

## Le rôle essentiel de MEK1 lors de l'angiogenèse placentaire

Les signaux induits par les facteurs de croissance et les molécules d'adhérence sont transmis au noyau par des relais intracellulaires dont le principal est constitué d'une cascade de protéine-kinases nommée « voie de signalisation des MAP-kinases » (*mitogen activated protein*) [1, 2]. On distingue trois voies de signalisation faisant intervenir les MAP-kinases: la voie impliquant les Jun kinases, celle de la p38 kinase, et celle qui aboutit à la phosphorylation des kinases ERK (*extracellular regulated kinase*) par une MAP kinase kinase, nommée MEK (*mitogen extracellular signal kinase*), située en aval de Raf et de Ras [2]. Ces cascades de kinases contrôlent de multiples processus de prolifération et de différenciation, dont l'angiogenèse. Ainsi la MAP kinase kinase B-raf joue un rôle critique dans la survie des cellules endothéliales au début du développement embryonnaire [3]. En aval, les MAP kinase kinases transmettent les signaux induits d'une part par l'intégrine  $\alpha\beta 3$  [4, 5], essentielle au processus d'angiogenèse, et d'autre part par les cytokines FGF (*fibroblast growth factor*) basique et VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [6-9]. Le blocage de MEK par un antagoniste pharmacologique bloque la formation de nouveaux vaisseaux, et la migration des cellules induite par le FGF, mais ne bloque pas l'adhérence cellulaire à un substrat [1].

Chez les mammifères, deux kinases MEK, 1 et 2, participent à la cascade ERK/MAP, alors que chez le nématode, la drosophile et le xénope, une seule kinase MEK remplit ce rôle. Jusqu'à tout récemment, on ignorait en quoi la fonction de MEK1 se distinguait de celle de MEK2. Chez la souris, la protéine MEK1 présente

plus d'homologie avec la protéine MEK du xénope, par exemple, qu'avec la protéine MEK2 de souris, suggérant que chez les mammifères, MEK2 a divergé de MEK1 pour acquérir une fonction particulière. Plusieurs observations corroborent cette hypothèse en montrant que les fonctions de MEK1 et MEK2 peuvent être dissociées: le traitement de cellules Swiss 3T3 par le neuropeptide bombésine active MEK1 et non MEK2; inversement, dans les cellules musculaires lisses de l'aorte humaine, le lactosylcéramide n'active que MEK2 [1, 10, 11]. Dans les cellules HeLa, les membres de la famille Raf stimulés par l'EGF (*epidermal growth factor*) activent différemment MEK1 et MEK2 [12]. Il est donc probable que la transduction de signaux spécifiques utilise des isoformes distinctes des protéines de la cascade des kinases ERK/MAP [13].

Nous avons récemment produit dans nos laboratoires, par mutagenèse d'insertion à l'aide du vecteur rétroviral ROSA $\beta$ -geo, des souris mutantes pour *mek1* [14]. Cette mutation nulle résulte en une létalité embryonnaire vers le 10,5<sup>e</sup> jour de la gestation. Si l'analyse morphologique n'a révélé aucune altération importante des structures embryonnaires, en revanche les anomalies de développement du placenta sont patentées: un faible nombre de vaisseaux sanguins est présent dans la région du labyrinthe du placenta (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1038). La région du labyrinthe placentaire constitue la zone d'échanges entre les circulations sanguines maternelle et embryonnaire. Les embryons mutants pour *mek1* sont donc dans l'impossibilité de former un placenta fonctionnel et meurent par manque de nutriments.

