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 dans les cellules HEK 293, la caspase 8 est clivée par un mécanisme indépendant de FADD. D'autres études ont décrit une activation de caspase 8 indépendante de FADD(22, 29, 386) par un mécanisme non encore élucidé. D'une part, caspase 8 peut être clivée par d'autres protéases, comme la protéase du HIV1 (310), les caspases 6 et 3 (301, 412) ou par la protéase granzyme B (301). La dimérisation des caspases apicales est une étape essentielle à leur activation (34). La dimérisation de la procaspase 8 est suffisante pour induire son clivage autoprotéolytique(70). Elle requiert l'interaction avec un adaptateur à DED. Il existe d'autres adaptateurs que FADD comme l'intégrine β3 ou la protéine BAP31(43), qui recrutent et activent la caspase 8. L'apoptose induite par les MAPK1/3 requiert la synthèse des protéines ; nous pouvons émettre l'hypothèse d'une induction ou d'une accumulation de protéines favorisant la dimérisation et l'activation de caspase 8. Deux modèles d'activation de caspase 8 pourraient se rapprocher de nos observations. Le premier modèle concerne l'activation de caspase 8 par les protéines Hip1 et Hippi dans les neurones (146). Ce modèle présente un intérêt à cause de l'origine neuronale des cellules HEK293(396). Hip1 et Hippi sont des protéines présentant un DED (Death Effector Domain), domaine d'interaction avec caspase 8 similaire à celui présent sur FADD. Au cours de la maladie de Huntington, Hip1 est libérée de son interaction avec l'huntingtine et peut en présence de Hippi s'associer avec la caspase 8 et induire son agrégation au sein de l'appareil de Golgi et son activation. Le recrutement de la caspase 8 dans les ultrastructures est en accord avec notre observation que l'activation prolongée des MAPK1/3 provoque la relocalisation de la caspase 8 dans des fractions particulaires (observations non publiées). Le deuxième modèle concerne l'activation de la caspase 8 par le polypeptide NDG1 (353). Ce modèle présente plusieurs points de similarités avec nos observations. D'une part, l'activation de caspase 8 par NDG1 est indépendante de la voie mitochondriale et des récepteurs de mort. D'autre part, l'expression de NDG1 est fortement stimulée par le facteur de transcription Nur77, qui est lui-même induit (423, 458) et activé (223, 409) par la voie des MAPK1/3. De plus, Nur77 a déjà été impliqué dans un mécanisme de mort cellulaire dépendant de l'activation des MAPK1/3 par le récepteur à la neurokinine (65). L'approche la plus simple pour vérifier la validité de ces hypothèses sera d'utiliser des siRNA dirigés contre Hip1, Hippi ou NDG1. Puisque l'activation des caspases dans les 293RER est sensible à l'actinomycine D (article 2, figure5), on pourra aussi rechercher parmi les gènes induits dans ce système ceux qui codent pour des DED.

La régulation de FADD par la voie des MAPK1/3

Nous avons montré que l'expression de la protéine FADD est augmentée en réponse à l'activation de la voie des MAPK1/3 par un mécanisme post-transcriptionnel dépendant de l'activité de MEK et de la synthèse protéique. L'utilisation de siRNA anti-FADD démontre que FADD n'est pas impliquée dans l'activation de la caspase 8 par la voie des MAPK. Cependant, l'étude de la régulation de FADD par les MAPK est intéressante pour au moins deux raisons : premièrement, l'induction de FADD pourrait expliquer la potentialisation par les MAPK de l'apoptose induite par les récepteurs DR4/DR5 et Fas ; deuxièmement le mécanisme de régulation de FADD par les MAPK1/3 pourrait s'appliquer à d'autres protéines à domaine DED.

L'induction de FADD potentialise-t-elle l'apoptose induite par les récepteurs de mort ?

Le fait que la voie des MAPK1/3 augmente l'apoptose induite par stimulation des voies Fas et TRAIL implique la régulation d'un mécanisme commun aux deux récepteurs. Or, la protéine FADD est l'adaptateur de caspase 8 commun à ces deux récepteurs. De plus, la cinétique d'induction de la protéine FADD (moins de 14h, figure 8B) correspond avec la durée nécessaire pour que la voie des MAPK1/3 augmente l'effet apoptotique de Fas et DR4/5 (moins de 26h, figure S6). Nous disposons de deux méthodes pour vérifier cette hypothèse. En effet, puisque la transfection du siRNA dirigée contre FADD ou l'inhibition de la synthèse protéique bloquent l'induction de FADD, ces deux approches devraient pouvoir inhiber l'effet potentialisateur de la voie des MAPK1/3 sur les récepteurs Fas et DR4/DR5. Dans les cellules de Sertoli, l'apoptose induite par Fas nécessite l'activation des MAPK (456). Nous avons observé que la stimulation de Fas par ses ligands active les MAPK1/3; s'il s'avère que l'activité des MAPK induit l'expression de FADD, elle pourrait ainsi participer à l'activité proapoptotique des récepteurs de mort dans les cellules HEK293.

L’induction de FADD dépend-elle de sa phosphorylation ?

L’augmentation post-transcriptionnelle de FADD pourrait s’expliquer soit par l’augmentation de sa traduction, soit par sa stabilisation post-traductionnelle. Les MAPK1/3 ont été impliquées dans la stabilisation post-traductionnelle des protéines Fra1 (464) et Bcl-2 (45, 111), leur phosphorylation inhibe leur dégradation par le protéasome. Nous pouvons envisager que la phosphorylation de FADD par les MAPK permet sa stabilisation. La phosphorylation de FADD par la voie des MAPK a déjà été décrite dans les cellules Jurkat. Cette phosphorylation est associée avec la relocalisation de FADD dans des compartiments subcellulaires solubles au Triton, mais ne modifie cependant pas l’expression de FADD (285). La phosphorylation du résidu sérine 194 de FADD pourrait être responsable de ce changement de localisation. La phosphorylation de ce résidu est en effet impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique de FADD (390). Dans notre modèle cellulaire, le changement de localisation de FADD pourrait l’empêcher d’interagir avec une protéine nécessaire à sa dégradation. Dans un premier temps, nous allons étudier la localisation subcellulaire de FADD lors de l’activation de la voie des MAPK1/3. Nous avons déjà remarqué que la portion de FADD insoluble aux détergents est beaucoup plus stable que la forme soluble. Si FADD est stabilisée, nous pourrons ensuite vérifier si son mécanisme de stabilisation dépend d'une phosphorylation dépendante des MAPK.

La régulation de FADD implique-t-elle son association aux MAPK1/3 ?

La phosphorylation des substrats des MAPK requiert la présence d'un site de fixation spécifique, un argument qui nous amène à rechercher s’il y a un lien entre la fixation des MAPK à FADD et la stabilisation de FADD. La stucture tridimensionnelle du DED de FADD est quasiment identique à celle de la partie amino-terminale de PEA15 (171). PEA15 est une protéine à domaine DED décrite comme se liant aux MAPK1/3 et favorisant leur rétention cytosolique (137). Le résidu acide aspartique 74 du domaine DED de PEA15, est crucial pour la liaison entre PEA15 et MAPK1 ; or ce résidu est conservé chez FADD. La structure de FADD lui permettrait théoriquement de s’associer aux MAPK1/3. Nous pourrons étudier cette possibilité d’association entre FADD et les MAPK1/3 par co-immunoprécipitation des formes surexprimées de FADD, mutées ou non sur le résidu D74, et déterminer l'impact de l'association aux MAPK sur la stabilité de FADD. Récemment, il a été montré que la protéine vanishin, une protéine à domaine DED, peut se lier aux MAPK1/3. Cette protéine possède

d’ailleurs un acide aspartique équivalent au D74 de FADD en position 101 (428). Enfin, il faut préciser que Hippi présente également une structure primaire similaire dans son DED avec un aspartate conservé en position 495 (146).
L’étude de l’association entre FADD et les MAPK pourrait mettre en évidence un mécanisme commun de liaison des MAPK aux protéines à domaine DED, mécanisme qui pourrait réguler la localisation et l'activité de l'un ou l'autre des partenaires. L’une de ces protéines pourrait d’ailleurs être directement impliquée dans l’activation de la caspase 8 par la voie des MAPK.

Morphologie des cellules 293 mourantes

Bien que l’activation prolongée de la voie des MAPK provoque des modifications biochimiques caractéristiques de l’apoptose chez les cellules 293RER, nous avons observé que ces cellules présentent une morphologie particulière, avec la présence de vacuoles cytoplasmiques ou d'un gonflement important de la membrane plasmique à l'allure d'une "bulle" (Figure 2A du deuxième article et figure S8). L’activation de la voie des MAPK1/3 a déjà été associée à la formation d’une bulle lors de la mort induite par surexpression de ΔRaf-1 (124) ou après stimulation du récepteur à la neurokinine (65). Cette vacuolisation du cytoplasme peut faire penser à de la mort par autophagie ou par paraptose. Or la voie des MAPK a été impliquée dans la phosphorylation d’une protéine de contrôle de l’autophagie, GAIP (313, 328), ainsi que dans l'induction de la paraptose (415) . Cependant, ces types de mort cellulaire ne provoquent pas de dégradation de l’ADN ni de clivage des caspases (pour revue (152). La formation d’une bulle est aussi associée au modèle de mort cellulaire chez *Dictyostelium* (220) et à la mort par nécrose induite par le récepteur Fas lorsque les caspases sont inhibées par ZVAD (463). Ainsi le modèle de mort cellulaire induite par la voie des MAPK dans les cellules 293RER pourrait être un type particulier de mort cellulaire non apoptotique spécifique à l’activation prolongée des MAPK. Il serait intéressant de réaliser une analyse par time-laps des cellules 293RER après stimulation au tamoxifène pour analyser si les cellules 293ER passent par un stade de vacuolisation avant de former une bulle.

La mise en suspension des 293ER bloque la mort induite par la voie des MAPK1/3

Nos résultats sur la culture des cellules 293RER en suspension ont montré d’une part que la perte d’ancrage n’induit pas de mort cellulaire chez les cellules 293RER, et d’autre part que la mort cellulaire induite par activation de la voie des MAPK1/3 dépend de l’adhérence

cellulaire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. L'induction de la mort cellulaire pourrait dépendre du contact entre les cellules. En réalisant des stimulations au tamoxifène sur des cellules ensemencées à faible densité (résultat non publié), ou en réalisant des expériences de co-culture entre cellules 293WT et cellules 293RER (article2 fig7), nous avons montré que la mort cellulaire ne nécessite pas de contacts cellule-cellule. La perte d'ancrage cellulaire pourrait modifier la localisation subcellulaire des MAPK1/3. En effet, il a été montré que la perte d'ancrage empêche la localisation nucléaire des MAPK1/3(91) ainsi que la phosphorylation de leur substrat nucléaire Elk (13). Or plusieurs modèles de mort cellulaire impliquent l'activation nucléaire prolongée des MAPK1/3, (69, 362, 532), en particulier dans les cellules neuronales (6, 138, 311, 419, 426). Pour vérifier si la mort des cellules 293RER requiert la localisation nucléaire prolongée des MAPK1/3, nous allons analyser par microscopie confocale la localisation subcellulaire des formes phosphorylées des MAPK1/3 sur des cellules attachées ou en suspension. Nous allons aussi vérifier si la séquestration cytosolique des formes actives des MAPK1/3, par surexpression des protéines MKP3CS ou PEA15, est capable de bloquer la mort cellulaire comme c'est le cas dans les cellules neuronales (243). Puisqu'il a été démontré que l'accumulation nucléaire des MAPK1/3 activées requiert la synthèse d'une protéine à courte durée de vie (419), il faudrait vérifier si l'effet antiapoptotique de la cycloheximide est lié à une l'inhibition de la localisation nucléaire. Il serait intéressant de vérifier en parallèle si l'activation nucléaire prolongée des MAPK est liée à une relocalisation de la caspase 8. Il faut noter que la localisation nucléaire de caspase 8 a déjà été décrite lors de la mort cellulaire induite par les séquences protéiques polyglutaminées dans les neurones (380).

Si notre modèle de mort cellulaire dépend d'une activation nucléaire prolongée des MAPK1/3, il faudra rechercher alors pourquoi les phosphatases nucléaires dirigées contre les MAPK (MKPs) sont inactivées. Les deux principaux mécanismes d'inhibition de ces phosphatases sont leur dégradation par le protéasome ou l'inhibition de leur site catalytique par les réactifs oxygénés (ROS) (202, 243). Si les MAPK sont accumulées sous forme active dans le noyau, cela signifierait que l'activation de RafER dans les cellules 293 induit soit une production de ROS, soit la dégradation des MKPs.

Rôle des isoformes MAPK1 et MAPK3 dans la mort cellulaire

L'étude de la contribution des isoformes des MAPK dans l'induction de la mort cellulaire comprend encore trop peu d'exemples pour en tirer une conclusion définitive. Cependant, il

semblerait que l'isoforme MAPK1 joue un rôle prépondérant dans les cellules où l'activation de la voie des MAPK induit la mort cellulaire. Ainsi, la surexpression de MAPK1 (ERK2, p42 MapK) ou MAPK3 (ERK1, p44 MapK) montre que c'est spécifiquement l'isoforme MAPK1 qui est impliquée dans la mort par irradiation aux rayons γ (78). De même la transfection de siRNA anti *mapk*1 ou anti *mapk3* montre que seule MAPK1 est nécessaire à la mort induite par stimulation du récepteur à la neurokinine (65). Dans notre institut de recherche, l'équipe du Dr Philippe Lenormand travaille sur la spécificité des fonctions des isoformes MAPK1 et MAPK3. Il serait très intéressant de collaborer pour vérifier si l'induction de la mort dans les cellules 293RER est spécifique d'une isoforme de MAPK1.

Les cellules HEK 293ER, un modèle pour l'étude du rôle des MAPK dans la neurodégénération ?

