Anomalies moléculaires de la voie MAPK et cancer papillaire de la thyroïde : étude de deux phosphatases spécifiques de ERK, DUSP5 et DUSP6

Camille Buffet

▶ **To cite this version:**

Camille Buffet. Anomalies moléculaires de la voie MAPK et cancer papillaire de la thyroïde : étude de deux phosphatases spécifiques de ERK, DUSP5 et DUSP6. Cancer. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T049 . tel-01127459

HAL Id: tel-01127459
https://theses.hal.science/tel-01127459

Submitted on 7 Mar 2015

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.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale GC2ID

Institut Cochin

Département Endocrinologie, Métabolisme et Diabète

Equipe Tumeurs endocrines et Signalisation

Anomalies moléculaires de la voie MAPK et cancer papillaire de la thyroïde

Etude de deux phosphatases spécifiques de ERK,
DUSP5 et DUSP6

Par Camille BUFFET

Thèse de doctorat de Cancer

Dirigée par le Pr Lionel Groussin

Présentée et soutenue publiquement le 20 novembre 2014

Devant un jury composé de :

Pr Martin Schlumberger, PU-PH, Président du jury

Dr Frédérique Savagner, MCU-PH, Rapporteur

Dr Corinne Dupuy, DR2, Rapporteur

Dr Athanassia Sotiropoulos, DR2, Membre du jury

Pr Lionel Groussin, PU-PH, Directeur de thèse

Résumé:

Anomalies moléculaires de la voie MAPK et cancer papillaire de la thyroïde : Etude de deux phosphatases spécifiques de ERK, DUSP5 et DUSP6.

Le **cancer papillaire de la thyroïde** (CPT) est la tumeur endocrine la plus fréquente. Des anomalies moléculaires activant la **voie des MAPK** (Mitogen-Activated Protein Kinases) sont identifiées, de façon mutuellement exclusive, dans environ 70% des cas. Il s'agit de réarrangements chromosomiques, le plus souvent de type RET/PTC (~ 10%), de mutations ponctuelles activatrices des trois isoformes de l'oncogène *RAS* (H, N et K-*RAS*) (~ 10%), ou de l'oncogène B-RAF (~ 50%). La **mutation « hot spot » B-RAF^{V600E}** est **la plus fréquemment identifiée,** elle est associée à une plus grande **agressivité clinique** (diagnostic à un stade tardif, risque de récidives et de décès accru). Ces évènements moléculaires ont pour conséquence commune l'activation de la voie des MAPK, se traduisant en aval par la phosphorylation de MEK (Mitogen-activated Extracellular signal-Regulated Kinase) puis de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Cette dernière est régulée négativement par des phosphatases, appartenant à la famille des **Dual Specificity Phosphatases** (DUSPs), d'expression ubiquitaire, et en particulier de deux phosphatases spécifiques de ERK, l'une cytoplasmique (**DUSP6**) et l'autre nucléaire (**DUSP5).** Nous avons fait l'hypothèse que ces phosphatases pouvaient être soit des gènes suppresseurs de tumeurs (leur perte d'expression conduisant à une augmentation de phosphorylation de ERK et une prolifération accrue), soit des marqueurs du degré d'activation de la voie MAPK dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif.

Ceci nous a conduits à analyser la **régulation** et l'**expression** de ces **phosphatases** dans trois modèles : la **lignée cellulaire PCCL3** (thyroïde de rat), exprimant l'un des trois principaux oncogènes mutés dans les CPT (RET/PTC3 ou H-RAS^{V12} ou B-RAF^{V600E}) sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline, des **lignées cellulaires humaines dérivant de CPT** et des **CPT humains**. Nous avons montré que l'**activation** de la voie **MAPK** est responsable d'une **induction de ces phosphatases.** Ces phosphatases participent ainsi à une **boucle de rétrocontrôle** pour réguler finement l'activation de cette voie. Les niveaux d'ARNm de DUSP5 et DUSP6 dans les CPT montrent une surexpression globale de ces phosphatases, mais plus importante dans les CPT porteurs d'une **mutation activatrice de B-RAF** suggérant une **activation plus forte de la voie dans ces tumeurs plus agressives**. Leur **niveau d'expression** est ainsi un bon **marqueur du degré d'activation de la voie des MAPK**.

L'**inactivation** de **DUSP5** ou **DUSP6** ou des **2 phosphatases simultanément** par technique d'interférence ARN, dans des lignées humaines dérivant d'un cancer thyroïdien, n'a **pas d'impact sur la prolifération cellulaire**, suggérant l'absence de rôle de suppresseur de tumeurs. Ceci pourrait être expliqué par un phénomène de compensation que nous avons observé entre les phosphatases de cette famille. Inversement, un **inhibiteur pharmacologique de DUSP6** induit une apoptose de lignées humaines dérivant de cancers

thyroïdiens B-RAF^{V600E}, suggérant une inhibition de plusieurs phosphatases parmi la famille des DUSPs ou un effet « off-target ».

Dans un second temps nous avons analysé la **régulation de l'expression de DUSP5**, **cible de l'activation de la voie MAPK**, pour laquelle les données de la littérature sont rares. Nous avons démontré à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de voies de signalisation, que DUSP5 est un **gène de réponse précoce**, **régulé** principalement **par la voie MAPK**, au **niveau transcriptionnel**. L'analyse de la région promotrice de DUSP5, nous a permis d'identifier d'une part deux éléments de réponse contigus, nommés « **CArG Box** », liant le **Serum Response Factor** (**SRF**), et d'autre part plusieurs éléments de réponse nommés **Ets Binding Sites** (**EBS**), liant le facteur **Ets-like transcription factor 1** (**Elk-1**), lui-même régulé positivement par ERK. Nous avons démontré dans la lignée cellulaire NIH3T3 (fibroblastes de souris) le rôle des « CArG boxes » et des EBS grâce à des expériences de mutagenèse dirigée de ces différents éléments de réponse et de transfection transitoire. Le rôle de SRF et de Elk-1 dans la régulation de l'expression de DUSP5 a ensuite été confirmé par des expériences de retardement sur gel et d'immunoprécipitation de chromatine.

En conclusion, notre travail montre que l'**activation de la voie MAPK** est **différente selon l'anomalie moléculaire** mise en évidence au sein d'un CPT et qu'elle est **plus puissante** dans les tumeurs porteuses d'une **mutation activatrice de B-RAF**, ce qui pourrait expliquer leur plus grande agressivité clinique. **DUSP5** et **DUSP6** sont des **marqueurs d'activation** de la **voie MAPK** et n'ont **pas de rôle de gènes suppresseurs de tumeurs** dans notre modèle de cancer. Nos données sur la régulation transcriptionnelle de DUSP5 sont en faveur de la formation d'un **complexe ternaire** (**SRF-Elk1-ADN**) sur le promoteur de cette phosphatase, permettant d'expliquer l'**induction** de **DUSP5 par la voie MAPK** et surlignant la **boucle de rétrocontrôle négatif** ainsi mise en place pour contrôler finement les niveaux de ERK phosphorylé.

Mots clés : DUSP5, DUSP6, phosphatase, SRF, Elk-1, CArG Box, EBS (Ets Binding Site), voie des MAPK, cancer papillaire de la thyroïde, rétrocontrôle négatif.

Abstract:

MAPK pathway alterations and papillary thyroid cancer: Analysis of two ERK-specific phosphatases, DUSP5 and DUSP6

Papillary thyroid cancer (PTC) is the most common endocrine malignancy. Mutually exclusive and activating alterations of the **MAPK pathway** (Mitogen-Activated Protein Kinases) are identified in 70% of cases. Common mutations found in PTCs are point mutation of the *B-RAF* (~ 50%) and *RAS* genes (~ 10%) as well as RET/PTC chromosomal rearrangements (~ 10%). The **hot spot B-RAF^{V600E} mutation** is the **most frequently** alteration **identified** and is connected with **agressive clinical characteristics** (high stage at diagnosis, high recurrence risk and death). These molecular events lead to constitutive activation of the MAPK pathway, resulting in MEK (Mitogen-activated Extracellular signal-Regulated Kinase) and ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) phosphorylation. ERK is negatively regulated by phosphatases and among them, **Dual Specificity Phosphatases** (DUSPs), ubiquitary expressed, in particular two ERK-specific phosphatases **DUSP5** (nuclear) and **DUSP6** (cytosolic). We hypothesized that these phosphatases could have tumor supressor properties (i.e. their loss would be associated with an increase in MAPK pathway activation) or may serve as a surrogate marker of MAPK pathway activation in the context of a negative feedback loop.