Une telle réduction de la vascularisation ne semble résulter ni d'une diminution majeure du nombre des cellules endothéliales vasculaires dans la région du labyrinthe, ni de leur incapacité à se différencier ou à s'organiser en vaisseaux. Une troisième possibilité serait une anomalie de la migration des cellules endothéliales *mek1*<sup>-/-</sup> dans le labyrinthe. En effet, les propriétés d'adhérence à, et de migration cellulaire sur, un substrat, même si elles requièrent toutes deux les intégrines et en particulier  $\alpha\beta 3$  s'il s'agit d'angiogenèse, n'utilisent pas les mêmes voies de transmission du signal. Cette observation s'est confirmée dans le cas de fibroblastes embryonnaires établis à partir d'embryons *mek1*<sup>-/-</sup>. En présence de collagène, les fibroblastes embryonnaires *mek1*<sup>-/-</sup> ont une capacité de migration équivalente à celle de fibroblastes provenant d'embryons de souche sauvage [14]. Toutefois, en présence de fibronectine, la migration cellulaire des fibroblastes *mek1*<sup>-/-</sup> est très réduite, mais leur capacité d'adhérer aux deux substrats, fibronectine ou collagène, est normale. En revanche, l'activation des kinases ERK/MAP de ces cellules en réponse à différents facteurs de croissance tels que le PDGF (*platelet-derived growth factor*), l'EGF, le VEGF, ou encore à la fibronectine demeure normale. La voie des kinases ERK/MAP fonctionne donc normalement, et ce même en l'absence de fonction de MEK1. Ce résultat surprenant peut s'expliquer par une certaine redondance fonctionnelle entre MEK1 et MEK2.

Afin de prouver le rôle essentiel de MEK1 dans la migration cellulaire, des expériences de complémentations ont été effectuées à l'aide de vecteurs

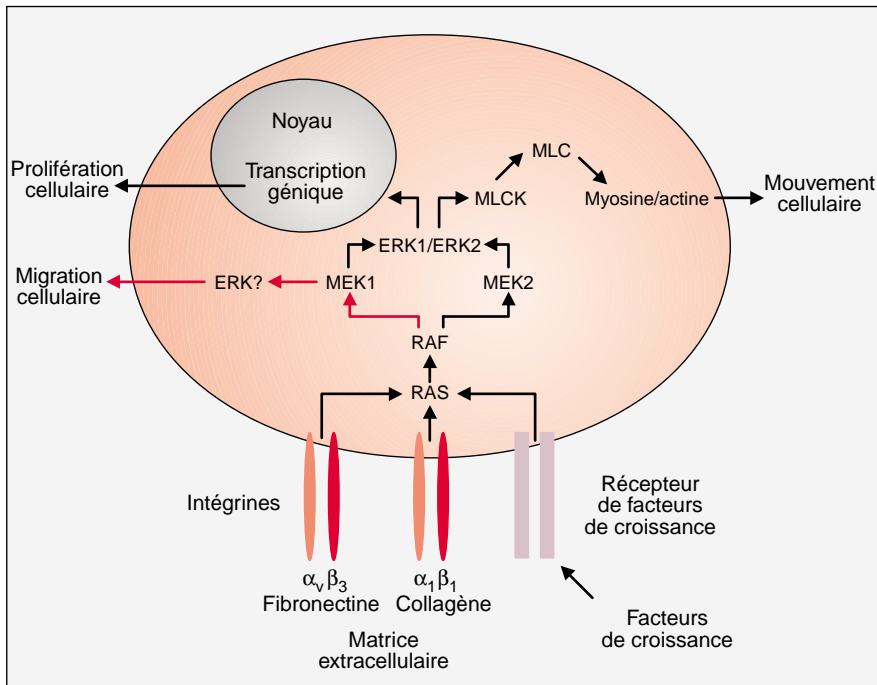


Figure 1. **Modèle proposé pour la spécificité d'action de MEK1 lors de la migration cellulaire.** Selon ce modèle, plusieurs signaux peuvent transiter tant par MEK1 que MEK2, et mener à différentes réponses physiologiques. Lors de la migration cellulaire [16], la voie des kinases ERK/MAP est responsable de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine par l'intermédiaire de l'activation de sa kinase, permettant la contraction des filaments d'actine et le mouvement cellulaire. L'activation de MEK1 par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est aussi spécifiquement requise pour la migration cellulaire induite par la fibronectine. Cette voie implique l'existence de complexes protéiques distincts permettant l'activation de MEK1 en réponse à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et/ou l'existence de substrats particuliers à MEK1 impliqués dans le processus de migration cellulaire.