Le rôle proapoptotique de Raf-1:ER est peu documenté. A ma connaissance, seule une étude montre l'induction de la mort cellulaire suite à l'activation prolongée des RafER dans des ostéoblastes (436). Dans ce modèle, l'induction de la mort est une conséquence de la perte d'adhérence. Une de nos hypothèses pour expliquer la sensibilité des cellules 293 serait l'origine neuronale de ces cellules. En effet les cellules HEK 293 ont pour particularité d'exprimer de nombreux gènes spécifiques des cellules neuronales (396)et représentent probablement une forme immortalisée de neurones immatures présents dans la préparation de rein embryonnaire à l'origine de la lignée. De nombreuses études ont montré que l'activation prolongée de la voie des MAPK, par les drogues chimiothérapeutiques ou par les ROS, est liée à la mort des cellules d'origine neuronale. On peut imaginer que l'activation prolongée de la voie des MAPK1/3 entraîne l'induction de facteurs proapoptotiques spécifiquement dans les cellules neuronales. Il faudrait vérifier si l'activation de RafER dans d'autres lignées d'origine neuronale entraîne aussi la mort cellulaire. Les cellules 293 ne sont pas des neurones mais leur facilité de manipulation et leur très grande efficacité de transfection en font un modèle de choix pour l'étude *in vitro* des mécanismes associant l'activation de la voie des MAPK1/3 aux maladies neurodégénératives. On pourra en particulier les utiliser pour rechercher des composés chimiques capables de bloquer la mort induite par les MAPK1/3 ou d'empêcher l'activation de la caspase 8 par les protéines à DED. La recherche d'inhibiteurs pharmacologiques affectant la mort induite par les MAPK1/3 comme le fait le U0126 (305) pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes sur le traitement de la neurodégénérescence post ischémique.

Discussion finale et conclusions

L'effet antiapoptototique des MAPK1/3 passe par l'inhibition de la caspase 9, alors que leur action proapoptotique requiert l'activation de la caspase 8. Les conséquences de la stimulation des MAPK1/3 dans un système cellulaire donné pourrait refléter le degré d'implication des deux caspases apicales dans la mort cellulaire. Dans de nombreux modèles cellulaires, l'exécution de l'apoptose requiert l'amplification de l'activation des caspases par la voie mitochondriale. Dans ces cellules, l'activation prolongée des MAPK1/3 favoriserait alors la survie cellulaire. A l'inverse, les modèles dans lesquels la mort est indépendante de l'amplification mitochondriale seraient plutôt sensibles à l'activation de la caspase 8 par la voie des MAPK.

Il y a d'autres niveaux de complexité : la voie des MAPK est activée par des récepteurs qui stimulent aussi des voies de survie comme les voies AKT ou NFkB, qui peuvent freiner l'action proapoptotique des MAPK ou amplifier ses effets antiapoptotiques. Les agents oxydants ou les drogues chimiothérapeutiques qui activent la mort dépendante des MAPK activent aussi d'autres voies de signalisation, comme les voies des kinases de stress, qui inhibent l'effet protecteur des MAPK. L'orientation de la réponse finale, qui dans tous les cas implique la synthèse de protéines, dépend également du répertoire exprimé par un type cellulaire particulier.

Enfin, il n'est pas surprenant que l'activation des MAPK1/3, qui est concomitante à l'engagement de la prolifération cellulaire puisse causer la mort des cellules. L'augmentation de la prolifération rend les cellules plus sensibles aux processus apoptotiques, d'abord à cause de la nécessité de maintenir un haut niveau de métabolisme, mais aussi à cause de l'expression de certains protooncogènes comme myc aux propriétés proapoptotiques. En fait, l'apoptose peut être perçue comme un mécanisme de rétrocontrôle à l'échelle cellulaire, qui assure que la prolifération se déroule dans des conditions appropriées. Trop ou trop peu d'activité MAPK peut, selon le contexte, conduire à la mort cellulaire.

Annexes

Références Bibliographiques

1. **Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey.** 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Mol Cell **9:**423-32.
2. **Adachi, M., M. Fukuda, and E. Nishida.** 2000. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. J Cell Biol **148:**849-56.
3. **Adjei, A. A.** 2001. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. J Natl Cancer Inst **93:**1062-74.
4. **Alavi, A., J. D. Hood, R. Frausto, D. G. Stupack, and D. A. Cheresh.** 2003. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. Science **301:**94-6.
5. **Alessandrini, A., B. K. Brott, and R. L. Erikson.** 1997. Differential expression of MEK1 and MEK2 during mouse development. Cell Growth Differ **8:**505-11.
6. **Alessandrini, A., S. Namura, M. A. Moskowitz, and J. V. Bonventre.** 1999. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A **96:**12866-9.
7. **Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Saltiel.** 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. J Biol Chem **270:**27489-94.
8. **Alessi, D. R., N. Gomez, G. Moorhead, T. Lewis, S. M. Keyse, and P. Cohen.** 1995. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. Curr Biol **5:**283-95.
9. **Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall, and S. Cowley.** 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. Embo J **13:**1610-9.
10. **Allan, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak, and P. R. Clarke.** 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. Nat Cell Biol **5:**647-54.
11. **Andersen, J. K.** 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Nat Med **10 Suppl:**S18-25.
12. **Aoudjit, F., and K. Vuori.** 2001. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. J Cell Biol **152:**633-43.
13. **Aplin, A. E., S. A. Stewart, R. K. Assoian, and R. L. Juliano.** 2001. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. J Cell Biol **153:**273-82.
14. **Arany, I., J. K. Megyesi, H. Kaneto, P. M. Price, and R. L. Safirstein.** 2004. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol **287:**F543-9.
15. **Arendt, T., M. Holzer, A. Grossmann, D. Zedlick, and M. K. Bruckner.** 1995. Increased expression and subcellular translocation of the mitogen activated protein kinase kinase and mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease. Neuroscience **68:**5-18.

16. **Baccarini, M.** 2002. An old kinase on a new path: Raf and apoptosis. Cell Death Differ **9:**783-5.
17. **Bacus, S. S., A. V. Gudkov, M. Lowe, L. Lyass, Y. Yung, A. P. Komarov, K. Keyomarsi, Y. Yarden, and R. Seger.** 2001. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. Oncogene **20:**147-55.
18. **Baehrecke, E. H.** 2002. How death shapes life during development. Nat Rev Mol Cell Biol **3:**779-87.
19. **Ballif, B. A., and J. Blenis.** 2001. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. Cell Growth Differ **12:**397-408.
20. **Bang, Y. J., J. H. Kwon, S. H. Kang, J. W. Kim, and Y. C. Yang.** 1998. Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. Biochem Biophys Res Commun **250:**43-7.
21. **Bansal, A., R. D. Ramirez, and J. D. Minna.** 1997. Mutation analysis of the coding sequences of MEK-1 and MEK-2 genes in human lung cancer cell lines. Oncogene **14:**1231-4.
22. **Bantel, H., I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff, and S. Wesselborg.** 1999. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. Cancer Res **59:**2083-90.
23. **Baumann, B., C. K. Weber, J. Troppmair, S. Whiteside, A. Israel, U. R. Rapp, and T. Wirth.** 2000. Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**4615-20.
24. **Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Tailor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, and D. R. Green.** 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat Cell Biol **2:**469-75.
25. **Belanger, L. F., S. Roy, M. Tremblay, B. Brott, A. M. Steff, W. Mourad, P. Hugo, R. Erikson, and J. Charron.** 2003. Mek2 is dispensable for mouse growth and development. Mol Cell Biol **23:**4778-87.
26. **Bell, L. A., and K. M. Ryan.** 2004. Life and death decisions by E2F-1. Cell Death Differ **11:**137-42.
27. **Bergmann, A., J. Agapite, K. McCall, and H. Steller.** 1998. The Drosophila gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. Cell **95:**331-41.
28. **Bertin, J., R. C. Armstrong, S. Ottilie, D. A. Martin, Y. Wang, S. Banks, G. H. Wang, T. G. Senkevich, E. S. Alnemri, B. Moss, M. J. Lenardo, K. J. Tomaselli, and J. I. Cohen.** 1997. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **94:**1172-6.
29. **Besnault, L., N. Schrantz, M. T. Auffredou, G. Leca, M. F. Bourgeade, and A. Vazquez.** 2001. B cell receptor cross-linking triggers a caspase-8-dependent apoptotic pathway that is independent of the death effector domain of Fas-associated death domain protein. J Immunol **167:**733-40.
30. **Bhardwaj, A., and B. B. Aggarwal.** 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. J Clin Immunol **23:**317-32.
31. **Bhat, N. R., and P. Zhang.** 1999. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. J Neurochem **72:**112-9.
32. **Blalock, W. L., M. Pearce, L. S. Steelman, R. A. Franklin, S. A. McCarthy, H. Cherwinski, M. McMahon, and J. A. McCubrey.** 2000. A conditionally-active form

of MEK1 results in autocrine tranformation of human and mouse hematopoietic cells. Oncogene **19:**526-36.

33. **Blank, N., R. Burger, B. Duerr, F. Bakker, A. Wohlfarth, I. Dumitriu, J. R. Kalden, and M. Herrmann.** 2002. MEK inhibitor U0126 interferes with immunofluorescence analysis of apoptotic cell death. Cytometry **48:**179-84.
34. **Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green, and G. S. Salvesen.** 2003. A unified model for apical caspase activation. Mol Cell **11:**529-41.
35. **Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg.** 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. Science **286:**1358-62.
36. **Borner, C.** 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol **39:**615-47.
37. **Borsch-Haubold, A. G., S. Pasquet, and S. P. Watson.** 1998. Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase. J Biol Chem **273:**28766-72.
38. **Bosch, E., H. Cherwinski, D. Peterson, and M. McMahon.** 1997. Mutations of critical amino acids affect the biological and biochemical properties of oncogenic A-Raf and Raf-1. Oncogene **15:**1021-33.
39. **Boucher, M. J., J. Morisset, P. H. Vachon, J. C. Reed, J. Laine, and N. Rivard.** 2000. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. J Cell Biochem **79:**355-69.
40. **Brancho, D., N. Tanaka, A. Jaeschke, J. J. Ventura, N. Kelkar, Y. Tanaka, M. Kyuuma, T. Takeshita, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. Genes Dev **17:**1969-78.
41. **Brand, A., S. Gil, R. Seger, and E. Yavin.** 2001. Lipid constituents in oligodendroglial cells alter susceptibility to H2O2-induced apoptotic cell death via ERK activation. J Neurochem **76:**910-8.
42. **Bratton, S. B., G. Walker, S. M. Srinivasula, X. M. Sun, M. Butterworth, E. S. Alnemri, and G. M. Cohen.** 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. Embo J **20:**998-1009.
43. **Breckenridge, D. G., M. Nguyen, S. Kuppig, M. Reth, and G. C. Shore.** 2002. The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**4331-6.
44. **Breckenridge, D. G., and D. Xue.** 2004. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. Curr Opin Cell Biol **16:**647-52.
45. **Breitschopf, K., J. Haendeler, P. Malchow, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler.** 2000. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. Mol Cell Biol **20:**1886-96.
46. **Brondello, J. M., A. Brunet, J. Pouyssegur, and F. R. McKenzie.** 1997. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. J Biol Chem **272:**1368-76.
47. **Brondello, J. M., J. Pouyssegur, and F. R. McKenzie.** 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. Science **286:**2514-7.

48. **Bruder, J. T., G. Heidecker, and U. R. Rapp.** 1992. Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. Genes Dev **6:**545-56.
49. **Bruey, J. M., C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S. A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A. P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary, and C. Garrido.** 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol **2:**645-52.
50. **Brummer, T., P. E. Shaw, M. Reth, and Y. Misawa.** 2002. Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. Embo J **21:**5611-22.
51. **Brunet, A., G. Pages, and J. Pouyssegur.** 1994. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. Oncogene **9:**3379-87.
52. **Brunner, D., N. Oellers, J. Szabad, W. H. Biggs, 3rd, S. L. Zipursky, and E. Hafen.** 1994. A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. Cell **76:**875-88.
53. **Bueno, O. F., L. J. De Windt, K. M. Tymitz, S. A. Witt, T. R. Kimball, R. Klevitsky, T. E. Hewett, S. P. Jones, D. J. Lefer, C. F. Peng, R. N. Kitsis, and J. D. Molkentin.** 2000. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. Embo J **19:**6341-50.
54. **Burack, W. R., and T. W. Sturgill.** 1997. The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. Biochemistry **36:**5929-33.
55. **Cacace, A. M., N. R. Michaud, M. Therrien, K. Mathes, T. Copeland, G. M. Rubin, and D. K. Morrison.** 1999. Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. Mol Cell Biol **19:**229-40.
56. **Calabrese, C., A. Frank, K. Maclean, and R. Gilbertson.** 2003. Medulloblastoma sensitivity to 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin requires MEK/ERKM. J Biol Chem **278:**24951-9.
57. **Calipel, A., G. Lefevre, C. Pouponnot, F. Mouriaux, A. Eychene, and F. Mascarelli.** 2003. Mutation of B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation through the MEK/ERK pathway. J Biol Chem **278:**42409-18.
58. **Callsen, D., J. Pfeilschifter, and B. Brune.** 1998. Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. J Immunol **161:**4852-8.
59. **Camps, M., A. Nichols, and S. Arkinstall.** 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. Faseb J **14:**6-16.
60. **Camps, M., A. Nichols, C. Gillieron, B. Antonsson, M. Muda, C. Chabert, U. Boschert, and S. Arkinstall.** 1998. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. Science **280:**1262-5.
61. **Cardone, M. H., G. S. Salvesen, C. Widmann, G. Johnson, and S. M. Frisch.** 1997. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. Cell **90:**315-23.
62. **Carmel, J. B., O. Kakinohana, R. Mestril, W. Young, M. Marsala, and R. P. Hart.** 2004. Mediators of ischemic preconditioning identified by microarray analysis of rat spinal cord. Exp Neurol **185:**81-96.
63. **Cassarino, D. S., E. M. Halvorsen, R. H. Swerdlow, N. N. Abramova, W. D. Parker, Jr., T. W. Sturgill, and J. P. Bennett, Jr.** 2000. Interaction among

mitochondria, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB in cellular models of Parkinson's disease. J Neurochem **74:**1384-92.