We analysed **regulation** and **expression** of both phosphatases in 3 models: **three PCCL3 cell lines** (rat thyroid cells) expressing one of the most common oncogene identified in PTCs (RET/PTC3 or H-RAS^{V12} or B-RAF^{V600E}) under the control of a doxycycline-inducible promoter, **human PTC-derived cell lines** and **human PTC**. We demonstrated that **MAPK pathway activation** was correlated with **induction of DUSP5 and DUSP6**. These phosphatases are involved in a **negative feedback loop** that contributes to a tight regulation of phospho-ERK levels. DUSP5 and DUSP6 mRNA are overexpressed in human PTCs, especially in **B-RAF mutated tumors** suggesting a **higher MAPK signaling output in these agressive PTCs**. **Silencing of DUSP5 and/or DUSP6** by small interfering RNA **does not affect proliferation** of human B-RAF^{V600E} thyroid carcinoma-derived cell lines, suggesting the lack of tumor suppressor gene role. Compensatory changes in expression of DUSPs when a specific one is inactivated may explain this lack of effect. On the opposite, a **DUSP6 pharmacological inhibitor** induced a concentration dependent decrease in proliferation of human B-RAF^{V600E} cells, suggesting « off-target » effect of this inhibitor.

In a second part, we analysed the **regulation of DUSP5 expression**, which is a **target of the MAPK pathway activation**. We demonstrated, using pharmacological inhibitors, that DUSP5 is an **early response gene**, **regulated** mostly **by the MAPK pathway**, at the **transcriptional level**. Two contiguous **CArG boxes** that bind **serum response factor** (**SRF**) were found in a

1Kb promoter region, as well as several **E twenty-six transcription factor family binding sites** (**EBS**). These sites potentially bind **Elk-1**, a transcription factor activated by ERK1/2. Using wild type or mutated *DUSP5* promoter reporters, we demonstrated that SRF plays a crucial role in serum induction of DUSP5 promoter activity, the proximal CArG box being important for SRF binding *in vitro* and in living cells. Moreover Elk-1 was bound *in vitro* to a promoter region containing the proximal CArG box and a putative EBS. Its specific binding to SRF was necessary to elicit promoter response to dominant positive Elk-VP16 and to enhance the response to serum stimulation.

Altogether our results suggest that the **MAPK pathway is more active in B-RAF^{V600E} PTC** than in PTC with other genetic alteration and could explain their clinical agressivity. **DUSP5 and DUSP6**, as well as phosphorylated MEK, are **markers of activation of the MAPK pathway**. **Neither phosphatase has tumor suppressor properties** in our thyroid cancer cell models. Our results suggest redundancy and functional compensation among DUSPs. Our data about the regulation of DUSP5 expression demonstrated that SRF and Elk-1 form **a ternary complex** (**Elk-1-SRF-DNA**) on DUSP5 promoter, consequently providing a link to an **important negative feedback** tightly regulating phosphorylated ERK levels.

Keywords: DUSP5, DUSP6, phosphatase, SRF, Elk-1, CArG Box, EBS (Ets Binding Site), MAPK pathway, papillary thyroid cancer, negative feedback loop.

Remerciements

Merci au Pr Lionel Groussin pour sa disponibilité, sa patience, sa pédagogie, ses encouragements et son enseignement précieux.

Merci au Pr Schlumberger, d'avoir accepté de diriger le jury de cette thèse.

Merci au Dr Corinne Dupuy et au Dr Frédérique Savagner d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur.

Merci au Dr Athanassia Sotiropoulos d'avoir accepté d'être membre du jury. Merci aussi pour tous ses conseils et d'avoir partagé avec moi ses domaines d'expertise.

Merci au Pr Laurence Leenhardt pour son soutien moral et concret pour l'aboutissement de ce projet. Je la remercie également pour la valorisation quotidienne de mon travail tant hospitalier, que fondamental.

Merci au Pr Jérôme Bertherat de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Merci à Maria-Grazia Catelli pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide au cours de mes années de MASTER2 et de thèse.

Merci à Karine pour son aide, son énergie, sa bonne humeur et sa persévérance dans certains moments difficiles…

Merci à Frédérique Tissier pour ses nombreux dons d'iconographie anatomopathologique ainsi que pour nos collaborations hospitalières ou fondamentales agréables et enrichissantes.

Merci à toute l'équipe du labo, Stéphanie, Lucile, Françoise, Ludivine, Marthe, Bruno, Cyril, Windy, Simon et Hanin pour leur aide et leurs conseils. Merci pour la bonne ambiance au labo et l'esprit d'entraide généreuse. Merci à Françoise pour les conseils indispensables sur les gels retards.

Merci à tous les membres de l'Institut Cochin qui m'ont aussi donné de précieux conseils pour les manip et m'ont souvent prêté leur matériel : Pascalette (Pascale Bossard), Julien Planchais, Jonathan Lerner, Angélique Gougelet, Solenne Marmier, Renaud Dentin.

Merci à Philippe Chaffey pour les expériences de Nanopro et ses recommandations pour les Western Blot, ainsi qu'à Franck Letourneur pour sa formation de qualité à la qPCR.

Merci à Emmanuel et à ma maman pour leurs encouragements et leur affection.

Merci à Catherine, Jean, Gauthier, Sophie, Jean-François et Florence pour l'indulgence dont ils ont fait preuve vis-à-vis de mon investissement dans ce projet et leur soutien.

Table des matières

REMERCIEMENTS 6

INTRODUCTION 9

1. LE CANCER PAPILLAIRE DE LA THYROÏDE : GENERALITES. 9

2. LE CANCER PAPILLAIRE DE LA THYROÏDE: LES ANOMALIES MOLECULAIRES DE LA VOIE MEK-ERK 14

3. L'ONCOGENE *B-RAF* 21

3.2 LES ANOMALIES MOLECULAIRES DE RAF EN PATHOLOGIE MALIGNE ET BENIGNE. 23

3.3 LA MUTATION B-RAF : UN FACTEUR DE MAUVAIS PRONOSTIQUE DES CANCERS ? 27

3.4 LES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES A L'ORIGINE DE L'AGRESSIVITE DES CPT MUTES B-RAF. 28

3.5 MUTATION DE B-RAF ET THERAPIES CIBLEES. 31

3.6 INHIBITEURS DE B-RAF : LE PROBLEME DES RESISTANCES PRIMAIRES ET ACQUISES. 35

3.7 INHIBITEURS DE B-RAF ET ADAPTATION TUMORALE 39

3.8 STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR CONTRER LES RESISTANCES AUX INHIBITEURS DE B-RAF^{V600E}. 41

3.9 STRATEGIE THERAPEUTIQUE DANS LE CANCER THYROÏDIEN. 44

4. REGULATION DE L'ACTIVITE DE ERK. 45

4.1 MECANISMES CONDUISANT A UNE ACTIVATION DE ERK. 45

4.1.1 ROLE PREPONDERANT DE MEK. 45

4.1.2 RETROCONTROLES POSITIFS FAVORISANT L'ACTIVATION DE ERK. 46

4.1.3 ROLE DES PROTEINES CHAPERONNES. 46

4.2 CONTROLE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE ERK ET CONSEQUENCE SUR L'ACTIVATION DE ERK. 48

4.3 MECANISMES CONDUISANT A UNE INHIBITION DE ERK. 49

4.3.1 RAF KINASE INHIBITOR PROTEIN (RKIP). 49

4.3.2 SPROUTY AND SPRED (SPROUTY-RELATED PROTEINS WITH AN EVH1 DOMAIN). 49

4.3.3 MECANISMES DE RETROCONTROLES NEGATIFS. 49

4.3.4 LES PHOSPHATASES. 50

5 DUSP5 ET DUSP6. 53

5.1 DUSP6. 53

5.2 DUSP5. 55

5.3 DUSP5 ET DUSP6 EN PATHOLOGIE CANCEREUSE..... 57

6 ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LA VOIE ERK : L'EXEMPLE DE *C-FOS*. 64

6.1 MODIFICATIONS DE LA CHROMATINE ET ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION DE *C-FOS*..... 65

6.2 AUTRES MECANISMES DE CONTROLE DE L'EXPRESSION DE *C-FOS*..... 67

HYPOTHESES 68

OBJECTIFS ET METHODOLOGIE DU TRAVAIL 70

RESULTATS..... 76

1. DUSP5 ET DUSP6, DEUX PHOSPHATASES SPECIFIQUES DE ERK, SONT DES MARQUEURS D'UNE ACTIVATION FORTE DE LA VOIE MAPK, DANS LES CANCERS THYROÏDIENS PAPILLAIRES MUTES B-RAF. 77

2. DUSP5, PHOSPHATASE SPECIFIQUE DE ERK, EST REGULEE PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SRF ET ELK-1. 116

DISCUSSION 141

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....150

BIBLIOGRAPHIE 152

Introduction

1. Le cancer papillaire de la thyroïde : généralités.

Le cancer de la thyroïde est la tumeur endocrine la plus fréquente et son incidence est en augmentation partout dans le monde depuis ces 20 dernières années. Les cancers de la thyroïde se développent aux dépens de deux types cellulaires : les cellules épithéliales folliculaires et les cellules parafolliculaires C produisant la calcitonine. La majorité des cancers thyroïdiens dérive des cellules épithéliales folliculaires [1], une minorité (3 à 5% de l'ensemble des cancers) provient des cellules parafolliculaires C. Les cancers dérivés des cellules folliculaires sont :

- les cancers différenciés de type papillaire
- les cancers différenciés de type vésiculaire
- les cancers peu différenciés
- les cancers indifférenciés (= anaplasiques).