exprimant MEK1 introduits dans les fibroblastes embryonnaires dépourvus de MEK1. La transfection de *mek1* permet de restaurer les propriétés migratoires des fibroblastes embryonnaires mutants [14]. Puisque l'expression de *mek2* n'est pas affectée chez les embryons *mek1*<sup>-/-</sup> et que la quantité de protéine MEK2 dans les fibroblastes embryonnaires mutants pour *mek1* est normale, on peut conclure que MEK1 est essentielle à la transmission du signal impliqué dans la migration cellulaire induite spécifiquement par la fibronectine [1]. Finalement, nous avons montré que la migration de fibroblastes embryonnaires sur un substrat fibronectine est inhibée par des anticorps neutralisant la fonction de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , ce qui est en

accord avec les résultats démontrant la relation existant entre l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , l'activation de la voie des kinases ERK/MAP, la migration cellulaire et l'angiogenèse [1]. L'ensemble de ces données suggère que la migration cellulaire nécessite la voie de signalisation induite par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . En l'absence de fonction MEK1, la cascade est perturbée affectant ainsi le processus d'angiogenèse, ce qui explique le phénotype observé au niveau du placenta.

La caractérisation phénotypique des souris mutantes pour la fonction MEK1 fournit donc une première évidence génétique du rôle crucial joué par MEK1 au cours du développement embryonnaire. Malgré le profil d'expression très large de

MEK1 au cours de l'embryogenèse, son absence entraîne des anomalies dont l'expression est restreinte et tardive. Puisque les gènes *mek1* et *mek2* sont co-exprimés dans les structures embryonnaires et extra-embryonnaires, une explication logique est que MEK2 puisse compenser l'absence de MEK1. Cependant, MEK1 demeure essentielle à la transmission de certains signaux bien définis, tels que ceux qui proviennent des intégrines, ce qui est en accord avec une certaine spécificité de la cascade des MAP-kinases, due à l'utilisation, par certains signaux, d'isoformes particulières d'une même protéine (figure 1) [13]. MEK1 et MEK2 pourraient faire partie de complexes moléculaires différents, dont chacun serait responsable d'une réponse donnée, suivant une organisation récemment décrite chez la levure [15]. En l'absence de MEK1, MEK2 occupe la place de MEK1 dans le complexe en réponse à certains signaux. Il est aussi possible que MEK1 agisse en activant des substrats qui lui sont spécifiques. D'ailleurs, une étude récente a démontré que la fragmentation de l'appareil de Golgi lors de la mitose dépend de l'activation spécifique de MEK1 ainsi que d'une nouvelle molécule ERK associée à la membrane de l'appareil de Golgi [16].

**Jean Charron**  
**Lucie Jeannotte**

Centre de recherche en cancérologie de l'université Laval, Centre hospitalier universitaire de Québec, Pavillon l'Hôtel-Dieu du Québec, 9, rue McMahon, Québec QC, G1R 2J6 Canada.

1. Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, Cheresch DA. Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 140: 1255-63.
2. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-35.
3. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, Zimmer A. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 1997; 16: 293-7.

4. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* 1993; 119: 1093-105.

5. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 1993; 119: 1079-91.

6. Mattot V, Pourtier A, Soncin F, Vandebunder B. La morphogenèse de l'arbre vasculaire. *Med Sci* 1998; 14: 437-47.

7. Carmeliet P, Ferreira V, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-9.

8. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.

9. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.

10. Bhunia AK, Han H, Snowden A, Chatterjee S. Lactosylceramide stimulates Ras-GTP loading, kinases (MEK, Raf), p44 mitogen-activated protein kinase, and c-fos expression in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 10660-6.

11. Seufferlein T, Withers DJ, Rozengurt E. Reduced requirement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity for entry into the S phase of the cell cycle in Swiss 3T3 fibroblasts stimulated by bombesin and insulin. *J Biol Chem* 1996; 271: 21471-7.

12. Wu X, Noh SJ, Zhou G, Dixon JE, Guan KL. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-

Raf from epidermal growth factor-stimulated HeLa cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 3265-71.

13. Acharya U, Mallababarrena A, Acharya JK, Malhotra V. Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* 1998; 92: 183-92.