64. **Cassens, U., G. Lewinski, A. K. Samraj, H. von Bernuth, H. Baust, K. Khazaie, and M. Los.** 2003. Viral modulation of cell death by inhibition of caspases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **51:**19-27.
65. **Castro-Obregon, S., R. V. Rao, G. del Rio, S. F. Chen, K. S. Poksay, S. Rabizadeh, S. Vesce, X. K. Zhang, R. A. Swanson, and D. E. Bredesen.** 2004. Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. J Biol Chem **279:**17543-53.
66. **Cavanaugh, J. E., J. Ham, M. Hetman, S. Poser, C. Yan, and Z. Xia.** 2001. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. J Neurosci **21:**434-43.
67. **Cha, Y. K., Y. H. Kim, Y. H. Ahn, and J. Y. Koh.** 2000. Epidermal growth factor induces oxidative neuronal injury in cortical culture. J Neurochem **75:**298-303.
68. **Chakraborti, S.** 2003. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. Cell Signal **15:**637-65.
69. **Chambon, J. P., J. Soule, P. Pomies, P. Fort, A. Sahuquet, D. Alexandre, P. H. Mangeat, and S. Baghdiguian.** 2002. Tail regression in Ciona intestinalis (Prochordate) involves a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. Development **129:**3105-14.
70. **Chang, D. W., Z. Xing, V. L. Capacio, M. E. Peter, and X. Yang.** 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. Embo J **22:**4132-42.
71. **Chang, F., L. S. Steelman, J. T. Lee, J. G. Shelton, P. M. Navolanic, W. L. Blalock, R. A. Franklin, and J. A. McCubrey.** 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. Leukemia **17:**1263-93.
72. **Chen, G., and D. V. Goeddel.** 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science **296:**1634-5.
73. **Chen, J., K. Fujii, L. Zhang, T. Roberts, and H. Fu.** 2001. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**7783-8.
74. **Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb.** 2001. MAP kinases. Chem Rev **101:**2449-76.
75. **Chen, Z., H. Seimiya, M. Naito, T. Mashima, A. Kizaki, S. Dan, M. Imaizumi, H. Ichijo, K. Miyazono, and T. Tsuruo.** 1999. ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. Oncogene **18:**173-80.
76. **Chin, P. C., L. Liu, B. E. Morrison, A. Siddiq, R. R. Ratan, T. Bottiglieri, and S. R. D'Mello.** 2004. The c-Raf inhibitor GW5074 provides neuroprotection in vitro and in an animal model of neurodegeneration through a MEK-ERK and Akt-independent mechanism. J Neurochem **90:**595-608.
77. **Chiu, V. K., T. Bivona, A. Hach, J. B. Sajous, J. Silletti, H. Wiener, R. L. Johnson, 2nd, A. D. Cox, and M. R. Philips.** 2002. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. Nat Cell Biol **4:**343-50.
78. **Cho, H. N., Y. J. Lee, C. K. Cho, S. J. Lee, and Y. S. Lee.** 2002. Downregulation of ERK2 is essential for the inhibition of radiation-induced cell death in HSP25 overexpressed L929 cells. Cell Death Differ **9:**448-56.
79. **Chong, H., H. G. Vikis, and K. L. Guan.** 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. Cell Signal **15:**463-9.

80. **Chu, C. T., D. J. Levinthal, S. M. Kulich, E. M. Chalovich, and D. B. DeFranco.** 2004. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. Eur J Biochem **271:**2060-6.
81. **Chu, Y., P. A. Solski, R. Khosravi-Far, C. J. Der, and K. Kelly.** 1996. 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 **271:**6497-501.
82. **Cirman, T., K. Oresic, G. D. Mazovec, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen, and B. Turk.** 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. J Biol Chem **279:**3578-87.
83. **Colucci-D'Amato, L., C. Perrone-Capano, and U. di Porzio.** 2003. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. Bioessays **25:**1085-95.
84. **Corbit, K. C., N. Trakul, E. M. Eves, B. Diaz, M. Marshall, and M. R. Rosner.** 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. J Biol Chem **278:**13061-8.
85. **Cornelis, S., Y. Bruynooghe, G. Van Loo, X. Saelens, P. Vandenabeele, and R. Beyaert.** 2005. Apoptosis of hematopoietic cells induced by growth factor withdrawal is associated with caspase-9 mediated cleavage of Raf-1. Oncogene **24:**1552-62.
86. **Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C. J. Marshall.** 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. Cell **77:**841-52.
87. **Cutler, R. E., Jr., R. M. Stephens, M. R. Saracino, and D. K. Morrison.** 1998. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**9214-9.
88. **Dai, Y., T. H. Landowski, S. T. Rosen, P. Dent, and S. Grant.** 2002. Combined treatment with the checkpoint abrogator UCN-01 and MEK1/2 inhibitors potently induces apoptosis in drug-sensitive and -resistant myeloma cells through an IL-6-independent mechanism. Blood **100:**3333-43.
89. **Dai, Y., C. Yu, V. Singh, L. Tang, Z. Wang, R. McInistry, P. Dent, and S. Grant.** 2001. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. Cancer Res **61:**5106-15.
90. **Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer.** 2004. Cell death: critical control points. Cell **116:**205-19.
91. **Danilkovitch, A., S. Donley, A. Skeel, and E. J. Leonard.** 2000. Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells. Mol Cell Biol **20:**2218-27.
92. **Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal.** 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature **417:**949-54.

93. **Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen.** 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J **351:**95-105.
94. **Davis, J. M., P. M. Navolanic, C. R. Weinstein-Oppenheimer, L. S. Steelman, W. Hu, M. Konopleva, M. V. Blagosklonny, and J. A. McCubrey.** 2003. Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. Clin Cancer Res **9:**1161-70.
95. **Davis, R. J.** 1995. Transcriptional regulation by MAP kinases. Mol Reprod Dev **42:**459-67.
96. **Debatin, K. M., and P. H. Krammer.** 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. Oncogene **23:**2950-66.
97. **DeFea, K. A., J. Zalevsky, M. S. Thoma, O. Dery, R. D. Mullins, and N. W. Bunnett.** 2000. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. J Cell Biol **148:**1267-81.
98. **Demetri, G. D., M. von Mehren, C. D. Blanke, A. D. Van den Abbeele, B. Eisenberg, P. J. Roberts, M. C. Heinrich, D. A. Tuveson, S. Singer, M. Janicek, J. A. Fletcher, S. G. Silverman, S. L. Silberman, R. Capdeville, B. Kiese, B. Peng, S. Dimitrijevic, B. J. Druker, C. Corless, C. D. Fletcher, and H. Joensuu.** 2002. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med **347:**472-80.
99. **Deng, X., P. Ruvolo, B. Carr, and W. S. May, Jr.** 2000. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**1578-83.
100. **Denkert, C., W. D. Schmitt, S. Berger, A. Reles, S. Pest, A. Siegert, W. Lichtenegger, M. Dietel, and S. Hauptmann.** 2002. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. Int J Cancer **102:**507-13.
101. **Deora, A. A., D. P. Hajjar, and H. M. Lander.** 2000. Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. Biochemistry **39:**9901-8.
102. **Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. J. Davis.** 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell **76:**1025-37.
103. **Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I. H. Wu, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis.** 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. Science **267:**682-5.
104. **Derouet, M., L. Thomas, A. Cross, R. J. Moots, and S. W. Edwards.** 2004. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. J Biol Chem **279:**26915-21.
105. **Desire, L., Y. Courtois, and J. C. Jeanny.** 2000. Endogenous and exogenous fibroblast growth factor 2 support survival of chick retinal neurons by control of neuronal neuronal bcl-x(L) and bcl-2 expression through a fibroblast berowth factor receptor 1- and ERK-dependent pathway. J Neurochem **75:**151-63.
106. **Dhillon, A. S., and W. Kolch.** 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. Arch Biochem Biophys **404:**3-9.
107. **Dhillon, A. S., C. Pollock, H. Steen, P. E. Shaw, H. Mischak, and W. Kolch.** 2002. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. Mol Cell Biol **22:**3237-46.

108. **Diaz, B., D. Barnard, A. Filson, S. MacDonald, A. King, and M. Marshall.** 1997. Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. Mol Cell Biol **17:**4509-16.
109. **Dickson, B., F. Sprenger, D. Morrison, and E. Hafen.** 1992. Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. Nature **360:**600-3.
110. **Dickson, D. W.** 2004. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? J Clin Invest **114:**23-7.
111. **Dimmeler, S., K. Breitschopf, J. Haendeler, and A. M. Zeiher.** 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. J Exp Med **189:**1815-22.
112. **Domina, A. M., J. A. Vrana, M. A. Gregory, S. R. Hann, and R. W. Craig.** 2004. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. Oncogene **23:**5301-15.
113. **Dougherty, M. K., J. Muller, D. A. Ritt, M. Zhou, X. Z. Zhou, T. D. Copeland, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, K. P. Lu, and D. K. Morrison.** 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. Mol Cell **17:**215-24.
114. **Downward, J.** 1996. Control of ras activation. Cancer Surv **27:**87-100.
115. **Droge, W.** 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev **82:**47-95.
116. **Druker, B. J., M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, N. B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones, and C. L. Sawyers.** 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med **344:**1031-7.
117. **Duan, H., and V. M. Dixit.** 1997. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. Nature **385:**86-9.
118. **Dudley, D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges, and A. R. Saltiel.** 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci U S A **92:**7686-9.
119. **Dufresne, S. D., C. Bjorbaek, K. El-Haschimi, Y. Zhao, W. G. Aschenbach, D. E. Moller, and L. J. Goodyear.** 2001. Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. Mol Cell Biol **21:**81-7.
120. **Dumaz, N., Y. Light, and R. Marais.** 2002. Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. Mol Cell Biol **22:**3717-28.
121. **Eblaghie, M. C., J. S. Lunn, R. J. Dickinson, A. E. Munsterberg, J. J. Sanz-Ezquerro, E. R. Farrell, J. Mathers, S. M. Keyse, K. Storey, and C. Tickle.** 2003. Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. Curr Biol **13:**1009-18.
122. **Eblen, S. T., J. K. Slack-Davis, A. Tarcsafalvi, J. T. Parsons, M. J. Weber, and A. D. Catling.** 2004. Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. Mol Cell Biol **24:**2308-17.
123. **Ehrenreiter, K., D. Piazzolla, V. Velamoor, I. Sobczak, J. V. Small, J. Takeda, T. Leung, and M. Baccarini.** 2005. Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. J Cell Biol **168:**955-64.
124. **El-Ashry, D., D. L. Miller, S. Kharbanda, M. E. Lippman, and F. G. Kern.** 1997. Constitutive Raf-1 kinase activity in breast cancer cells induces both estrogen-independent growth and apoptosis. Oncogene **15:**423-35.

125. **El-Haschimi, K., S. D. Dufresne, M. F. Hirshman, J. S. Flier, L. J. Goodyear, and C. Bjorbaek.** 2003. Insulin resistance and lipodystrophy in mice lacking ribosomal S6 kinase 2. Diabetes **52:**1340-6.
126. **Ellinger-Ziegelbauer, H., K. Brown, K. Kelly, and U. Siebenlist.** 1997. Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathways by an inducible mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. J Biol Chem **272:**2668-74.
127. **Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee, and P. R. Young.** 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem **273:**14363-7.
128. **English, J. M., G. Pearson, T. Hockenberry, L. Shivakumar, M. A. White, and M. H. Cobb.** 1999. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. J Biol Chem **274:**31588-92.
129. **Erhardt, P., E. J. Schremser, and G. M. Cooper.** 1999. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. Mol Cell Biol **19:**5308-15.
130. **Esteban, L. M., C. Vicario-Abejon, P. Fernandez-Salguero, A. Fernandez-Medarde, N. Swaminathan, K. Yienger, E. Lopez, M. Malumbres, R. McKay, J. M. Ward, A. Pellicer, and E. Santos.** 2001. Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. Mol Cell Biol **21:**1444-52.
131. **Fabian, J. R., I. O. Daar, and D. K. Morrison.** 1993. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. Mol Cell Biol **13:**7170-9.
132. **Fanton, C. P., M. McMahon, and R. O. Pieper.** 2001. Dual growth arrest pathways in astrocytes and astrocytic tumors in response to Raf-1 activation. J Biol Chem **276:**18871-7.
133. **Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle, and J. M. Trzaskos.** 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem **273:**18623-32.
134. **Ferrell, J. E., Jr., and R. R. Bhatt.** 1997. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem **272:**19008-16.
135. **Ferrer, I., R. Blanco, M. Carmona, R. Ribera, E. Goutan, B. Puig, M. J. Rey, A. Cardozo, F. Vinals, and T. Ribalta.** 2001. Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. Brain Pathol **11:**144-58.
136. **Fleury, C., B. Mignotte, and J. L. Vayssiere.** 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie **84:**131-41.
137. **Formstecher, E., J. W. Ramos, M. Fauquet, D. A. Calderwood, J. C. Hsieh, B. Canton, X. T. Nguyen, J. V. Barnier, J. Camonis, M. H. Ginsberg, and H. Chneiweiss.** 2001. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. Dev Cell **1:**239-50.
138. **Friguls, B., V. Petegnief, C. Justicia, M. Pallas, and A. M. Planas.** 2002. Activation of ERK and Akt signaling in focal cerebral ischemia: modulation by TGF-alpha and involvement of NMDA receptor. Neurobiol Dis **11:**443-56.