Les cancers peu différenciés ou indifférenciés peuvent survenir *de novo*. Néanmoins, la plupart d'entre eux proviennent de la dédifférenciation progressive de cancers papillaires ou vésiculaires (figure 1).

Les cancers développés à partir des cellules C, produisant la calcitonine, sont les cancers médullaires.

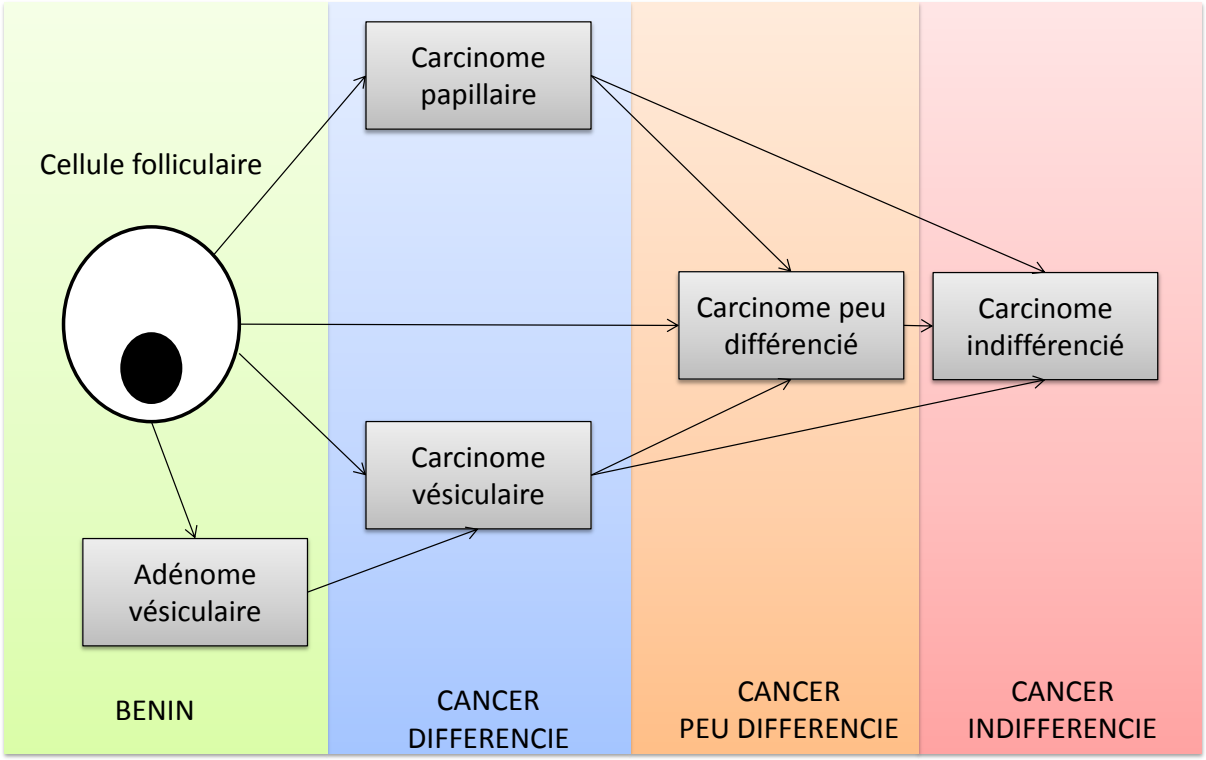

Figure 1. Schéma de la dédifférenciation des cellules folliculaires thyroïdiennes (d'après [2]).

L'augmentation d'incidence du cancer de la thyroïde, désormais classé en France au 5ème rang des cancers les plus fréquents chez la femme, se fait aux dépens des formes papillaires [1, 3]. Sur le plan histologique (figure 2), le diagnostic de cancer papillaire est fait à partir de l'identification d'anomalies nucléaires caractéristiques (noyaux à bords irréguliers, se chevauchant, avec inclusion intranucléaire de cytoplasme, rainurés). Il existe différents sous-types de cancer papillaire : classique (architecture constituée de papilles), variant vésiculaire (architecture constituée majoritairement de vésicules et non de papilles), oxyphile (présence de cellules au cytoplasme abondant éosinophile), à cellules hautes, à cellules cylindriques, trabéculaire (architecture solide sous forme de massifs pleins), sclérosant diffus (atteinte diffuse bilatérale, fibrose marquée).

Cette augmentation d'incidence du cancer de la thyroïde est principalement due à l'amélioration de la sensibilité et des performances des échographes de dernière génération ainsi qu'à la prescription large de cytoponctions de nodules thyroïdiens.

Les lésions bénignes à type d'adénomes vésiculaires ne peuvent pas se transformer en lésions malignes. Toutefois de façon exceptionnelle, par accumulation d'anomalies moléculaires, elles pourraient se transformer en cancer vésiculaire ou en cancer papillaire de variant vésiculaire [4].

Le pronostic du cancer de la thyroïde est globalement bon, une chirurgie de qualité permettant le plus souvent d'obtenir la guérison. Elle est parfois complétée par un traitement par l'iode radioactif (iode^{131}) ou irathérapie, en fonction du stade de la maladie. Certains cancers de la thyroïde posent malgré tout le problème de récidives locorégionales ou à distance (poumon, os), voire de complications mortelles [5]. Dans certains cas, les localisations métastatiques de ces cancers posent le problème de leur résistance au traitement par l'iode radioactif, soit d'emblée, soit au cours de l'évolution de la maladie : on parle alors de cancers réfractaires à l'iode. Enfin, le cancer papillaire peut exceptionnellement évoluer vers une forme dédifférenciée (anaplasique) dont le pronostic est effroyable, avec une survie médiane de 5 mois et une survie à un an de 20% [6].

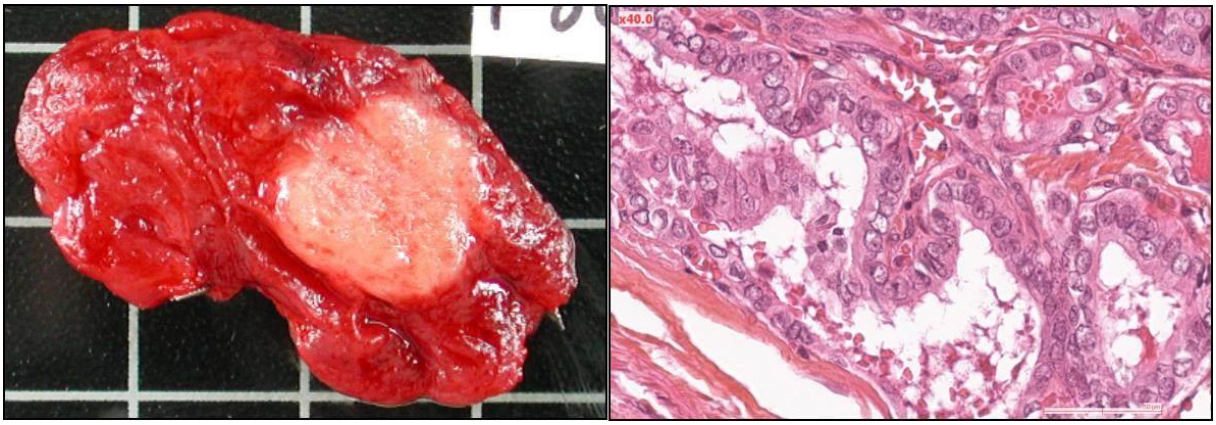

Figure 2. Vue macroscopique d'un cancer papillaire d'allure blanchâtre à la coupe lors d'un examen extemporané et coupe histologique correspondante montrant les anomalies cyto-nucléaires typiques décrites dans le texte (images du Dr Frédérique Tissier, hôpital Pitié Salpêtrière).

Les progrès récents dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des cancers de la thyroïde ouvrent des perspectives intéressantes :

- diagnostiques, notamment pour les nodules dont la cytoponction ne permet pas un diagnostic cytologique de certitude;

- pronostiques, car certaines anomalies moléculaires semblent associées à un pronostic plus défavorable ;

- thérapeutiques, pour les patients ayant des formes évoluées réfractaires à l'iode radioactif pour lesquels les chimiothérapies classiques sont peu efficaces alors que l'efficacité de thérapies ciblées inhibant certains acteurs de la tumorigenèse semble prometteuse.

Alors que les cancers de type vésiculaire résultent essentiellement d'anomalies de la voie de signalisation PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ou voie RAS-RAF-MEK-ERK joue un rôle essentiel dans le développement des cancers papillaires [7] (figure 3). La connaissance des mécanismes moléculaires d'activation constitutive de la voie MAPK est essentielle pour progresser dans la prise en charge de ces patients.