14. Giroux S, Tremblay M, Bernard D, et al. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 1999; 9: 369-72.

15. Madhani HD, Fink GR. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet* 1998; 14: 151-5.

16. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 1997; 137: 481-92.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **À l'écoute des souris nulles en *Math1*.** Si les étapes de la formation de l'épithélium sensoriel de l'oreille interne ont été récemment en partie élucidées (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1054), on ignorait quel gène, en amont, contrôlait la genèse des cellules ciliées des organes sensoriels de l'oreille interne : cochlée (qui contient l'organe de Corti responsable de l'audition), et vestibule (qui contient les organes sensoriels de l'équilibre). Un des responsables vient d'être découvert, le gène *Math1*, qui code pour un facteur de transcription, membre de la famille bHLH (hélice-boucle-hélice), et qui est exprimé dans l'épithélium sensoriel de l'oreille interne [1]. *Math1* est l'homologue du gène *atonal* (*ato*) de la drosophile, indispensable à la genèse des organes chondronaux\* [2], et de *Xath1* chez le xénope [3]. Les souris hétérozygotes pour une délétion ciblée de *Math1*<sup>(+/-)</sup> sont viables avec un phénotype normal, mais les souris nulles en *Math1*<sup>(-/-)</sup> meurent dès la naissance et présentent des anomalies cérébelleuses. Afin d'explorer de façon plus précise l'oreille interne, l'équipe de Huda Zoghbi (Houston, TX, USA) a créé une lignée de souris chez lesquelles la région codante de *Math1* est rem-

placée par la  $\beta$ -galactosidase. Chez l'embryon de souris, à E12,5, l'expression de  $\beta$ -Gal est bien visible dans la vésicule auditive. A E18,5, elle n'est conservée que dans certaines cellules de soutien chez les souris homozygotes *Math1*<sup>( $\beta$ -Gal/ $\beta$ -Gal)</sup>, alors qu'on l'observe dans les cellules ciliées de l'épithélium en développement chez les souris *Math1*<sup>( $\beta$ -Gal/ $\beta$ -Gal)</sup>. Il est intéressant de noter que, dans la cochlée des homozygotes, l'expression de  $\beta$ -Gal est absente à la base de la spirale, très diminuée dans sa partie moyenne et aussi abondante que chez les hétérozygotes dans la région apicale, confirmant ainsi le développement en gradient de la cochlée, de la base à l'apex. Les utricules\*\* et les cochlées des souris nulles en *Math1*<sup>( $\beta$ -Gal/ $\beta$ -Gal)</sup> sont totalement dépourvus de cellules ciliées et les marqueurs spécifiques des cellules ciliées sont complètement absents dans la vésicule auditive. *Math1* serait donc le premier gène pro-neural indispensable à la spécification des cellules ciliées de l'oreille interne. La destruction des cellules ciliées étant une cause non exceptionnelle de surdités et de dys-

fonctionnements vestibulaires (*m/s* 1991, n° 4, p. 357), on se prend à espérer une régénération par *Math1* de ce petit contingent cellulaire précieux – et jusqu'à présent non renouvelable – dans des conditions de thérapie génique qui sont évidemment encore bien équivoques.

- [1. Bermingham NA, et al. *Science* 1999 ; 284 : 1837-41.]
- [2. Jarman AP, et al. *Development* 1996 ; 121 : 2019-30.]
- [3. Kim P, et al. *Dev Biol* 1997 ; 187 : 1-12.]



**BioDOCS**  
L'Association des Etudiants-Chercheurs en Biologie

**Vous voulez faire un DEA, une thèse ?  
Vous cherchez un laboratoire de recherche ?**

**Vous êtes inquiet pour votre statut  
et votre avenir dans la recherche ?**

**Vous êtes inquiet sur les débouchés dans la recherche ?  
BioDocs vous invite**

à consulter le serveur web (Internet) <http://157.136.20.60>  
Contactez-nous également par e-mail ([analenn@pasteur.fr](mailto:analenn@pasteur.fr))

\* Récepteurs sensoriels internes.  
\*\* Un des organes du vestibule.