139. **Frost, J. A., S. Xu, M. R. Hutchison, S. Marcus, and M. H. Cobb.** 1996. Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. Mol Cell Biol **16:**3707-13.
140. **Fukuda, M., I. Gotoh, M. Adachi, Y. Gotoh, and E. Nishida.** 1997. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. J Biol Chem **272:**32642-8.
141. **Gabbita, S. P., K. A. Robinson, C. A. Stewart, R. A. Floyd, and K. Hensley.** 2000. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. Arch Biochem Biophys **376:**1-13.
142. **Gardai, S. J., D. A. Hildeman, S. K. Frankel, B. B. Whitlock, S. C. Frasch, N. Borregaard, P. Marrack, D. L. Bratton, and P. M. Henson.** 2004. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. J Biol Chem **279:**21085-95.
143. **Gardai, S. J., B. B. Whitlock, Y. Q. Xiao, D. B. Bratton, and P. M. Henson.** 2004. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. J Biol Chem **279:**44695-703.
144. **Garnett, M. J., and R. Marais.** 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. Cancer Cell **6:**313-9.
145. **Gauld, S. B., D. Blair, C. A. Moss, S. D. Reid, and M. M. Harnett.** 2002. Differential roles for extracellularly regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in B cell antigen receptor-induced apoptosis and CD40-mediated rescue of WEHI-231 immature B cells. J Immunol **168:**3855-64.
146. **Gervais, F. G., R. Singaraja, S. Xanthoudakis, C. A. Gutekunst, B. R. Leavitt, M. Metzler, A. S. Hackam, J. Tam, J. P. Vaillancourt, V. Houtzager, D. M. Rasper, S. Roy, M. R. Hayden, and D. W. Nicholson.** 2002. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. Nat Cell Biol **4:**95-105.
147. **Giroux, S., M. Tremblay, D. Bernard, J. F. Cardin-Girard, S. Aubry, L. Larouche, S. Rousseau, J. Huot, J. Landry, L. Jeannotte, and J. Charron.** 1999. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. Curr Biol **9:**369-72.
148. **Glading, A., R. J. Bodnar, I. J. Reynolds, H. Shiraha, L. Satish, D. A. Potter, H. C. Blair, and A. Wells.** 2004. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. Mol Cell Biol **24:**2499-512.
149. **Goetz, C. A., J. J. O'Neil, and M. A. Farrar.** 2003. Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. J Biol Chem **278:**51184-9.
150. **Gonzalez, F. A., A. Seth, D. L. Raden, D. S. Bowman, F. S. Fay, and R. J. Davis.** 1993. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. J Cell Biol **122:**1089-101.
151. **Gow, A. J., C. R. Farkouh, D. A. Munson, M. A. Posencheg, and H. Ischiropoulos.** 2004. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287:**L262-8.
152. **Gozuacik, D., and A. Kimchi.** 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene **23:**2891-906.
153. **Graves, L. M., H. I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R. M. Pope, M. A. Collins, E. N. Dahlstrand, H. S. Earp, 3rd, and D. R. Evans.** 2000. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. Nature **403:**328-32.

154. **Gredinger, E., A. N. Gerber, Y. Tamir, S. J. Tapscott, and E. Bengal.** 1998. Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. J Biol Chem **273:**10436-44.
155. **Green, D. R., and G. I. Evan.** 2002. A matter of life and death. Cancer Cell **1:**19-30.
156. **Grill, C., F. Gheyas, P. Dayananth, W. Jin, W. Ding, P. Qiu, L. Wang, R. J. Doll, and J. M. English.** 2004. Analysis of the ERK1,2 transcriptome in mammary epithelial cells. Biochem J **381:**635-44.
157. **Gronda, M., S. Arab, B. Iafrate, H. Suzuki, and B. W. Zanke.** 2001. Hematopoietic protein tyrosine phosphatase suppresses extracellular stimulus-regulated kinase activation. Mol Cell Biol **21:**6851-8.
158. **Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer.** 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev **13:**1899-911.
159. **Gu, Z., Q. Jiang, and G. Zhang.** 2001. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death. Brain Res **901:**79-84.
160. **Guise, S., D. Braguer, G. Carles, A. Delacourte, and C. Briand.** 2001. Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. J Neurosci Res **63:**257-67.
161. **Gumienny, T. L., E. Lambie, E. Hartwieg, H. R. Horvitz, and M. O. Hengartner.** 1999. Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. Development **126:**1011-22.
162. **Gupta, S., D. Campbell, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. Science **267:**389-93.
163. **Gurjar, M. V., J. Deleon, R. V. Sharma, and R. C. Bhalla.** 2001. Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. Am J Physiol Heart Circ Physiol **281:**H2568-74.
164. **Han, D. K., P. M. Chaudhary, M. E. Wright, C. Friedman, B. J. Trask, R. T. Riedel, D. G. Baskin, S. M. Schwartz, and L. Hood.** 1997. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. Proc Natl Acad Sci U S A **94:**11333-8.
165. **Han, M., R. V. Aroian, and P. W. Sternberg.** 1990. The let-60 locus controls the switch between vulval and nonvulval cell fates in Caenorhabditis elegans. Genetics **126:**899-913.
166. **Han, M., and P. W. Sternberg.** 1991. Analysis of dominant-negative mutations of the Caenorhabditis elegans let-60 ras gene. Genes Dev **5:**2188-98.
167. **Harding, A., V. Hsu, K. Kornfeld, and J. F. Hancock.** 2003. Identification of residues and domains of Raf important for function in vivo and in vitro. J Biol Chem **278:**45519-27.
168. **Harris, F. M., W. J. Brecht, Q. Xu, R. W. Mahley, and Y. Huang.** 2004. Increased tau phosphorylation in apolipoprotein E4 transgenic mice is associated with activation of extracellular signal-regulated kinase: modulation by zinc. J Biol Chem **279:**44795-801.
169. **Hatano, N., Y. Mori, M. Oh-hora, A. Kosugi, T. Fujikawa, N. Nakai, H. Niwa, J. Miyazaki, T. Hamaoka, and M. Ogata.** 2003. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. Genes Cells **8:**847-56.
170. **Hayashi, M., S. W. Kim, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, E. D. Abel, B. Eliceiri, Y. Yang, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 2004. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. J Clin Invest **113:**1138-48.

171. **Hill, J. M., H. Vaidyanathan, J. W. Ramos, M. H. Ginsberg, and M. H. Werner.** 2002. Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. Embo J **21:**6494-504.
172. **Hindley, A., and W. Kolch.** 2002. Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. J Cell Sci **115:**1575-81.
173. **Hingorani, S. R., M. A. Jacobetz, G. P. Robertson, M. Herlyn, and D. A. Tuveson.** 2003. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. Cancer Res **63:**5198-202.
174. **Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris.** 1991. p53 mutations in human cancers. Science **253:**49-53.
175. **Holmstrom, T. H., S. C. Chow, I. Elo, E. T. Coffey, S. Orrenius, L. Sistonen, and J. E. Eriksson.** 1998. Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling. J Immunol **160:**2626-36.
176. **Holmstrom, T. H., I. Schmitz, T. S. Soderstrom, M. Poukkula, V. L. Johnson, S. C. Chow, P. H. Krammer, and J. E. Eriksson.** 2000. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. Embo J **19:**5418-28.
177. **Holmstrom, T. H., S. E. Tran, V. L. Johnson, N. G. Ahn, S. C. Chow, and J. E. Eriksson.** 1999. Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. Mol Cell Biol **19:**5991-6002.
178. **Hoshino, R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, S. Ari-i, H. Wada, J. Fujimoto, and M. Kohno.** 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. Oncogene **18:**813-22.
179. **Hoyos, B., A. Imam, I. Korichneva, E. Levi, R. Chua, and U. Hammerling.** 2002. Activation of c-Raf kinase by ultraviolet light. Regulation by retinoids. J Biol Chem **277:**23949-57.
180. **Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel.** 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell **81:**495-504.
181. **Hsu, V., C. L. Zobel, E. J. Lambie, T. Schedl, and K. Kornfeld.** 2002. Caenorhabditis elegans lin-45 raf is essential for larval viability, fertility and the induction of vulval cell fates. Genetics **160:**481-92.
182. **Hu, Y., L. Ding, D. M. Spencer, and G. Nunez.** 1998. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. J Biol Chem **273:**33489-94.
183. **Huang, C., K. Jacobson, and M. D. Schaller.** 2004. MAP kinases and cell migration. J Cell Sci **117:**4619-28.
184. **Huser, M., J. Luckett, A. Chiloeches, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X. M. Sun, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard.** 2001. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. Embo J **20:**1940-51.
185. **Hynes, N. E., H. A. Gerber, S. Saurer, and B. Groner.** 1989. Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines. J Cell Biochem **39:**167-73.
186. **Ikawa, S., M. Fukui, Y. Ueyama, N. Tamaoki, T. Yamamoto, and K. Toyoshima.** 1988. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. Mol Cell Biol **8:**2651-4.
187. **Ikenoue, T., Y. Hikiba, F. Kanai, J. Aragaki, Y. Tanaka, J. Imamura, T. Imamura, M. Ohta, H. Ijichi, K. Tateishi, T. Kawakami, M. Matsumura, T. Kawabe, and M. Omata.** 2004. Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular

signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. Cancer Res **64:**3428-35.

188. **Ikenoue, T., Y. Hikiba, F. Kanai, Y. Tanaka, J. Imamura, T. Imamura, M. Ohta, H. Ijichi, K. Tateishi, T. Kawakami, J. Aragaki, M. Matsumura, T. Kawabe, and M. Omata.** 2003. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. Cancer Res **63:**8132-7.
189. **Inohara, N., T. Koseki, Y. Hu, S. Chen, and G. Nunez.** 1997. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **94:**10717-22.
190. **Irmler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp.** 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature **388:**190-5.
191. **Ise, K., K. Nakamura, K. Nakao, S. Shimizu, H. Harada, T. Ichise, J. Miyoshi, Y. Gondo, T. Ishikawa, A. Aiba, and M. Katsuki.** 2000. Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. Oncogene **19:**2951-6.
192. **Jaattela, M.** 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. Oncogene **23:**2746-56.
193. **Janulis, M., N. Trakul, G. Greene, E. M. Schaefer, J. D. Lee, and M. R. Rosner.** 2001. A novel mitogen-activated protein kinase is responsive to Raf and mediates growth factor specificity. Mol Cell Biol **21:**2235-47.
194. **Jaumot, M., and J. F. Hancock.** 2001. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. Oncogene **20:**3949-58.
195. **Jesenberger, V., K. J. Procyk, J. Ruth, M. Schreiber, H. C. Theussl, E. F. Wagner, and M. Baccarini.** 2001. Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. J Exp Med **193:**353-64.
196. **Jiang, X., H. E. Kim, H. Shu, Y. Zhao, H. Zhang, J. Kofron, J. Donnelly, D. Burns, S. C. Ng, S. Rosenberg, and X. Wang.** 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. Science **299:**223-6.
197. **Jiang, X., and X. Wang.** 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. Annu Rev Biochem **73:**87-106.
198. **Johnson, L., D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R. T. Bronson, H. Umanoff, W. Edelmann, R. Kucherlapati, and T. Jacks.** 1997. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. Genes Dev **11:**2468-81.
199. **Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, and S. W. Lowe.** 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell **108:**153-64.
200. **Juo, P., C. J. Kuo, S. E. Reynolds, R. F. Konz, J. Raingeaud, R. J. Davis, H. P. Biemann, and J. Blenis.** 1997. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. Mol Cell Biol **17:**24-35.
201. **Kamakura, S., T. Moriguchi, and E. Nishida.** 1999. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. J Biol Chem **274:**26563-71.
202. **Kamata, H., S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata, and M. Karin.** 2005. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell **120:**649-61.
203. **Karasarides, M., A. Chiloeches, R. Hayward, D. Niculescu-Duvaz, I. Scanlon, F. Friedlos, L. Ogilvie, D. Hedley, J. Martin, C. J. Marshall, C. J. Springer, and R. Marais.** 2004. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. Oncogene **23:**6292-8.

204. **Karin, M., and A. Lin.** 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat Immunol **3:**221-7.
205. **Kasler, H. G., J. Victoria, O. Duramad, and A. Winoto.** 2000. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. Mol Cell Biol **20:**8382-9.
206. **Kawakami, Y., J. Rodriguez-Leon, C. M. Koth, D. Buscher, T. Itoh, A. Raya, J. K. Ng, C. R. Esteban, S. Takahashi, D. Henrique, M. F. Schwarz, H. Asahara, and J. C. Izpisua Belmonte.** 2003. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. Nat Cell Biol **5:**513-9.
207. **Kazama, H., and S. Yonehara.** 2000. Oncogenic K-Ras and basic fibroblast growth factor prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of mitogen-activated protein kinase. J Cell Biol **148:**557-66.
208. **Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer **26:**239-57.
209. **Keyse, S. M.** 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. Curr Opin Cell Biol **12:**186-92.
210. **Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, and M. H. Cobb.** 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. Cell **93:**605-15.
211. **Kim, G. S., J. S. Hong, S. W. Kim, J. M. Koh, C. S. An, J. Y. Choi, and S. L. Cheng.** 2003. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. J Biol Chem **278:**21920-9.
212. **Kim, S. C., J. S. Hahn, Y. H. Min, N. C. Yoo, Y. W. Ko, and W. J. Lee.** 1999. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. Blood **93:**3893-9.
213. **King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M. S. Marshall.** 1998. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. Nature **396:**180-3.
214. **Klemke, R. L., S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lanerolle, and D. A. Cheresh.** 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. J Cell Biol **137:**481-92.
215. **Koera, K., K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba, and M. Katsuki.** 1997. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. Oncogene **15:**1151-9.
216. **Kolch, W.** 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J **351 Pt 2:**289-305.
217. **Kontoyiannis, D., A. Kotlyarov, E. Carballo, L. Alexopoulou, P. J. Blackshear, M. Gaestel, R. Davis, R. Flavell, and G. Kollias.** 2001. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. Embo J **20:**3760-70.
218. **Koo, H. M., M. VanBrocklin, M. J. McWilliams, S. H. Leppla, N. S. Duesbery, and G. F. Woude.** 2002. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**3052-7.
219. **Kornfeld, K., D. B. Hom, and H. R. Horvitz.** 1995. The ksr-1 gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in C. elegans. Cell **83:**903-13.