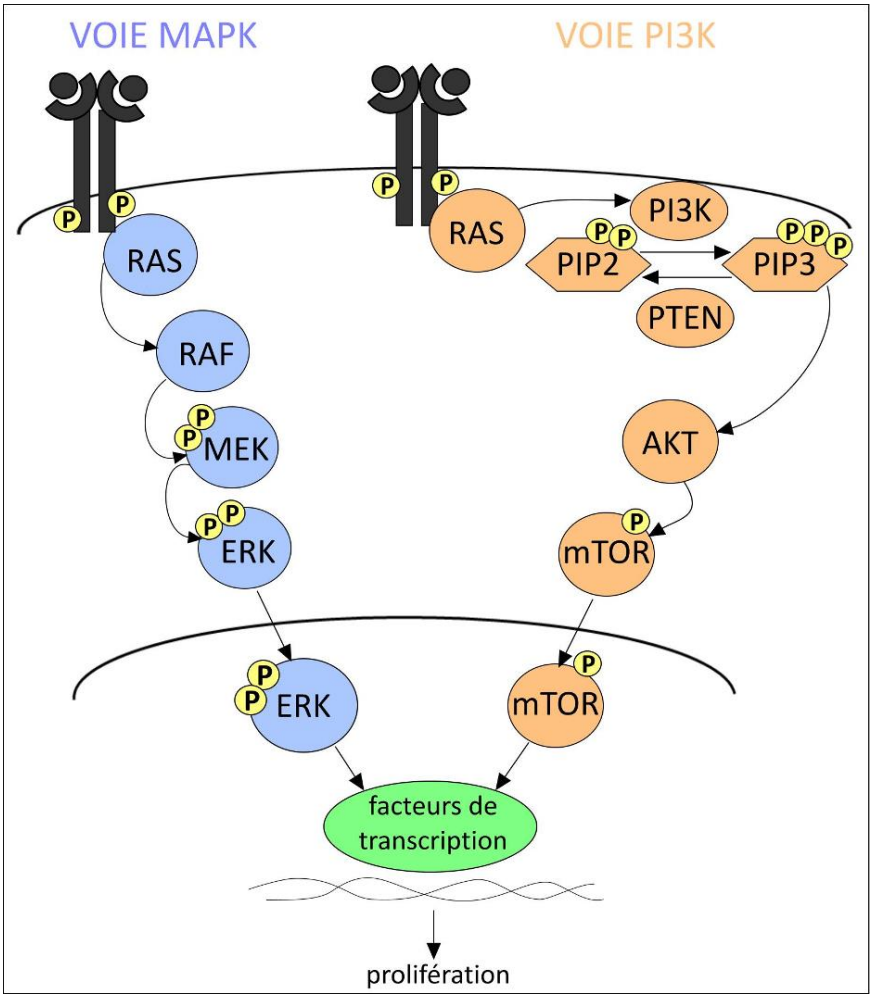

Figure 3. Voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse thyroïdienne (d'après [4]). La voie des **MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinase) est majoritairement impliquée dans les cancers papillaires et celle de la **PI3K** (phosphatidylinositol 3-kinase) dans les cancers vésiculaires. Ces deux voies sont normalement activées suite à une stimulation cellulaire par des facteurs de croissance (représentés par un rond noir), responsable de la dimérisation et de l'activation de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase suite à leur autophosphorylation.
La voie des **MAPK** est constituée des protéines **RAS** (Rat Sarcoma), **RAF** (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), **MEK** (Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase) et **ERK** (Extra-cellular signal-Regulated Kinase), activées de façon séquentielle, via une cascade de phosphorylation.
La **PI3K** peut agir directement avec les récepteurs à activité tyrosine kinase (non représenté sur le schéma) ou par l'intermédiaire de **RAS**. L'activation de la PI3K entraine la conversion du phosphatidylinositol biphosphate (**PIP2**) en phosphatidylinositol triphosphate (**PIP3**). La PI3K peut être inhibée par **PTEN** (Phosphatase and TENsin homologue). Le composé PIP3 recrute la sérine/thréonine kinase **AKT** (AKR T cell lymphoma) qui phosphoryle et active de nombreuses cibles d'aval, dont **mTOR** (mammalian Target of Rapamycin).
Ces deux cascades de signalisation aboutissent à l'activation de ERK ou mTOR, qui à leurs tours activent différentes cibles dont des facteurs de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes, et notamment certains impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

2. Le cancer papillaire de la thyroïde: les anomalies moléculaires de la voie MEK-ERK.

Les MAPK représentent une famille d'enzymes, conservées au cours de l'évolution, permettant, de façon physiologique, de transmettre le signal provenant de l'activation de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase à différentes cibles intracellulaires. Il existe 4 groupes différents de MAPK : extra-cellular signal-regulated kinase (ERK)- 1/ 2, Jun amino-terminal kinases (JNK 1/2/3), p38 proteins (p38α/β/γ/δ) et ERK5. L'activation de la MAPK-ERK nécessite une cascade de phosphorylation qui est déclenchée par la liaison d'un ligand, comme par exemple les facteurs de croissance EGF (Epithelial Growth Factor) ou PDFG (Platelet-Derived Growth Factor), à un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Cette liaison est responsable de la dimérisation du récepteur qui déclenche une autophosphorylation de sa portion cytoplasmique sur des résidus tyrosine. Ceci conduit au recrutement de Grb-2 (Growth Factor Receptor Bound 2), qui recrute à son tour la protéine adaptatrice SOS (Son of sevenless) à la membrane plasmique. Puis Grb-2-SOS interagit avec la GTPase RAS et l'active suite à un échange de GDP par du GTP. RAS-GTP est capable d'activer une douzaine de partenaire dont les kinases de la famille RAF (A-RAF, B-RAF et C-RAF aussi nommé Raf-1) avec lesquels il interagit, entrainant ainsi leur translocation à la membrane plasmique. Une fois activé Raf phosphoryle et active MEK qui active à son tour ERK suite à la phosphorylation à la fois de résidus sérine/thréonine et tyrosine [8]. ERK activé peut alors phosphoryler un très grand nombre de cibles et contrôler un grand nombre de processus physiologiques, tel que la prolifération, la différenciation, la survie ou la mort cellulaire. On estime que la voie MEK-ERK est suractivée dans un tiers des cancers humains [9] : différentes anomalies moléculaires peuvent conduire à une activation aberrante de cette voie (figure 4).

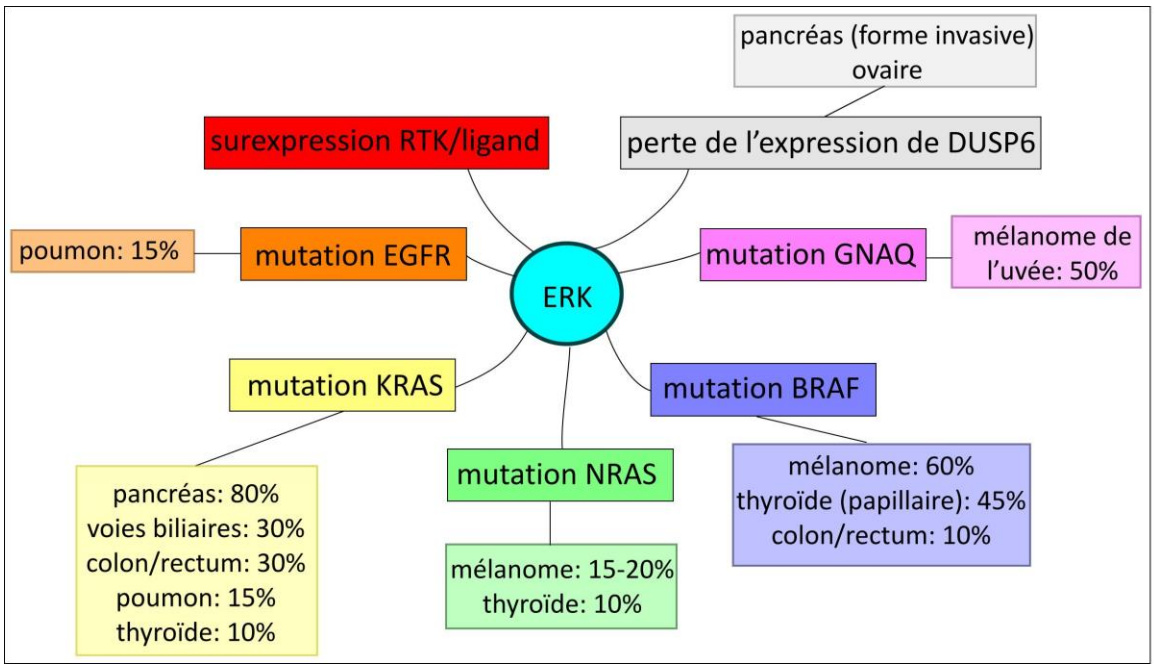

Figure 4. Principales altérations moléculaires responsables d'une activation de ERK et leur fréquence dans certains types de cancer (d'après [10]). RTK : récepteur à activité tyrosine kinase ; EGFR : epidermal growth-factor recepteur ; GNAQ : Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha ; DUSP : dual specificity phosphatase.

Des anomalies moléculaires conduisant à une activation constitutive de la voie MEK-ERK sont identifiables dans environ 70% des cancers papillaires de la thyroïde (CPT). Par voie de conséquence, aucune anomalie moléculaire n'est à l'heure actuelle identifiée dans environ 30% des cas.

Les principales altérations génétiques identifiées dans les CPT [4, 7] sont (figure 5) :

- Les réarrangements chromosomiques de type RET/PTC (~ 20%).

Il s'agit d'une fusion entre la portion C terminale du proto-oncogène *RET* (domaine à activité Tyrosine Kinase) et la partie N terminale d'un partenaire de fusion dont le gène est exprimé dans le thyréocyte et qui a la capacité de s'homodimériser. Il en résulte que le produit de cette fusion est exprimé dans le thyréocyte, alors que l'oncogène *RET* n'y est normalement pas exprimé. L'oncogène *RET* est exprimé uniquement dans les cellules C ou parafolliculaires produisant la calcitonine. La dimérisation constitutive de cette protéine de fusion permet l'activation du domaine catalytique de RET conduisant ainsi à l'activation constitutive de voies de signalisation, dont la voie des MAPK. Les modèles murins ont montré de façon constante que le réarrangement RET/PTC était probablement un évènement précoce car capable d'initier la carcinogenèse thyroïdienne [11-14]. Il existe une douzaine de

réarrangements RET/PTC différents décrit dans la littérature [15-17]. Les réarrangements de type RET/PTC ont également été décrits dans quelques lésions bénignes thyroïdiennes. Ces réarrangements surviennent alors dans une petite proportion des cellules de la lésion (évènement non clonal) [18].

- Les mutations ponctuelles activatrices des isoformes de l'oncogène *RAS* (affectant le domaine GTPase): *H-RAS, N-RAS* ou *K-RAS* (~ 10%).

RAS est une GTPase, localisée à la partie interne de la membrane plasmique, qui transmet en aval le signal provenant de récepteur à activité tyrosine kinase et permet ainsi l'activation de la voie MAPK ainsi que d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K-AKT. Les mutations ponctuelles activatrices de *RAS* affectent, le plus souvent, les codons 12, 13 et 61 des 3 gènes *RAS*. Les mutations du codon 61 des gènes *H-RAS* et *N-RAS* sont les plus fréquentes dans les CPT. Ces mutations bloquent l'activité GTPase de la protéine RAS-GTP la rendant constitutivement active. Les mutations *RAS* sont plus fréquentes parmi les CPT de variante vésiculaire (c'est-à-dire les cancers constitués de vésicules et non de papilles). Ces mutations sont également décrites dans 20 à 40% des adénomes vésiculaires [19-21]. Ceci suggère que cette mutation pourrait prédisposer au développement de carcinomes, par exemple les CPT de variante vésiculaire [4] (figure 1).

- Les mutations activatrices de l'oncogène *B-RAF*, évènement génétique le plus fréquent dans les CPT, retrouvé dans 40 à 50% des cas.

Ces mutations sont spécifiques des carcinomes papillaires, peu différenciés et anaplasiques, à l'exclusion des carcinomes vésiculaires et des tumeurs bénignes. B-RAF est une sérine-thréonine kinase qui, après avoir été activé par RAS, est responsable de l'activation de la protéine kinase MEK en aval (figure 2). La mutation identifiée de façon quasi exclusive résulte de la substitution d'une valine par une glutamine au niveau du résidu 600 (mutation B-RAF^{V600E}) rendant la kinase constitutivement active. Un réarrangement chromosomique AKAP9 (A-kinase anchor protein 9)/B-RAF résultant de la fusion entre la portion du gène *B-RAF* codant pour le domaine C-terminal à activité tyrosine kinase et la portion du gène *AKAP9* codant pour l'extrémité N-terminale, a également été décrite, principalement au sein de cancers secondaires à une irradiation [22, 23]. La fusion *AKAP9-B-RAF* entraine la perte de 2 domaines régulateurs de B-RAF, CR1 et CR2, exerçant un effet auto-inhibiteur sur l'activité kinasique de B-RAF. CR1 est également un domaine de liaison à RAS. En conséquence la fusion *AKAP9-B-RAF* est responsable d'une activation constitutive de B-RAF, indépendamment de RAS [23]. Un réarrangement AGK(acylglycerol kinase)/B-RAF a

été récemment identifié au sein d'un CPT classique, secondaire à une irradiation [22]. De petites insertions ou délétions ne décalant pas le cadre de lecture ont également été rapportées [24, 25].

Le fait que la tumorigenèse du CPT puisse être induite, dans des modèles murins, par une expression endogène de l'oncogène B-RAF^{V600E} [26, 27] aussi bien que par une surexpression de ce transgène [28] est un argument important pour impliquer les mutations activatrices de l'oncogène *B-RAF* comme événement inaugurant le développement tumoral. Ces modèles murins suggèrent aussi que cet oncogène joue un rôle dans la progression vers les cancers moins différenciés. Dans un modèle murin, l'expression thyroïde spécifique (promoteur de la thyroglobuline bovine) et inductible par la doxycycline de l'oncogène B-RAF^{V600E}, s'accompagne de l'apparition de CPT, qui régressent lors de l'arrêt de l'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} (suppression de la doxycycline) [29]. Ce modèle démontre la dépendance des CPT vis-à-vis de cet oncogène et de la voie des MAPK (régression des cancers par sevrage en doxycycline, responsable de l'arrêt de l'expression de B-RAF^{V600E} ou par intervention pharmacologique par des inhibiteurs de MEK ou de B-RAF^{V600E}). Ces données plaident en faveur d'une dépendance de la tumeur à l'oncogène initial (« oncogene addiction » des anglo-saxons).

La mutation de l'oncogène *B-RAF* est plus fréquemment identifiée au sein de CPT de forme classique (60% en moyenne) ou à cellules hautes (77%) et moins fréquemment au sein des CPT de forme vésiculaire (12%) [30]. Sur le plan clinique, cette mutation est associée à des critères d'agressivité : invasion extra-thyroïdienne et ganglionnaire, stade clinique plus avancé au diagnostic, taux de récidive, voire même taux de mortalité majorés [7, 31]. Cette mutation est associée plus fréquemment à une perte de la sensibilité de la tumeur à l'iode 131, probablement par diminution de l'expression de gènes responsables du captage de l'iode, notamment celui codant pour le Symporteur Iodure sodium (NIS), et du métabolisme de l'iode [7].

• Les réarrangements chromosomiques impliquant le gène *NTRK1* (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1), aussi appelés réarrangement TRK (<2-5%) sont plus rares que les anomalies décrites ci-dessus. Il s'agit de la fusion du gène *NTRK1*, codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase, à une partie d'un autre gène situé sur le même chromosome (chromosome 1) ou un autre chromosome [32]. Un modèle de souris transgénique TRK-T1 a permis de mieux comprendre le rôle de TRK-T1 dans la genèse des CPT [33]. La perte de l'architecture thyroïdienne normale, l'apparition d'une hyperplasie et

de carcinomes thyroïdiens chez certaines souris avant 7 mois montrent que TRK-T1 est capable de déclencher la tumorigenèse thyroïdienne. Néanmoins, TRK-T1 semble être un oncogène moins puissant que RET/PTC1, puisqu'un peu moins de 50 % des souris transgéniques TRK-T1 développent un CPT contre 100 % pour les autres [11-13]. De plus, la survenue tardive de la plupart des CPT chez les souris suggère que l'oncogène TRK-T1 donne un avantage sélectif aux cellules épithéliales pour survivre mais que la formation de CPT nécessite l'accumulation d'autres anomalies génétiques.

De nouvelles anomalies moléculaires somatiques ont été identifiées au sein de CPT radio induits [22]: des réarrangements entre le gène *ETV6* (ETS pour E-twenty six transcription factor variant 6) et le gène *NTRK3* (neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 3) d'une part et entre le gène *AGK* (acylglycerol kinase) et *B-RAF* d'autre part, conduisant à une activation incontrôlée de la voie MAPK. Les réarrangements NTRK3-ETV6 étaient identifiés au sein de CPT de variante vésiculaire. D'autres gènes de fusions entraînant une surexpression du récepteur nucléaire PPARγ sont rapportés dans cette série dans des CPT de variante vésiculaire [22].

Une mutation activatrice du récepteur de la TSH classiquement identifiée au sein des adénomes toxiques de la thyroïde, a été récemment mise en évidence dans des CPT de variante vésiculaire, dont un était survenu chez un patient exposé dans l'enfance à l'irradiation de l'accident de Chernobyl [22, 34].

Enfin, des réarrangements de ALK (anaplastic lymphoma kinase) ont été décrits dans des CPT, sans autres anomalies moléculaires identifiées, peu différenciés (9%) et anaplasiques (4%), mais aussi dans des CPT bien différenciés (~2%), surtout parmi les survivants des bombes atomiques (~ 50%) [35-38]. L'association entre les réarrangements ALK et un sous-type histologique particulier n'est pas bien établi : certains montrant une association avec les formes classiques [36], d'autres avec les variants vésiculaires [35] ou encore trabéculaire/ solide [38]. Le réarrangement le plus fréquent STRN/ALK implique le gène de la striatine [35]. Enfin, des réarrangements de EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4)-ALK ont été décrits au sein de CPT, en particulier survenus chez des patients ayant survécu aux bombes atomiques, essentiellement dans les CPT de forme trabéculaire/solide [35, 38]. Ces réarrangements ALK sont identifiés de façon mutuellement exclusive avec les autres anomalies moléculaires de la voie MAPK décrites ci-dessus, ce qui laisse penser qu'ils sont directement responsables de l'apparition de tumeurs. Leur potentiel tumorigène a été

démontré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins. La découverte de ces anomalies de ALK ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes : des inhibiteurs de ALK comme le crizotininib diminue la prolifération de lignées cellulaires thyroïdiennes porteuses de réarrangement ALK [35]. L'efficacité du crizotinib a été rapportée chez deux patients ayant un cancer de la thyroïde métastatique évolutif, porteur d'un réarrangement ALK : une efficacité spectaculaire chez une patiente avec cancer anaplasique [37] et une stabilisation chez un patient avec cancer papillaire à cellules hautes [39].