220. **Kosta, A., C. Roisin-Bouffay, M. F. Luciani, G. P. Otto, R. H. Kessin, and P. Golstein.** 2004. Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in Dictyostelium. J Biol Chem **279:**48404-9.
221. **Kotone-Miyahara, Y., K. Yamashita, K. K. Lee, S. Yonehara, T. Uchiyama, M. Sasada, and A. Takahashi.** 2004. Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C. J Leukoc Biol **76:**1047-56.
222. **Kottke, T. J., A. L. Blajeski, L. M. Martins, P. W. Mesner, Jr., N. E. Davidson, W. C. Earnshaw, D. K. Armstrong, and S. H. Kaufmann.** 1999. Comparison of paclitaxel-, 5-fluoro-2'-deoxyuridine-, and epidermal growth factor (EGF)-induced apoptosis. Evidence for EGF-induced anoikis. J Biol Chem **274:**15927-36.
223. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. Mol Endocrinol **16:**1638-51.
224. **Krysan, K., H. Dalwadi, S. Sharma, M. Pold, and S. Dubinett.** 2004. Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. Cancer Res **64:**6359-62.
225. **Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. Neuron **22:**667-76.
226. **Kulich, S. M., and C. T. Chu.** 2003. Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. J Biosci **28:**83-9.
227. **Kulich, S. M., and C. T. Chu.** 2001. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. J Neurochem **77:**1058-66.
228. **Kurada, P., and K. White.** 1998. Ras promotes cell survival in Drosophila by downregulating hid expression. Cell **95:**319-29.
229. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev **81:**807-69.
230. **Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch, and J. R. Woodgett.** 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. Nature **369:**156-60.
231. **Lander, H. M., A. J. Milbank, J. M. Tauras, D. P. Hajjar, B. L. Hempstead, G. D. Schwartz, R. T. Kraemer, U. A. Mirza, B. T. Chait, S. C. Burk, and L. A. Quilliam.** 1996. Redox regulation of cell signalling. Nature **381:**380-1.
232. **Lassus, P., P. Roux, O. Zugasti, A. Philips, P. Fort, and U. Hibner.** 2000. Extinction of rac1 and Cdc42Hs signalling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway. Oncogene **19:**2377-85.
233. **Lavoie, J. N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller, and J. Pouyssegur.** 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. J Biol Chem **271:**20608-16.
234. **Lavrik, I., A. Golks, and P. H. Krammer.** 2005. Death receptor signaling. J Cell Sci **118:**265-7.
235. **Le Gall, M., J. C. Chambard, J. P. Breittmayer, D. Grall, J. Pouyssegur, and E. Van Obberghen-Schilling.** 2000. The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. Mol Biol Cell **11:**1103-12.

236. **Le Mellay, V., R. Houben, J. Troppmair, C. Hagemann, S. Mazurek, U. Frey, J. Beigel, C. Weber, R. Benz, E. Eigenbrodt, and U. R. Rapp.** 2002. Regulation of glycolysis by Raf protein serine/threonine kinases. Adv Enzyme Regul **42:**317-32.
237. **Le Mellay, V., J. Troppmair, R. Benz, and U. R. Rapp.** 2002. Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. BMC Cell Biol **3:**14.
238. **Lee, J. T., Jr., and J. A. McCubrey.** 2002. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. Leukemia **16:**486-507.
239. **Lee, Y. J., H. N. Cho, J. W. Soh, G. J. Jhon, C. K. Cho, H. Y. Chung, S. Bae, S. J. Lee, and Y. S. Lee.** 2003. Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. Exp Cell Res **291:**251-66.
240. **Lehmann, K., E. Janda, C. E. Pierreux, M. Rytomaa, A. Schulze, M. McMahon, C. S. Hill, H. Beug, and J. Downward.** 2000. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. Genes Dev **14:**2610-22.
241. **Lenormand, P., C. Sardet, G. Pages, G. L'Allemain, A. Brunet, and J. Pouyssegur.** 1993. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. J Cell Biol **122:**1079-88.
242. **Levine, B., and D. J. Klionsky.** 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell **6:**463-77.
243. **Levinthal, D. J., and D. B. Defranco.** 2005. Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. J Biol Chem **280:**5875-83.
244. **Ley, R., K. Balmanno, K. Hadfield, C. Weston, and S. J. Cook.** 2003. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. J Biol Chem **278:**18811-6.
245. **Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang.** 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature **412:**95-9.
246. **Li, W., M. Han, and K. L. Guan.** 2000. The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. Genes Dev **14:**895-900.
247. **Lin, A. W., M. Barradas, J. C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano, and S. W. Lowe.** 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. Genes Dev **12:**3008-19.
248. **Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, and X. K. Zhang.** 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. Cell **116:**527-40.
249. **Lin, H., C. Chen, X. Li, and B. D. Chen.** 2002. Activation of the MEK/MAPK pathway is involved in bryostatin1-induced monocytic differenciation and up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein. Exp Cell Res **272:**192-8.
250. **Lin, J. H., A. Makris, C. McMahon, S. E. Bear, C. Patriotis, V. R. Prasad, R. Brent, E. A. Golemis, and P. N. Tsichlis.** 1999. The ankyrin repeat-containing adaptor protein Tvl-1 is a novel substrate and regulator of Raf-1. J Biol Chem **274:**14706-15.
251. **Liston, P., W. G. Fong, N. L. Kelly, S. Toji, T. Miyazaki, D. Conte, K. Tamai, C. G. Craig, M. W. McBurney, and R. G. Korneluk.** 2001. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. Nat Cell Biol **3:**128-33.
252. **Liston, P., W. G. Fong, and R. G. Korneluk.** 2003. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. Oncogene **22:**8568-80.

253. **Liu, J., and A. Lin.** 2005. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. Cell Res **15:**36-42.
254. **Liu, J. R., A. W. Opipari, L. Tan, Y. Jiang, Y. Zhang, H. Tang, and G. Nunez.** 2002. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. Cancer Res **62:**924-31.
255. **Liu, L., J. E. Cavanaugh, Y. Wang, H. Sakagami, Z. Mao, and Z. Xia.** 2003. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. Proc Natl Acad Sci U S A **100:**8532-7.
256. **Liu, S., S. M. Thomas, D. G. Woodside, D. M. Rose, W. B. Kiosses, M. Pfaff, and M. H. Ginsberg.** 1999. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. Nature **402:**676-81.
257. **Lockshin, R. A., and Z. Zakeri.** 2002. Caspase-independent cell deaths. Curr Opin Cell Biol **14:**727-33.
258. **Loda, M., P. Capodieci, R. Mishra, H. Yao, C. Corless, W. Grigioni, Y. Wang, C. Magi-Galluzzi, and P. J. Stork.** 1996. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. Am J Pathol **149:**1553-64.
259. **Long, X., E. A. Gize, K. Nephew, and R. M. Bigsby.** 2001. Evidence for estrogenic contamination of the MAPK inhibitor PD98059. Endocrinology **142:**5390-3.
260. **Lorenz, K., M. J. Lohse, and U. Quitterer.** 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. Nature **426:**574-9.
261. **Lu, Z., S. Xu, C. Joazeiro, M. H. Cobb, and T. Hunter.** 2002. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. Mol Cell **9:**945-56.
262. **Luciano, F., A. Jacquel, P. Colosetti, M. Herrant, S. Cagnol, G. Pages, and P. Auberger.** 2003. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. Oncogene **22:**6785-93.
263. **Lunghi, P., A. Tabilio, P. P. Dall'Aglio, E. Ridolo, C. Carlo-Stella, P. G. Pelicci, and A. Bonati.** 2003. Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukemia blasts. Leukemia **17:**1783-93.
264. **Luo, Z., G. Tzivion, P. J. Belshaw, D. Vavvas, M. Marshall, and J. Avruch.** 1996. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. Nature **383:**181-5.
265. **Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1999. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. Science **283:**655-61.
266. **Magi-Galluzzi, C., R. Mishra, M. Fiorentino, R. Montironi, H. Yao, P. Capodieci, K. Wishnow, I. Kaplan, P. J. Stork, and M. Loda.** 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. Lab Invest **76:**37-51.
267. **Manenti, S., C. Delmas, and J. M. Darbon.** 2002. Cell adhesion protects c-Raf-1 against ubiquitin-dependent degradation by the proteasome. Biochem Biophys Res Commun **294:**976-80.
268. **Mansour, S. J., J. M. Candia, J. E. Matsuura, M. C. Manning, and N. G. Ahn.** 1996. Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. Biochemistry **35:**15529-36.

269. **Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn.** 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. Science **265:**966-70.
270. **Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, and C. J. Marshall.** 1997. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. J Biol Chem **272:**4378-83.
271. **Marani, M., D. Hancock, R. Lopes, T. Tenev, J. Downward, and N. R. Lemoine.** 2004. Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. Oncogene **23:**2431-41.
272. **Marchetti, S., C. Gimond, J. C. Chambard, T. Touboul, D. Roux, J. Pouyssegur, and G. Pages.** 2005. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. Mol Cell Biol **25:**854-64.
273. **Mariathasan, S., A. Zakarian, D. Bouchard, A. M. Michie, J. C. Zuniga-Pflucker, and P. S. Ohashi.** 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. J Immunol **167:**4966-73.
274. **Marshall, C. J.** 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell **80:**179-85.
275. **Marusawa, H., S. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm, and J. C. Reed.** 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. Embo J **22:**2729-40.
276. **Marx, M., P. Crisanti, A. Eychene, C. Bechade, D. Laugier, J. Ghysdael, B. Pessac, and G. Calothy.** 1988. Activation and transduction of c-mil sequences in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with avian lymphomatosis virus. J Virol **62:**4627-33.
277. **Marx, M., A. Eychene, D. Laugier, C. Bechade, P. Crisanti, P. Dezelee, B. Pessac, and G. Calothy.** 1988. A novel oncogene related to c-mil is transduced in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with an avian lymphomatosis virus. Embo J **7:**3369-73.
278. **Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, J. M. Jurgensmeier, S. A. Susin, H. L. Vieira, M. C. Prevost, Z. Xie, S. Matsuyama, J. C. Reed, and G. Kroemer.** 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science **281:**2027-31.
279. **Mason, C. S., C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall, and R. Marais.** 1999. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. Embo J **18:**2137-48.
280. **Matheny, S. A., C. Chen, R. L. Kortum, G. L. Razidlo, R. E. Lewis, and M. A. White.** 2004. Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. Nature **427:**256-60.
281. **Mazzucchelli, C., C. Vantaggiato, A. Ciamei, S. Fasano, P. Pakhotin, W. Krezel, H. Welzl, D. P. Wolfer, G. Pages, O. Valverde, A. Marowsky, A. Porrazzo, P. C. Orban, R. Maldonado, M. U. Ehrengruber, V. Cestari, H. P. Lipp, P. F. Chapman, J. Pouyssegur, and R. Brambilla.** 2002. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. Neuron **34:**807-20.
282. **McCubrey, J. A., L. S. Steelman, P. E. Hoyle, W. L. Blalock, C. Weinstein-Oppenheimer, R. A. Franklin, H. Cherwinski, E. Bosch, and M. McMahon.** 1998. Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency,

prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells. Leukemia **12:**1903-29.

283. **McCulloch, J., and D. Dewar.** 2001. A radical approach to stroke therapy. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**10989-91.
284. **McDonald, P. H., C. W. Chow, W. E. Miller, S. A. Laporte, M. E. Field, F. T. Lin, R. J. Davis, and R. J. Lefkowitz.** 2000. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. Science **290:**1574-7.
285. **Meng, X. W., J. Chandra, D. Loegering, K. Van Becelaere, T. J. Kottke, S. D. Gore, J. E. Karp, J. Sebolt-Leopold, and S. H. Kaufmann.** 2003. Central role of Fas-associated death domain protein in apoptosis induction by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 (PD184352) in acute lymphocytic leukemia cells in vitro. J Biol Chem **278:**47326-39.
286. **Mercer, K., S. Giblett, A. Oakden, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard.** 2005. A-Raf and Raf-1 work together to influence transient ERK phosphorylation and Gl/S cell cycle progression. Oncogene **24:**5207-17.
287. **Mercer, K. E., and C. A. Pritchard.** 2003. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Biochim Biophys Acta **1653:**25-40.
288. **Micheau, O., and J. Tschopp.** 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell **114:**181-90.
289. **Miki, T., T. P. Fleming, M. Crescenzi, C. J. Molloy, S. B. Blam, S. H. Reynolds, and S. A. Aaronson.** 1991. Development of a highly efficient expression cDNA cloning system: application to oncogene isolation. Proc Natl Acad Sci U S A **88:**5167-71.
290. **Mikula, M., M. Schreiber, Z. Husak, L. Kucerova, J. Ruth, R. Wieser, K. Zatloukal, H. Beug, E. F. Wagner, and M. Baccarini.** 2001. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. Embo J **20:**1952-62.
291. **Milella, M., Z. Estrov, S. M. Kornblau, B. Z. Carter, M. Konopleva, A. Tari, W. D. Schober, D. Harris, C. E. Leysath, G. Lopez-Berestein, Z. Huang, and M. Andreeff.** 2002. Synergistic induction of apoptosis by simultaneous disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK pathways in acute myelogenous leukemia. Blood **99:**3461-4.
292. **Milella, M., S. M. Kornblau, Z. Estrov, B. Z. Carter, H. Lapillonne, D. Harris, M. Konopleva, S. Zhao, E. Estey, and M. Andreeff.** 2001. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. J Clin Invest **108:**851-9.
293. **Miranda, M. B., K. F. Dyer, J. R. Grandis, and D. E. Johnson.** 2003. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-X(L)and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. Leukemia **17:**390-400.
294. **Mischak, H., T. Seitz, P. Janosch, M. Eulitz, H. Steen, M. Schellerer, A. Philipp, and W. Kolch.** 1996. Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. Mol Cell Biol **16:**5409-18.
295. **Mody, N., D. G. Campbell, N. Morrice, M. Peggie, and P. Cohen.** 2003. An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. Biochem J **372:**567-75.
296. **Mohr, S., T. S. McCormick, and E. G. Lapetina.** 1998. Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensitive to exogenously added nitric oxide donors: dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD 098059. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**5045-50.