Dans les CPT, ces évènements moléculaires perturbant la voie des MAPK ont deux caractéristiques importantes:

- un caractère, le plus souvent, mutuellement exclusif: une seule anomalie est présente au sein d'un carcinome. Ceci suggère qu'un événement moléculaire isolé de la voie suffit à l'activer de façon constitutive et à favoriser la prolifération tumorale. Il a néanmoins été décrit des CPT présentant simultanément un réarrangement RET/PTC et une mutation activatrice de B-RAF [40, 41].
- ces anomalies ont pour conséquence commune l'activation constitutive de la voie des MAPK se traduisant par une activation de ERK par phosphorylation, qui va favoriser une prolifération incontrôlée (figure 5).

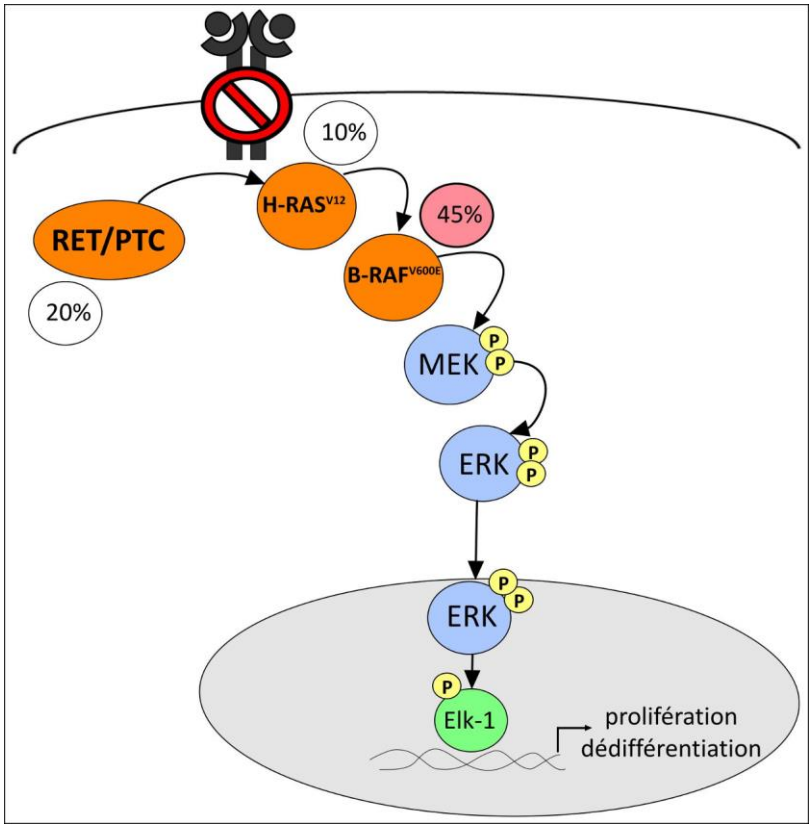

Figure 5. Schéma des principales anomalies moléculaires de la voie MAPK identifiées dans les cancers papillaires de la thyroïde. Les 3 principales anomalies moléculaires identifiées au sein des carcinomes papillaires sont : les réarrangements chromosomiques de type RET/PTC dans 20% des cas, les mutations ponctuelles activatrices des isoformes de RAS (comme H-RAS^{V12}) dans 10% des cas et les mutations de l'oncogène *B-RAF* dans 45 % des cas. La mutation quasi exclusivement identifiée de l'oncogène *B-RAF*, est la mutation ponctuelle B-RAF^{V600E}. Ces anomalies sont responsables d'une activation constitutive de la voie MAPK responsable de l'activation de nombreux facteurs de transcription, comme Elk-1 (Ets-like transcription factor 1), activant la transcription de gènes conduisant à terme à une prolifération incontrôlée et une dédifférenciation.

En résumé, les anomalies moléculaires responsables d'une activation constitutive de la voie MAPK joue un rôle clé dans la tumorigenèse thyroïdienne. Les mutations activatrices de l'oncogène *B-RAF* sont les plus fréquentes et responsables d'une plus grande agressivité tumorale en comparaison à des CPT porteurs d'autres anomalies. Il est important de souligner que ces différentes mutations, bien que touchant la même voie de signalisation, semblent donc avoir un impact variable sur la croissance et le potentiel invasif des cellules tumorales. Les hypothèses physiopathologiques permettant de l'expliquer sont loin d'être complètement élucidées. La meilleure compréhension des mécanismes d'activation de la voie MAPK est fondamentale, en particulier pour les CPT mutés au niveau de l'oncogène *B-RAF*, compte tenu de l'impact pronostique.

3. L'oncogène *B-RAF*.

B-RAF fait partie de la cascade de signalisation RAF-MEK-ERK qui régule la croissance cellulaire, la prolifération et la différentiation en réponse à une stimulation par des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones [42]. Il fait partie d'une famille de 3 sérine/thréonine kinases incluant A-RAF et C-RAF (aussi nommée Raf-1). Chacune de ces protéines est codée par un gène situé chez l'humain sur les chromosomes X, 7 et 3 respectivement pour A-RAF, B-RAF et C-RAF. A-RAF est la plus petite des isoformes (68 kDa) ; C-RAF a une masse de 72-74 kDa. B-RAF est soumis à un épissage alternatif produisant différentes isoformes de 75 à 100 kDa. Les 3 protéines RAF partagent la même structure et sont formées de 3 régions conservées : CR1, CR2 et CR3. La région CR1, à l'extrémité N-terminale, contient un domaine de liaison à RAS et un domaine riche en cystéines, tous les 2 nécessaires pour le recrutement de RAF à la membrane plasmique. La région CR2 contient un domaine de liaison à la protéine 14-3-3 qui maintient RAF dans une conformation inactive, dans le cytoplasme, à l'état basal. La région CR3, à l'extrémité C-terminale, contient le domaine catalytique. A l'état basal, RAF adopte une conformation dans laquelle l'extrémité N-terminale inhibe le domaine catalytique C-terminal. L'ARNm C-RAF est exprimé de façon ubiquitaire ; l'expression de A-RAF est plus restreinte et prédomine dans les tissus uro-génitaux ; B-RAF est également exprimé dans un grand nombre de tissu, mais son expression prédomine nettement dans les tissus neuronaux [43].

3.1. Régulation de RAF.

A l'état basal, RAF est maintenue dans une conformation inactive, dans le cytosol par son association avec la protéine 14-3-3 et possiblement aussi la protéine CNK (Connector Enhancer of Kinase suppressor of RAS) [44]. Après stimulation par un facteur de croissance, RAF est recruté à la membrane plasmique où il interagit avec RAS activé via les domaines de liaison à RAS et riche en cystéines de RAF. La liaison de RAS modifie l'interaction de RAF avec 14-3-3, rendant certaines sérines phosphorylées accessibles à la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A). La déphosphorylation de ces sites entraine un changement de conformation de RAF lui permettant d'être la cible d'autres modifications activatrices, comme la phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) et src (sarcoma kinase) [44]. L'activation complète de A-RAF et C-RAF, tout comme B-RAF nécessite une

phosphorylation de multiples sites. A-RAF et C-RAF sont activés par des mécanismes assez similaires. Les 5 sites majeurs de phosphorylation sont conservés au sein des protéines A-RAF et C-RAF. En revanche, seuls 4 de ces 5 sites sont conservés au sein de B-RAF et seulement 3 d'entre eux ont une fonction similaire en comparaison avec C-RAF. La phosphorylation de la thréonine 598 et de la sérine 601 est essentielle pour l'activation de B-RAF, tout comme pour celle de C-RAF. En revanche, la région régulatrice chargée négativement (nommée « N-region ») contient une sérine conservée entre les 3 isoformes de RAF, mais qui est constitutivement phosphorylée pour B-RAF, au contraire de C-RAF. Cette « N-region » est chargée négativement de façon constitutive pour B-RAF, au contraire de A-RAF et C-RAF où elle doit être chargée négativement pour permettre l'activation de ces isoformes. Ainsi, l'activité kinasique basale de B-RAF est élevée comparée à celle de A-RAF et C-RAF. Certains auteurs ont proposé que ces différences puissent expliquer la fréquence des mutations de B-RAF en pathologie cancéreuse humaine, par comparaison avec les mutations de A-RAF et C-RAF : la charge constitutivement négative de la « N-region » et l'activité kinasique basale de B-RAF élevée pourrait expliquer qu'une simple substitution d'un acide aminé par un autre puisse stimuler considérablement l'activité kinasique de B-RAF [43 , 45]. Ainsi, l'introduction dans C-RAF d'une mutation équivalente à la mutation B-RAF^{V600E} n'augmente l'activité kinasique de C-RAF par rapport à la forme sauvage que de 45 fois, à comparer à une activation de B-RAF^{V600E} environ 500 fois plus puissante que B-RAF sauvage [45]. En conséquence, cette mutation de C-RAF^{V492E} n'a pas de potentiel oncogénique [45].

Une étape clé permettant l'activation de RAF est également la formation d'homodimères ou d'hétérodimères entre les 3 isoformes de RAF.

L'activation de RAF entraine l'activation de MEK suite à sa phosphorylation, puis celle de ERK. L'activation complète de MEK est obtenue seulement après phosphorylation par RAF et PAK1 (p21 protein (Cdc42/Rac) –activated kinase1) [44]. MEK est la seule cible connue des protéines RAF. NF-κB, la protéine pro-apoptotique BAD (Bcl-2-associated death promoter) et ASK-1 (apoptosis signal-regulated kinase-1) ont été proposées comme étant des effecteurs de C-RAF, sans preuve convaincante [43].

3.2 Les anomalies moléculaires de RAF en pathologie maligne et bénigne.

Plus de 45 mutations ont été identifiées dans le gène *B-RAF* dans une large variété de cancers humains. L'oncogène *B-RAF* est muté dans approximativement 7% des cancers humains [46]. La plupart de ces mutations concernent des acides aminés conservés entre les 3 isoformes de RAF [43, 46]. La substitution d'une thymine par une adénine en position 1799 du gène, responsable d'un changement d'une valine en glutamine en position 600 (mutation nommée B-RAF^{V600E}) représente 90% des mutations identifiées. Cette mutation est située dans le domaine catalytique de la kinase et la rend environ 500 fois plus active que B-RAF sauvage activée par RAS [47]. Au contraire de la protéine sauvage, le mutant B-RAF^{V600E} est capable d'activer MEK sans dimérisation préalable (figure 6.A.). La majorité des autres mutations identifiées de B-RAF sont situées dans la région CR3 de la protéine, au sein du domaine catalytique et d'une boucle riche en glycine. Certains mutants de B-RAF altèrent l'activité kinasique (réduction de l'activité de 30 à 80% par rapport à B-RAF sauvage activée par RAS). Ces mutants sont malgré tout capables d'entrainer l'activation constitutive de la voie MAPK, grâce à une interaction avec C-RAF qui active alors en aval MEK [47-49]. Comme évoqué ci-dessus, les mécanismes d'activation de B-RAF pourraient expliquer la fréquence élevée de mutations du gène *B-RAF* identifiées en cancérogenèse humaine [43, 45], par comparaison avec *A-RAF* et *C-RAF*. Au contraire, pour A-RAF et C-RAF, rarement mutées en pathologie cancéreuse humaine, ayant une activité kinasique basale faible et dont l'activation nécessite plusieurs évènements moléculaires successifs, de simples mutations ponctuelles ne seraient pas suffisantes pour entrainer leur activation constitutive. Néanmoins, des mutations de ces deux kinases ont été identifiées dans des cancers pulmonaires, colorectaux, ainsi que dans des cancers de l'estomac, de la prostate, du poumon et de la vessie pour A-RAF et dans des mélanomes, des cancers ORL et du pancréas pour C-RAF (TCGA ; http://www.cbioportal.org, [50]). Des réarrangements de C-RAF ont été décrits au sein de cancers de la prostate [51]. En revanche, aucune mutation de A-RAF ou C-RAF n'a été identifiée dans les CPT [52]. Des mutations somatiques activatrices de A-RAF ont également été décrites en pathologie bénigne : l'histiocytose à cellules de Langerhans [53]. Des réarrangements de C-RAF ont été décrits au sein d'astrocytomes pilocytiques [54].

La mutation de l'oncogène *B-RAF* est identifiée en dehors des cancers de la thyroïde, principalement dans les mélanomes et les leucémies à tricholeucocytes. Les cancers dans lesquels sont identifiés des mutations de *B-RAF* et leurs fréquences sont résumés dans le

tableau 1 [46, 55, 56 , 57]. Une mutation de *B-RAF* peut être identifiée dans des cancers où l'oncogène *RAS* est également impliqué. Les mutations B-RAF^{V600E} et de RAS surviennent de façon mutuellement exclusive [58], suggérant qu'un seul évènement suffit à entrainer une activation constitutive de la voie MAPK. La cooccurrence de mutation B-RAF non V600E et de RAS a été rarement décrite, notamment au sein d'adénocarcinome du pancréas (fréquence : 7-14%) [58, 59].

Des mutations somatiques B-RAF^{V600E} sont également fréquemment identifiées dans des pathologies bénignes non thyroïdiennes (tableau 1) [60-63].

Tableau 1. Fréquence des mutations de l'oncogène *B-RAF* dans les cancers et les pathologies bénignes.

	Pathologies	Fréquence des mutations
Cancers	Leucémie à tricholeucocytes	~ 100%
	Mélanome	40 – 70 %
	Cancer papillaire thyroïdien	40 - 50%
	Adénocarcinome pulmonaire	10 %
	Cancer colo-rectal	10%
	Adénocarcinome pancréatique	5-15%
	Cancer de l'ovaire	2-5%
	Cancer de vessie	2-5%
	Cholangiocarcinome	2-5%
	Cancer de l'endomètre	2-4%
	Cancer du col utérin	1-2%
	Cancer de la prostate	2%
	Sarcomes	<2%
	Carcinome hépato-cellulaire	<2%
	Cancer du pancréas	<2%
	Adénome de l'ampoule de Vater avec lésion de carcinome in situ	-[1]
Pathologies bénignes	Histiocytoses à cellules de Langherhans	40-70%
	Maladie d'Erdheim-Chester	50%
	Craniopharyngiome papillaire	95%

[1] une seule publication : séquençage de *B-RAF* au sein de 7 adénomes de l'ampoule de Vater, 7 adénomes de l'ampoule de Vater avec lésion de carcinome in situ et 21 carcinomes de l'ampoule de Vater [64]

Des réarrangements de *B-RAF* ont été également été décrits en dehors des CPT (tableau 2) [65-67].

Tableau 2. Réarrangements *B-RAF* dans les cancers et les pathologies bénignes.

Pathologies	Type de réarrangement
Mélanomes	PAPSS1-B-RAF, TRIM24-B-RAF, TAX1BP1-B-RAF, CDC27-B-RAF, MARVELD1-B-RAF, AGK-B-RAF, HSPBAP1-B-RAF.
Astrocytomes	KIAA1549-B-RAF, FAM131B-B-RAF
Cancers de l'estomac	SND1-B-RAF, AGTRAP-B-RAF
Cancers de la prostate	SLC45A3-B-RAF, B-RAF-EPB41
Nævus mélanocytaires géants congénitaux	FCHSD1-B-RAF

Des mutations germinales de B-RAF et C-RAF sont associés au syndrome LEOPARD (acronyme constitué à partir des signes cliniques en anglais de ce syndrome : **L**entigines, **E**lectrocardiographic conduction abnormalities, **O**cular hypertelorism, **P**ulmonary stenosis, **A**bnormal genitalia, **R**etarded growth, **D**eafness) maladie rare associant de multiples anomalies congénitales, principalement cutanées, faciales et cardiaques [68-70]. Des mutations germinales de *C-RAF* et beaucoup plus rarement de *B-RAF*, sont associées au syndrome de Noonan (associant cardiopathie congénitale, nanisme, problèmes d'apprentissage, aspect inhabituel du thorax, anomalies de la coagulation sanguine et faciès caractéristique) [67]. L'activation de la voie MAPK joue un rôle central dans ce syndrome : des mutations germinales de N-RAS, K-RAS, MEK1 et MEK2 ont également été décrites [71]. Aucun de ces syndromes ne s'accompagne de pathologies cancéreuses notamment thyroïdiennes, soulignant l'impact physiopathologique différent de ces mutations selon leur statut germinal ou somatique.