297. **Monick, M. M., K. Cameron, J. Staber, L. S. Powers, T. O. Yarovinsky, J. G. Koland, and G. W. Hunninghake.** 2004. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. J Biol Chem.
298. **Mori, T., X. Wang, J. C. Jung, T. Sumii, A. B. Singhal, M. E. Fini, C. E. Dixon, A. Alessandrini, and E. H. Lo.** 2002. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects. J Cereb Blood Flow Metab **22:**444-52.
299. **Motoyama, N., F. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, S. Fujii, and et al.** 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. Science **267:**1506-10.
300. **Muller, J., A. M. Cacace, W. E. Lyons, C. B. McGill, and D. K. Morrison.** 2000. Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling. Mol Cell Biol **20:**5529-39.
301. **Murphy, B. M., E. M. Creagh, and S. J. Martin.** 2004. Interchain proteolysis, in the absence of a dimerization stimulus, can initiate apoptosis-associated caspase-8 activation. J Biol Chem **279:**36916-22.
302. **Murray, B., A. Alessandrini, A. J. Cole, A. G. Yee, and E. J. Furshpan.** 1998. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**11975-80.
303. **Muslin, A. J., J. W. Tanner, P. M. Allen, and A. S. Shaw.** 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. Cell **84:**889-97.
304. **Nabeyrat, E., G. E. Jones, P. S. Fenwick, P. J. Barnes, and L. E. Donnelly.** 2003. Mitogen-activated protein kinases mediate peroxynitrite-induced cell death in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284:**L1112-20.
305. **Namura, S., K. Iihara, S. Takami, I. Nagata, H. Kikuchi, K. Matsushita, M. A. Moskowitz, J. V. Bonventre, and A. Alessandrini.** 2001. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**11569-74.
306. **Nantel, A., M. Huber, and D. Y. Thomas.** 1999. Localization of endogenous Grb10 to the mitochondria and its interaction with the mitochondrial-associated Raf-1 pool. J Biol Chem **274:**35719-24.
307. **Nantel, A., K. Mohammad-Ali, J. Sherk, B. I. Posner, and D. Y. Thomas.** 1998. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. J Biol Chem **273:**10475-84.
308. **Neshat, M. S., A. B. Raitano, H. G. Wang, J. C. Reed, and C. L. Sawyers.** 2000. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. Mol Cell Biol **20:**1179-86.
309. **Nguyen, A., W. R. Burack, J. L. Stock, R. Kortum, O. V. Chaika, M. Afkarian, W. J. Muller, K. M. Murphy, D. K. Morrison, R. E. Lewis, J. McNeish, and A. S. Shaw.** 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. Mol Cell Biol **22:**3035-45.
310. **Nie, Z., B. N. Phenix, J. J. Lum, A. Alam, D. H. Lynch, B. Beckett, P. H. Krammer, R. P. Sekaly, and A. D. Badley.** 2002. HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. Cell Death Differ **9:**1172-84.
311. **Noshita, N., T. Sugawara, T. Hayashi, A. Lewen, G. Omar, and P. H. Chan.** 2002. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing

extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. J Neurosci **22:**7923-30.

312. **Ogier-Denis, E., and P. Codogno.** 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. Biochim Biophys Acta **1603:**113-28.
313. **Ogier-Denis, E., S. Pattingre, J. El Benna, and P. Codogno.** 2000. Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. J Biol Chem **275:**39090-5.
314. **Ohmachi, M., C. E. Rocheleau, D. Church, E. Lambie, T. Schedl, and M. V. Sundaram.** 2002. C. elegans ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. Curr Biol **12:**427-33.
315. **Okazaki, K., and N. Sagata.** 1995. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. Embo J **14:**5048-59.
316. **Olivier, R., I. Otter, L. Monney, M. Wartmann, and C. Borner.** 1997. Bcl-2 does not require Raf kinase activity for its death-protective function. Biochem J **324 (Pt 1):**75-83.
317. **O'Neill, E., L. Rushworth, M. Baccarini, and W. Kolch.** 2004. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. Science **306:**2267-70.
318. **Ozawa, H., S. Shioda, K. Dohi, H. Matsumoto, H. Mizushima, C. J. Zhou, H. Funahashi, Y. Nakai, S. Nakajo, and K. Matsumoto.** 1999. Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. Neurosci Lett **262:**57-60.
319. **Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur.** 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. Science **286:**1374-7.
320. **Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur.** 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A **90:**8319-23.
321. **Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V. M. Dixit.** 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science **277:**815-8.
322. **Pandey, P., A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S. M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E. S. Alnemri, D. Kufe, and S. Kharbanda.** 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. Embo J **19:**4310-22.
323. **Panta, G. R., S. Kaur, L. G. Cavin, M. L. Cortes, F. Mercurio, L. Lothstein, T. W. Sweatman, M. Israel, and M. Arsura.** 2004. ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. Mol Cell Biol **24:**1823-35.
324. **Papin, C., A. Denouel-Galy, D. Laugier, G. Calothy, and A. Eychene.** 1998. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. J Biol Chem **273:**24939-47.
325. **Pardo, O. E., A. Lesay, A. Arcaro, R. Lopes, B. L. Ng, P. H. Warne, I. A. McNeish, T. D. Tetley, N. R. Lemoine, H. Mehmet, M. J. Seckl, and J. Downward.** 2003. Fibroblast growth factor 2-mediated translational control of IAPs blocks mitochondrial release of Smac/DIABLO and apoptosis in small cell lung cancer cells. Mol Cell Biol **23:**7600-10.

326. **Park, J. A., and J. Y. Koh.** 1999. Induction of an immediate early gene egr-1 by zinc through extracellular signal-regulated kinase activation in cortical culture: its role in zinc-induced neuronal death. J Neurochem **73:**450-6.
327. **Patriotis, C., M. G. Russeva, J. H. Lin, S. M. Srinivasula, D. Z. Markova, C. Tsatsanis, A. Makris, E. S. Alnemri, and P. N. Tsichlis.** 2001. Tpl-2 induces apoptosis by promoting the assembly of protein complexes that contain caspase-9, the adapter protein Tvl-1, and procaspase-3. J Cell Physiol **187:**176-87.
328. **Pattingre, S., C. Bauvy, and P. Codogno.** 2003. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. J Biol Chem **278:**16667-74.
329. **Payne, D. M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). Embo J **10:**885-92.
330. **Pearson, G., R. Bumeister, D. O. Henry, M. H. Cobb, and M. A. White.** 2000. Uncoupling Raf1 from MEK1/2 impairs only a subset of cellular responses to Raf activation. J Biol Chem **275:**37303-6.
331. **Pei, J. J., H. Braak, W. L. An, B. Winblad, R. F. Cowburn, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal.** 2002. Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res **109:**45-55.
332. **Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan.** 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. Nat Rev Cancer **2:**764-76.
333. **Pereira, D. B., A. P. Carvalho, and C. B. Duarte.** 2002. Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. Neuropharmacology **42:**9-19.
334. **Perez-Rodriguez, R., J. C. Chambard, E. Van Obberghen-Schilling, A. Franchi, and J. Pouyssegur.** 1981. Emergence of hamster fibroblast tumors in nude mice--evidence for in vivo selection leading to loss of growth factor requirement. J Cell Physiol **109:**387-96.
335. **Persons, D. L., E. M. Yazlovitskaya, and J. C. Pelling.** 2000. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. J Biol Chem **275:**35778-85.
336. **Peruzzi, F., M. Prisco, A. Morrione, B. Valentinis, and R. Baserga.** 2001. Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4. J Biol Chem **276:**25990-6.
337. **Peter, M. E.** 2004. The flip side of FLIP. Biochem J **382:**e1-3.
338. **Peter, M. E., and P. H. Krammer.** 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ **10:**26-35.
339. **Pettiford, S. M., and R. Herbst.** 2000. The MAP-kinase ERK2 is a specific substrate of the protein tyrosine phosphatase HePTP. Oncogene **19:**858-69.
340. **Peyssonnaux, C., and A. Eychene.** 2001. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. Biol Cell **93:**53-62.
341. **Pi, X., C. Yan, and B. C. Berk.** 2004. Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis. Circ Res **94:**362-9.
342. **Plas, D. R., and C. B. Thompson.** 2002. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. Trends Endocrinol Metab **13:**75-8.
343. **Plowman, S. J., D. J. Williamson, M. J. O'Sullivan, J. Doig, A. M. Ritchie, D. J. Harrison, D. W. Melton, M. J. Arends, M. L. Hooper, and C. E. Patek.** 2003.

While K-ras is essential for mouse development, expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable. Mol Cell Biol **23:**9245-50.

344. **Pommier, Y., O. Sordet, S. Antony, R. L. Hayward, and K. W. Kohn.** 2004. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. Oncogene **23:**2934-49.
345. **Porras, A., K. Muszynski, U. R. Rapp, and E. Santos.** 1994. Dissociation between activation of Raf-1 kinase and the 42-kDa mitogen-activated protein kinase/90-kDa S6 kinase (MAPK/RSK) cascade in the insulin/Ras pathway of adipocytic differentiation of 3T3 L1 cells. J Biol Chem **269:**12741-8.
346. **Posada, J., and J. A. Cooper.** 1992. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in Xenopus oocytes. Science **255:**212-5.
347. **Pouyssegur, J., V. Volmat, and P. Lenormand.** 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. Biochem Pharmacol **64:**755-63.
348. **Pritchard, C. A., L. Bolin, R. Slattery, R. Murray, and M. McMahon.** 1996. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. Curr Biol **6:**614-7.
349. **Pritchard, C. A., L. Hayes, L. Wojnowski, A. Zimmer, R. M. Marais, and J. C. Norman.** 2004. B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. Mol Cell Biol **24:**5937-52.
350. **Pritchard, C. A., M. L. Samuels, E. Bosch, and M. McMahon.** 1995. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. Mol Cell Biol **15:**6430-42.
351. **Puri, P. L., Z. Wu, P. Zhang, L. D. Wood, K. S. Bhakta, J. Han, J. R. Feramisco, M. Karin, and J. Y. Wang.** 2000. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. Genes Dev **14:**574-84.
352. **Qiu, X. B., and A. L. Goldberg.** 2005. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. J Biol Chem **280:**174-82.
353. **Rajpal, A., Y. A. Cho, B. Yelent, P. H. Koza-Taylor, D. Li, E. Chen, M. Whang, C. Kang, T. G. Turi, and A. Winoto.** 2003. Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. Embo J **22:**6526-36.
354. **Rapoport, M., and A. Ferreira.** 2000. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. J Neurochem **74:**125-33.
355. **Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, Jr., and J. R. Stephenson.** 1983. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. Proc Natl Acad Sci U S A **80:**4218-22.
356. **Raught, B., and A. C. Gingras.** 1999. eIF4E activity is regulated at multiple levels. Int J Biochem Cell Biol **31:**43-57.
357. **Ravi, R. K., A. Thiagalingam, E. Weber, M. McMahon, B. D. Nelkin, and M. Mabry.** 1999. Raf-1 causes growth suppression and alteration of neuroendocrine markers in DMS53 human small-cell lung cancer cells. Am J Respir Cell Mol Biol **20:**543-9.
358. **Ravi, R. K., E. Weber, M. McMahon, J. R. Williams, S. Baylin, A. Mal, M. L. Harter, L. E. Dillehay, P. P. Claudio, A. Giordano, B. D. Nelkin, and M. Mabry.** 1998. Activated Raf-1 causes growth arrest in human small cell lung cancer cells. J Clin Invest **101:**153-9.

359. **Ray, L. B., and T. W. Sturgill.** 1987. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A **84:**1502-6.
360. **Reddy, K. B., S. M. Nabha, and N. Atanaskova.** 2003. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. Cancer Metastasis Rev **22:**395-403.
361. **Regan, C. P., W. Li, D. M. Boucher, S. Spatz, M. S. Su, and K. Kuida.** 2002. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**9248-53.
362. **Regan, R. F., Y. Wang, X. Ma, A. Chong, and Y. Guo.** 2001. Activation of extracellular signal-regulated kinases potentiates hemin toxicity in astrocyte cultures. J Neurochem **79:**545-55.
363. **Richards, J. D., S. H. Dave, C. H. Chou, A. A. Mamchak, and A. L. DeFranco.** 2001. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen. J Immunol **166:**3855-64.
364. **Riedl, S. J., and Y. Shi.** 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol **5:**897-907.
365. **Robbins, D. J., E. Zhen, H. Owaki, C. A. Vanderbilt, D. Ebert, T. D. Geppert, and M. H. Cobb.** 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. J Biol Chem **268:**5097-106.
366. **Rodriguez, J., and Y. Lazebnik.** 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev **13:**3179-84.
367. **Rommel, C., B. A. Clarke, S. Zimmermann, L. Nunez, R. Rossman, K. Reid, K. Moelling, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass.** 1999. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. Science **286:**1738-41.
368. **Roper, E., W. Weinberg, F. M. Watt, and H. Land.** 2001. p19ARF-independent induction of p53 and cell cycle arrest by Raf in murine keratinocytes. EMBO Rep **2:**145-50.
369. **Roth, S., A. R. Shaikh, M. M. Hennelly, Q. Li, V. Bindokas, and C. E. Graham.** 2003. Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. Invest Ophthalmol Vis Sci **44:**5383-95.
370. **Rul, W., O. Zugasti, P. Roux, C. Peyssonnaux, A. Eychene, T. F. Franke, P. Lenormand, P. Fort, and U. Hibner.** 2002. Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. Ann N Y Acad Sci **973:**145-8.
371. **Russo, C., V. Dolcini, S. Salis, V. Venezia, N. Zambrano, T. Russo, and G. Schettini.** 2002. Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. J Biol Chem **277:**35282-8.
372. **Rytomaa, M., K. Lehmann, and J. Downward.** 2000. Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. Oncogene **19:**4461-8.
373. **Saba-El-Leil, M. K., F. D. Vella, B. Vernay, L. Voisin, L. Chen, N. Labrecque, S. L. Ang, and S. Meloche.** 2003. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. EMBO Rep **4:**964-8.
374. **Sabapathy, K., W. Jochum, K. Hochedlinger, L. Chang, M. Karin, and E. F. Wagner.** 1999. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. Mech Dev **89:**115-24.
375. **Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gurp, G. van Loo, and P. Vandenabeele.** 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene **23:**2861-74.

376. **Saleh, A., S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins, and E. S. Alnemri.** 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. Nat Cell Biol **2:**476-83.
377. **Salmeen, A., J. N. Andersen, M. P. Myers, T. C. Meng, J. A. Hinks, N. K. Tonks, and D. Barford.** 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. Nature **423:**769-73.
378. **Salomoni, P., M. A. Wasik, R. F. Riedel, K. Reiss, J. K. Choi, T. Skorski, and B. Calabretta.** 1998. Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/ABL mutant. J Exp Med **187:**1995-2007.
379. **Samuels, M. L., M. J. Weber, J. M. Bishop, and M. McMahon.** 1993. Conditional transformation of cells and rapid activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by an estradiol-dependent human raf-1 protein kinase. Mol Cell Biol **13:**6241-52.
380. **Sanchez, I., C. J. Xu, P. Juo, A. Kakizaka, J. Blenis, and J. Yuan.** 1999. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. Neuron **22:**623-33.
381. **Sano, H., X. Zhu, A. Sano, E. E. Boetticher, T. Shioya, B. Jacobs, N. M. Munoz, and A. R. Leff.** 2001. Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 is essential for human eosinophil adhesion to fibronectin. J Immunol **166:**3515-21.
382. **Sarker, M., C. Ruiz-Ruiz, G. Robledo, and A. Lopez-Rivas.** 2002. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. Oncogene **21:**4323-7.
383. **Sasaki, K., and K. Chiba.** 2001. Fertilization blocks apoptosis of starfish eggs by inactivation of the MAP kinase pathway. Dev Biol **237:**18-28.
384. **Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo J **17:**1675-87.
385. **Schaeffer, H. J., A. D. Catling, S. T. Eblen, L. S. Collier, A. Krauss, and M. J. Weber.** 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. Science **281:**1668-71.
386. **Schrantz, N., M. F. Bourgeade, S. Mouhamad, G. Leca, S. Sharma, and A. Vazquez.** 2001. p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41. Mol Biol Cell **12:**3139-51.
387. **Schubert, K. M., and V. Duronio.** 2001. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. Biochem J **356:**473-80.
388. **Schulze, A., K. Lehmann, H. B. Jefferies, M. McMahon, and J. Downward.** 2001. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. Genes Dev **15:**981-94.
389. **Schulze, A., B. Nicke, P. H. Warne, S. Tomlinson, and J. Downward.** 2004. The transcriptional response to raf activation is almost completely dependent on mitogen-activated protein kinase kinase activity and shows a major autocrine component. Mol Biol Cell **15:**3450-63.
390. **Screaton, R. A., S. Kiessling, O. J. Sansom, C. B. Millar, K. Maddison, A. Bird, A. R. Clarke, and S. M. Frisch.** 2003. Fas-associated death domain protein interacts

with methyl-CpG binding domain protein 4: a potential link between genome surveillance and apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **100:**5211-6.

391. **Sebolt-Leopold, J. S., D. T. Dudley, R. Herrera, K. Van Becelaere, A. Wiland, R. C. Gowan, H. Tecle, S. D. Barrett, A. Bridges, S. Przybranowski, W. R. Leopold, and A. R. Saltiel.** 1999. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. Nat Med **5:**810-6.
392. **Sebolt-Leopold, J. S., and R. Herrera.** 2004. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. Nat Rev Cancer **4:**937-47.
393. **Seo, S. R., S. A. Chong, S. I. Lee, J. Y. Sung, Y. S. Ahn, K. C. Chung, and J. T. Seo.** 2001. Zn2+-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. J Neurochem **78:**600-10.
394. **Sewing, A., B. Wiseman, A. C. Lloyd, and H. Land.** 1997. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. Mol Cell Biol **17:**5588-97.
395. **Shakibaei, M., G. Schulze-Tanzil, P. de Souza, T. John, M. Rahmanzadeh, R. Rahmanzadeh, and H. J. Merker.** 2001. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. J Biol Chem **276:**13289-94.
396. **Shaw, G., S. Morse, M. Ararat, and F. L. Graham.** 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. Faseb J **16:**869-71.
397. **She, Q. B., N. Chen, and Z. Dong.** 2000. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. J Biol Chem **275:**20444-9.
398. **She, Q. B., W. Y. Ma, S. Zhong, and Z. Dong.** 2002. Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 is involved in serine 112 phosphorylation of Bad by ultraviolet B radiation. J Biol Chem **277:**24039-48.
399. **Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi.** 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science **277:**818-21.
400. **Shieh, S. Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives.** 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell **91:**325-34.
401. **Shimamura, A., B. A. Ballif, S. A. Richards, and J. Blenis.** 2000. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. Curr Biol **10:**127-35.
402. **Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto.** 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature **399:**483-7.
403. **Shipp, M. A., K. N. Ross, P. Tamayo, A. P. Weng, J. L. Kutok, R. C. Aguiar, M. Gaasenbeek, M. Angelo, M. Reich, G. S. Pinkus, T. S. Ray, M. A. Koval, K. W. Last, A. Norton, T. A. Lister, J. Mesirov, D. S. Neuberg, E. S. Lander, J. C. Aster, and T. R. Golub.** 2002. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. Nat Med **8:**68-74.
404. **Sieburth, D. S., Q. Sun, and M. Han.** 1998. SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in C. elegans. Cell **94:**119-30.
405. **Sieburth, D. S., M. Sundaram, R. M. Howard, and M. Han.** 1999. A PP2A regulatory subunit positively regulates Ras-mediated signaling during Caenorhabditis elegans vulval induction. Genes Dev **13:**2562-9.
406. **Sinha, D., S. Bannergee, J. H. Schwartz, W. Lieberthal, and J. S. Levine.** 2004. Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis. J Biol Chem **279:**10962-72.

407. **Slack, D. N., O. M. Seternes, M. Gabrielsen, and S. M. Keyse.** 2001. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. J Biol Chem **276:**16491-500.
408. **Slack-Davis, J. K., S. T. Eblen, M. Zecevic, S. A. Boerner, A. Tarcsafalvi, H. B. Diaz, M. S. Marshall, M. J. Weber, J. T. Parsons, and A. D. Catling.** 2003. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. J Cell Biol **162:**281-91.
409. **Slagsvold, H. H., A. C. Ostvold, A. B. Fallgren, and R. E. Paulsen.** 2002. Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. Biochem Biophys Res Commun **291:**1146-50.
410. **Slee, E. A., D. J. O'Connor, and X. Lu.** 2004. To die or not to die: how does p53 decide? Oncogene **23:**2809-18.
411. **Soderstrom, T. S., M. Poukkula, T. H. Holmstrom, K. M. Heiskanen, and J. E. Eriksson.** 2002. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. J Immunol **169:**2851-60.
412. **Sohn, D., K. Schulze-Osthoff, and R. U. Janicke.** 2005. Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis. J Biol Chem **280:**5267-73.
413. **Sohn, S. J., B. K. Sarvis, D. Cado, and A. Winoto.** 2002. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. J Biol Chem **277:**43344-51.
414. **Sperandio, S., I. de Belle, and D. E. Bredesen.** 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**14376-81.
415. **Sperandio, S., K. Poksay, I. de Belle, M. J. Lafuente, B. Liu, J. Nasir, and D. E. Bredesen.** 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. Cell Death Differ **11:**1066-75.
416. **Srikanth, S., C. C. Franklin, R. C. Duke, and R. S. Kraft.** 1999. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. Mol Cell Biochem **199:**169-78.
417. **Srinivasula, S. M., M. Ahmad, M. MacFarlane, Z. Luo, Z. Huang, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri.** 1998. Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. J Biol Chem **273:**10107-11.
418. **Srinivasula, S. M., T. Fernandes-Alnemri, J. Zangrilli, N. Robertson, R. C. Armstrong, L. Wang, J. A. Trapani, K. J. Tomaselli, G. Litwack, and E. S. Alnemri.** 1996. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. J Biol Chem **271:**27099-106.
419. **Stanciu, M., and D. B. DeFranco.** 2002. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated protein kinase promotes cell death generated by oxidative toxicity or proteasome inhibition in a neuronal cell line. J Biol Chem **277:**4010-7.
420. **Stanciu, M., Y. Wang, R. Kentor, N. Burke, S. Watkins, G. Kress, I. Reynolds, E. Klann, M. R. Angiolieri, J. W. Johnson, and D. B. DeFranco.** 2000. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. J Biol Chem **275:**12200-6.
421. **Stefanelli, C., B. Tantini, M. Fattori, I. Stanic, C. Pignatti, C. Clo, C. Guarnieri, C. M. Caldarera, C. A. Mackintosh, A. E. Pegg, and F. Flamigni.** 2002. Caspase

activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion. FEBS Lett **527:**223-28.

422. **Stewart, S., M. Sundaram, Y. Zhang, J. Lee, M. Han, and K. L. Guan.** 1999. Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. Mol Cell Biol **19:**5523-34.
423. **Stocco, C. O., L. F. Lau, and G. Gibori.** 2002. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. J Biol Chem **277:**3293-302.
424. **Stupack, D. G., and D. A. Cheresh.** 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. J Cell Sci **115:**3729-38.
425. **Subramaniam, S., J. Strelau, and K. Unsicker.** 2003. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. J Biol Chem **278:**8904-12.
426. **Subramaniam, S., U. Zirrgiebel, O. von Bohlen Und Halbach, J. Strelau, C. Laliberte, D. R. Kaplan, and K. Unsicker.** 2004. ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. J Cell Biol **165:**357-69.
427. **Sundaram, M., and M. Han.** 1995. The C. elegans ksr-1 gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. Cell **83:**889-901.
428. **Sur, R., and J. W. Ramos.** 2005. Vanishin is a novel ubiquitinylated death-effector domain protein that blocks ERK activation. Biochem J **387:**315-24.
429. **Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer.** 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature **397:**441-6.
430. **Suzaki, Y., M. Yoshizumi, S. Kagami, A. H. Koyama, Y. Taketani, H. Houchi, K. Tsuchiya, E. Takeda, and T. Tamaki.** 2002. Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. J Biol Chem **277:**9614-21.
431. **Sweatt, J. D.** 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. Curr Opin Neurobiol **14:**311-7.
432. **Syrbu, S. I., W. H. Waterman, T. F. Molski, D. Nagarkatti, J. J. Hajjar, and R. I. Sha'afi.** 1999. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. J Immunol **162:**2334-40.
433. **Tachibana, K., T. Machida, Y. Nomura, and T. Kishimoto.** 1997. MAP kinase links the fertilization signal transduction pathway to the G1/S-phase transition in starfish eggs. Embo J **16:**4333-9.
434. **Takayama, S., T. Sato, S. Krajewski, K. Kochel, S. Irie, J. A. Millan, and J. C. Reed.** 1995. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. Cell **80:**279-84.
435. **Takeda, K., A. Matsuzawa, H. Nishitoh, and H. Ichijo.** 2003. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. Cell Struct Funct **28:**23-9.
436. **Tanaka, Y., S. Nakayamada, H. Fujimoto, Y. Okada, H. Umehara, T. Kataoka, and Y. Minami.** 2002. H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. J Biol Chem **277:**21446-52.

437. **Tang, D., D. Wu, A. Hirao, J. M. Lahti, L. Liu, B. Mazza, V. J. Kidd, T. W. Mak, and A. J. Ingram.** 2002. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. J Biol Chem **277:**12710-7.
438. **Tang, Y., J. Yu, and J. Field.** 1999. Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. Mol Cell Biol **19:**1881-91.
439. **Tarrega, C., C. Blanco-Aparicio, J. J. Munoz, and R. Pulido.** 2002. Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP. J Biol Chem **277:**2629-36.
440. **Tashker, J. S., M. Olson, and S. Kornbluth.** 2002. Post-cytochrome C protection from apoptosis conferred by a MAPK pathway in Xenopus egg extracts. Mol Biol Cell **13:**393-401.
441. **Taupin, D., and D. K. Podolsky.** 1999. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. Gastroenterology **116:**1072-80.
442. **Teis, D., W. Wunderlich, and L. A. Huber.** 2002. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. Dev Cell **3:**803-14.
443. **Thannickal, V. J., and B. L. Fanburg.** 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279:**L1005-28.
444. **Therrien, M., H. C. Chang, N. M. Solomon, F. D. Karim, D. A. Wassarman, and G. M. Rubin.** 1995. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. Cell **83:**879-88.
445. **Therrien, M., N. R. Michaud, G. M. Rubin, and D. K. Morrison.** 1996. KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. Genes Dev **10:**2684-95.
446. **Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinl, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter, and J. Tschopp.** 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature **386:**517-21.
447. **Thorburn, A.** 2004. Death receptor-induced cell killing. Cell Signal **16:**139-44.
448. **Thorson, J. A., L. W. Yu, A. L. Hsu, N. Y. Shih, P. R. Graves, J. W. Tanner, P. M. Allen, H. Piwnica-Worms, and A. S. Shaw.** 1998. 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. Mol Cell Biol **18:**5229-38.
449. **Thyss, R., V. Virolle, V. Imbert, J. F. Peyron, D. Aberdam, and T. Virolle.** 2005. NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. Embo J **24:**128-37.
450. **Tolwinski, N. S., P. S. Shapiro, S. Goueli, and N. G. Ahn.** 1999. Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK. J Biol Chem **274:**6168-74.
451. **Tran, S. E., T. H. Holmstrom, M. Ahonen, V. M. Kahari, and J. E. Eriksson.** 2001. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. J Biol Chem **276:**16484-90.
452. **Trivier, E., D. De Cesare, S. Jacquot, S. Pannetier, E. Zackai, I. Young, J. L. Mandel, P. Sassone-Corsi, and A. Hanauer.** 1996. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. Nature **384:**567-70.
453. **Turner, P. F., and R. L. Margolis.** 1984. Taxol-induced bundling of brain-derived microtubules. J Cell Biol **99:**940-6.
454. **Twiddy, D., D. G. Brown, C. Adrain, R. Jukes, S. J. Martin, G. M. Cohen, M. MacFarlane, and K. Cain.** 2004. Pro-apoptotic proteins released from the

mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. J Biol Chem **279:**19665-82.
455. **Tzivion, G., Z. Luo, and J. Avruch.** 1998. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. Nature **394:**88-92.
456. **Ulisse, S., B. Cinque, G. Silvano, N. Rucci, L. Biordi, M. G. Cifone, and M. D'Armiento.** 2000. Erk-dependent cytosolic phospholipase A2 activity is induced by CD95 ligand cross-linking in the mouse derived Sertoli cell line TM4 and is required to trigger apoptosis in CD95 bearing cells. Cell Death Differ **7:**916-24.
457. **Umanoff, H., W. Edelmann, A. Pellicer, and R. Kucherlapati.** 1995. The murine N-ras gene is not essential for growth and development. Proc Natl Acad Sci U S A **92:**1709-13.
458. **van den Brink, M. R., R. Kapeller, J. C. Pratt, J. H. Chang, and S. J. Burakoff.** 1999. The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. J Biol Chem **274:**11178-85.
459. **van Loo, G., X. Saelens, M. van Gurp, M. MacFarlane, S. J. Martin, and P. Vandenabeele.** 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. Cell Death Differ **9:**1031-42.
460. **van Montfort, R. L., M. Congreve, D. Tisi, R. Carr, and H. Jhoti.** 2003. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. Nature **423:**773-7.
461. **Varghese, J., N. S. Khandre, and A. Sarin.** 2003. Caspase-3 activation is an early event and initiates apoptotic damage in a human leukemia cell line. Apoptosis **8:**363-70.
462. **Varghese, J., H. Sade, P. Vandenabeele, and A. Sarin.** 2002. Head involution defective (Hid)-triggered apoptosis requires caspase-8 but not FADD (Fas-associated death domain) and is regulated by Erk in mammalian cells. J Biol Chem **277:**35097-104.
463. **Vercammen, D., G. Brouckaert, G. Denecker, M. Van de Craen, W. Declercq, W. Fiers, and P. Vandenabeele.** 1998. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. J Exp Med **188:**919-30.
464. **Vial, E., and C. J. Marshall.** 2003. Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. J Cell Sci **116:**4957-63.
465. **Voice, J. K., R. L. Klemke, A. Le, and J. H. Jackson.** 1999. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. J Biol Chem **274:**17164-70.
466. **Volmat, V., and J. Pouyssegur.** 2001. Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. Biol Cell **93:**71-9.
467. **Vomastek, T., H. J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, M. E. Smolkin, E. A. Bissonette, and M. J. Weber.** 2004. Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. Proc Natl Acad Sci U S A **101:**6981-6.
468. **Wajant, H.** 2003. Death receptors. Essays Biochem **39:**53-71.
469. **Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford, and R. Marais.** 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell **116:**855-67.
470. **Wang, H. G., U. R. Rapp, and J. C. Reed.** 1996. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. Cell **87:**629-38.

471. **Wang, H. G., S. Takayama, U. R. Rapp, and J. C. Reed.** 1996. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. Proc Natl Acad Sci U S A **93:**7063-8.
472. **Wang, H. Y., Z. Cheng, and C. C. Malbon.** 2003. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. Cancer Lett **191:**229-37.
473. **Wang, W., C. Z. Prince, Y. Mou, and M. J. Pollman.** 2002. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. J Biol Chem **277:**21723-9.
474. **Wang, X., J. L. Martindale, and N. J. Holbrook.** 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem **275:**39435-43.
475. **Wang, X., C. Zhu, L. Qiu, H. Hagberg, M. Sandberg, and K. Blomgren.** 2003. Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. J Neurochem **86:**351-62.
476. **Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer.** 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science **292:**727-30.
477. **Weinstein-Oppenheimer, C. R., W. L. Blalock, L. S. Steelman, F. Chang, and J. A. McCubrey.** 2000. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. Pharmacol Ther **88:**229-79.
478. **Weissinger, E. M., G. Eissner, C. Grammer, S. Fackler, B. Haefner, L. S. Yoon, K. S. Lu, A. Bazarov, J. M. Sedivy, H. Mischak, and W. Kolch.** 1997. Inhibition of the Raf-1 kinase by cyclic AMP agonists causes apoptosis of v-abl-transformed cells. Mol Cell Biol **17:**3229-41.
479. **Weston, C. R., K. Balmanno, C. Chalmers, K. Hadfield, S. A. Molton, R. Ley, E. F. Wagner, and S. J. Cook.** 2003. Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. Oncogene **22:**1281-93.
480. **Whitehurst, A. W., J. L. Wilsbacher, Y. You, K. Luby-Phelps, M. S. Moore, and M. H. Cobb.** 2002. ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**7496-501.
481. **Widmann, C., S. Gibson, and G. L. Johnson.** 1998. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem **273:**7141-7.
482. **Wiese, S., G. Pei, C. Karch, J. Troppmair, B. Holtmann, U. R. Rapp, and M. Sendtner.** 2001. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. Nat Neurosci **4:**137-42.
483. **Winoto, A., and D. R. Littman.** 2002. Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. Cell **109 Suppl:**S57-66.
484. **Woessmann, W., X. Chen, and A. Borkhardt.** 2002. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. Cancer Chemother Pharmacol **50:**397-404.
485. **Wojnowski, L., L. F. Stancato, A. C. Larner, U. R. Rapp, and A. Zimmer.** 2000. Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. Mech Dev **91:**97-104.
486. **Wojnowski, L., L. F. Stancato, A. M. Zimmer, H. Hahn, T. W. Beck, A. C. Larner, U. R. Rapp, and A. Zimmer.** 1998. Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. Mech Dev **76:**141-9.

487. **Wojnowski, L., A. M. Zimmer, T. W. Beck, H. Hahn, R. Bernal, U. R. Rapp, and A. Zimmer.** 1997. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. Nat Genet **16:**293-7.
488. **Woods, D., D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees, and M. McMahon.** 1997. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. Mol Cell Biol **17:**5598-611.
489. **Wrzesien-Kus, A., P. Smolewski, A. Sobczak-Pluta, A. Wierzbowska, and T. Robak.** 2004. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. Apoptosis **9:**705-15.
490. **Wu, J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science **262:**1065-9.
491. **Wu, W., T. Pew, M. Zou, D. Pang, and S. D. Conzen.** 2005. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. J Biol Chem **280:**4117-24.
492. **Wunderlich, W., I. Fialka, D. Teis, A. Alpi, A. Pfeifer, R. G. Parton, F. Lottspeich, and L. A. Huber.** 2001. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. J Cell Biol **152:**765-76.
493. **Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg.** 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science **270:**1326-31.
494. **Xia, Z., H. Dudek, C. K. Miranti, and M. E. Greenberg.** 1996. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. J Neurosci **16:**5425-36.
495. **Xiao, D., and S. V. Singh.** 2002. Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in p53-deficient PC-3 human prostate cancer cell line is mediated by extracellular signal-regulated kinases. Cancer Res **62:**3615-9.
496. **Xiao, S., A. Marshak-Rothstein, and S. T. Ju.** 2001. Sp1 is the major fasl gene activator in abnormal CD4(-)CD8(-)B220(+) T cells of lpr and gld mice. Eur J Immunol **31:**3339-48.
497. **Xie, Z., M. Wei, T. E. Morgan, P. Fabrizio, D. Han, C. E. Finch, and V. D. Longo.** 2002. Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. J Neurosci **22:**3484-92.
498. **Xing, H., K. Kornfeld, and A. J. Muslin.** 1997. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. Curr Biol **7:**294-300.
499. **Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and L. C. Cantley.** 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. Cell **91:**961-71.
500. **Yamaguchi, O., T. Watanabe, K. Nishida, K. Kashiwase, Y. Higuchi, T. Takeda, S. Hikoso, S. Hirotani, M. Asahi, M. Taniike, A. Nakai, I. Tsujimoto, Y. Matsumura, J. Miyazaki, K. R. Chien, A. Matsuzawa, C. Sadamitsu, H. Ichijo, M. Baccarini, M. Hori, and K. Otsu.** 2004. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. J Clin Invest **114:**937-43.
501. **Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, and J. F. Hancock.** 1998. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. J Biol Chem **273:**24052-6.
502. **Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature **389:**865-70.

503. **Yao, Y., W. Li, J. Wu, U. A. Germann, M. S. Su, K. Kuida, and D. M. Boucher.** 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A **100:**12759-64.
504. **Yeh, J. H., S. C. Hsu, S. H. Han, and M. Z. Lai.** 1998. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. J Exp Med **188:**1795-802.
505. **Yeh, P. Y., S. E. Chuang, K. H. Yeh, Y. C. Song, L. L. Chang, and A. L. Cheng.** 2004. Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. Oncogene **23:**3580-8.
506. **Yeung, K., P. Janosch, B. McFerran, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, and W. Kolch.** 2000. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. Mol Cell Biol **20:**3079-85.
507. **Yip-Schneider, M. T., A. Lin, and M. S. Marshall.** 2001. Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. Biochem Biophys Res Commun **280:**992-7.
508. **Yochem, J., M. Sundaram, and M. Han.** 1997. Ras is required for a limited number of cell fates and not for general proliferation in Caenorhabditis elegans. Mol Cell Biol **17:**2716-22.
509. **York, R. D., H. Yao, T. Dillon, C. L. Ellig, S. P. Eckert, E. W. McCleskey, and P. J. Stork.** 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. Nature **392:**622-6.
510. **Yu, C., G. Krystal, L. Varticovksi, R. McKinstry, M. Rahmani, P. Dent, and S. Grant.** 2002. Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. Cancer Res **62:**188-99.
511. **Yu, C., M. Rahmani, J. Almenara, E. A. Sausville, P. Dent, and S. Grant.** 2004. Induction of apoptosis in human leukemia cells by the tyrosine kinase inhibitor adaphostin proceeds through a RAF-1/MEK/ERK- and AKT-dependent process. Oncogene **23:**1364-76.
512. **Yung, H. W., A. Wyttenbach, and A. M. Tolkovsky.** 2004. Aggravation of necrotic death of glucose-deprived cells by the MEK1 inhibitors U0126 and PD184161 through depletion of ATP. Biochem Pharmacol **68:**351-60.
513. **Yung, Y., Z. Yao, T. Hanoch, and R. Seger.** 2000. ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. J Biol Chem **275:**15799-808.
514. **Yuryev, A., M. Ono, S. A. Goff, F. Macaluso, and L. P. Wennogle.** 2000. Isoform-specific localization of A-RAF in mitochondria. Mol Cell Biol **20:**4870-8.
515. **Zarubin, T., and J. Han.** 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res **15:**11-8.
516. **Zhang, B. H., E. D. Tang, T. Zhu, M. E. Greenberg, A. B. Vojtek, and K. L. Guan.** 2001. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. J Biol Chem **276:**31620-6.
517. **Zhang, P., Y. Z. Wang, E. Kagan, and J. C. Bonner.** 2000. Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. J Biol Chem **275:**22479-86.
518. **Zhang, X., P. Shan, M. Sasidhar, G. L. Chupp, R. A. Flavell, A. M. Choi, and P. J. Lee.** 2003. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol **28:**305-15.

519. **Zhang, X. D., J. M. Borrow, X. Y. Zhang, T. Nguyen, and P. Hersey.** 2003. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. Oncogene **22:**2869-81.
520. **Zheng, C. F., and K. L. Guan.** 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. Embo J **13:**1123-31.
521. **Zheng, C. F., and K. L. Guan.** 1993. Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. J Biol Chem **268:**23933-9.
522. **Zhong, J., J. Troppmair, and U. R. Rapp.** 2001. Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria. Oncogene **20:**4807-16.
523. **Zhong, S. P., W. Y. Ma, and Z. Dong.** 2000. ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. J Biol Chem **275:**20980-4.
524. **Zhou, B. B., and S. J. Elledge.** 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature **408:**433-9.
525. **Zhu, J., D. Woods, M. McMahon, and J. M. Bishop.** 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. Genes Dev **12:**2997-3007.
526. **Zhu, J. H., S. M. Kulich, T. D. Oury, and C. T. Chu.** 2002. Cytoplasmic aggregates of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases in Lewy body diseases. Am J Pathol **161:**2087-98.
527. **Zhu, L., X. Yu, Y. Akatsuka, J. A. Cooper, and C. Anasetti.** 1999. Role of mitogen-activated protein kinases in activation-induced apoptosis of T cells. Immunology **97:**26-35.
528. **Zhu, X., Z. Sun, H. G. Lee, S. L. Siedlak, G. Perry, and M. A. Smith.** 2003. Distribution, levels, and activation of MEK1 in Alzheimer's disease. J Neurochem **86:**136-42.
529. **Zimmermann, S., and K. Moelling.** 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science **286:**1741-4.
530. **Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang.** 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem **274:**11549-56.
531. **Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S. W. Fesik, J. C. Wu, K. J. Tomaselli, and R. C. Armstrong.** 2003. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. J Biol Chem **278:**8091-8.
532. **Zugasti, O., W. Rul, P. Roux, C. Peyssonnaux, A. Eychene, T. F. Franke, P. Fort, and U. Hibner.** 2001. Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. Mol Cell Biol **21:**6706-17.