3.3 La mutation B-RAF : un facteur de mauvais pronostique des cancers ?

La présence d'une mutation B-RAF au sein d'un CPT de la thyroïde est associé à des critères clinico-pathologiques d'agressivité. De nombreuses études rétrospectives et des méta-analyses démontrent une association significative entre la présence d'une mutation B-RAF et le sexe masculin (reconnu comme facteur de mauvais pronostic), la taille tumorale (plus grande), la présence de métastases ganglionnaires, d'une extension extra-thyroïdienne minime, d'une multifocalité tumorale, de variant histologique agressif (cellules hautes), l'absence de capsule tumorale et un diagnostic à des stades tardifs (III et IV) [30, 72, 73]. De nombreuses études sont en faveur d'un risque accru de récidive [74-80]. Une association positive entre risque de mortalité et mutation B-RAF a été décrite par certains auteurs [31, 76]. Néanmoins, cette association n'est pas toujours indépendante des facteurs pronostiques classiques (métastases ganglionnaires cervicales et à distance, extension extra-thyroïdienne) [31]. Le rôle pronostique de la mutation B-RAF dans les mélanomes a également largement été étudié. Néanmoins, les études disponibles sont souvent limitées par le faible nombre de patients analysés et leur caractère le plus souvent rétrospectif [81]. Le caractère péjoratif de la mutation semble plus discuté que pour les cancers de la thyroïde. Certaines études ont montré une durée de réponse sous chimiothérapie plus faible chez les patients ayant un mélanome mutés B-RAF que chez les autres [82, 83]. D'autres études ont démontré une association entre la mutation B-RAF et la survenue de métastases hépatiques ou multi-sites, sans effet péjoratif sur la survie néanmoins [84]. D'autres études ne mettent en évidence aucun effet pronostique péjoratif de la mutation B-RAF [81]. Enfin, certains concluent que la présence de la mutation B-RAF dans la tumeur primitive n'impacte pas le pronostic défavorablement, au contraire de sa mise en évidence au sein d'une métastase [85].

Le rôle pronostic de la mutation B-RAF dans les cancers colorectaux n'est pas facile à étudier car elle est souvent associée à d'autres altérations moléculaires pronostiques de ce cancer comme l'instabilité de microsatellites ou l'hyperméthylation d'îlots CpG. Certains auteurs ont montré que la mutation B-RAF identifiée au sein de cancers colorectaux métastatiques « K-RAS sauvages » réfractaires aux chimiothérapies classiques était un facteur de risque de faible taux de réponse au cetuximab (anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'EGF) [86, 87] et de survie sans progression plus courte [87]. D'autres ont montré que le statut B-RAF n'était pas corrélé à la réponse aux chimiothérapies classiques seules ou en association à des antiangiogéniques (bevacizumab) [88, 89]. De nombreuses études rétrospectives n'ont pu

démontrer un rôle défavorable de la mutation B-RAF que dans les sous-groupes de cancers colorectaux sans instabilité de microsatellite ou avec hyperméthylation d'îlots CpG [81].

3.4 Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'agressivité des CPT mutés B-RAF.

De nombreuses publications ont tenté de comprendre la plus grande agressivité des CPT mutés B-RAF par rapport aux cancers thyroïdiens porteurs d'autres anomalies moléculaires ou sans anomalie identifiée (Tableau 3).

Tableau 3. Résumé des hypothèses physiopathologiques expliquant l'agressivité des CPT avec mutation B-RAF.

Hypothèses	Références
Diminution de l'expression du NIS et défaut d'adressage à la membrane plasmique	[29, 30, 80, 90-95]
Surexpression de métalloprotéases et E-cadherine favorisant la transition épithélium-mésenchyme	[96, 97]
Activation de la voie TGFβ responsable du phénomène de transition épithélium-mésenchyme	[91, 98]
Instabilité chromosomique	[99]
Activation de la voie NFκB	[49]
Méthylation aberrante de gènes suppresseurs de tumeurs et micro-ARN	[72, 100]
Surexpression de protéines impliquées dans la progression tumorale comme le VEGF ou le récepteur à activité tyrosine kinase, c-Met	[30]
Activation puissante de la voie MAPK	[101, 102]

Plusieurs études ont démontré une **diminution de l'expression du NIS** (symporteur iodure sodium) et de gènes spécifiques de la thyroïde responsables notamment du captage intra-thyroïdien de l'iode, susceptible d'expliquer la perte de sensibilité à l'irathérapie [29, 30, 90-94]. Ceci a été démontré récemment dans un modèle de souris transgéniques exprimant

l'oncogène B-RAF^{V600E} spécifiquement dans les cellules folliculaires thyroïdiennes (oncogène en aval du promoteur de la *thyroglobuline*), sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline [29]. Il s'agissait d'un modèle original « on/off » : le traitement par doxycycline permet « d'allumer » l'expression de l'oncogène et l'interruption de ce traitement permet de « l'éteindre ». Les souris traitées par doxycyline développaient toutes des carcinomes thyroïdiens récapitulant les caractéristiques de CPT, avec présence pour certaines tumeurs d'une extension extra-thyroïdienne locale et d'une composante anaplasique. Les CPT de toutes les souris régressaient après arrêt de la doxycycline, conséquence d'une mort cellulaire par apoptose. Ainsi, en 2 à 7 semaines, toutes les souris avaient à nouveau une histologie thyroïdienne normale. L'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} entrainait une hypothyroïdie et une diminution de l'expression de gènes spécifiques de la thyroïde, notamment du Symporteur Iodure Sodium (NIS), mise en évidence au niveau de l'ARNm et de la protéine, avec comme conséquence une diminution du captage intra-thyroïdien de l'iode, mis en évidence par tomographie à émission de positron (TEP). L'interruption du traitement par doxycycline permettait un retour à la normale ou presque de l'ensemble de ces paramètres et notamment une réexpression du NIS (ARNm et protéine). Cette répression de l'expression du NIS semble dépendante de l'activation de la voie TGFβ [91] et de la désacétylation des histones du promoteur du *NIS*, induites par l'oncogène *B-RAF* [103]. La diminution de l'expression du NIS, ainsi que d'autres gènes spécifiques de la thyroïde comme celui de la thyroglobuline, de la thyroperoxydase et du récepteur de la TSH a également été démontrée chez des patients porteurs de CPT et était plus importante chez ceux ayant une mutation B-RAF par rapport aux patients « *B-RAF* sauvage » [90, 95, 104]. En plus, d'une diminution de l'expression du NIS, celui-ci ne serait **plus adressé à la membrane plasmique** [80, 90].

L'expression de l'oncogène *B-RAF* dans des lignées cellulaires est capable d'induire une **surexpression de métalloprotéases** de la matrice extra-cellulaire favorisant la migration et l'invasion cellulaire [96] et une diminution d'expression de **E-cadherine** impliquée dans la **transition épithélium-mésenchyme** [97].

L'oncogène *B-RAF* est responsable de l'**activation de la voie TGFβ,** impliquée dans l'adhésion et les jonctions intercellulaires, avec pour conséquence une transition épithélium-mésenchyme. Cette activation favorise la migration cellulaire et la dédifférenciation. Ceci a été démontré dans un modèle de cellules PCCL3 de thyroïde de rat, exprimant spécifiquement l'oncogène *B-RAF* de façon inductible [98] et dans un modèle de souris exprimant l'oncogène *B-RAF* dans la thyroïde, sous le contrôle du promoteur de la *thyroglobuline* bovine [91].

L'induction par doxycycline de l'oncogène B-RAF^{V600E} dans la lignée cellulaire PCCL3 entraine une **instabilité chromosomique,** qui favoriserait l'acquisition d'évènements génétiques secondaires responsables de l'agressivité de ces tumeurs [99].

B-RAF^{V600E} est également capable d'**activer** la **voie NF-κB** favorisant la résistance à l'apoptose, la prolifération, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire, en régulant l'expression de différentes protéines, notamment des métalloprotéases de la matrice extra-cellulaire et le VEGF, par exemple [49].

Il existe une association entre l'expression de l'oncogène *B-RAF* et la **méthylation aberrante** et donc l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [100] ou de micro-ARN ayant un rôle suppresseur de tumeurs [30].

Des données dans des lignées dérivées de mélanome humain suggèrent que B-RAF^{V600E} puisse être un **puissant activateur de la voie MAPK**, plus puissant que l'oncogène *RAS* [101]. Ceci semble également être retrouvé pour des lignées dérivées de cancer de la thyroïde humain [102]. Les niveaux de MEK activé étaient plus élevés dans deux lignées cellulaires dérivées de CPT mutés B-RAF, en comparaison à une lignée porteuse d'un réarrangement RET/PTC. Dans ce même travail, les auteurs avaient analysé les niveaux d'ARNm de Spry 2, appartenant à la famille Sprouty, régulant négativement l'activation de la voie MAPK dans 30 CPT humains dont 10 étaient mutés B-RAF. La surexpression de Spry2 plus importante dans les CPT mutés B-RAF par rapport aux autres CPT suggérait un degré d'activation de la voie MAPK plus important dans le premier cas que dans le second.

Récemment, la coexistence de mutation B-RAF^{V600E} et du promoteur de *TERT* (telomerase reverse transcriptase) a été décrite comme fréquente au sein de sous type histologique agressif de CPT, comme ceux à cellules hautes ou au sein de cancers peu différenciés et anaplasiques [105 , 106]. Le gène *TERT* code pour la sous-unité catalytique de la télomérase, un complexe de ribonucléoprotéine jouant un rôle dans l'immortalité cellulaire en maintenant la longueur des télomères à l'extrémité des chromosomes. Différents arguments documentent le rôle de TERT dans la tumorigenèse : surexpression dans de nombreux cancers [107], apparition de cancers dans des modèles murins transgéniques où TERT est surexprimé [107]. Des mutations du promoteur de *TERT* (C228T et C250T) ont été identifiés au sein de cancers thyroïdiens différenciés, peu différenciés et anaplasiques, ainsi qu'au sein d'autres cancers notamment de mélanomes [105 , 106 , 108 , 109 , 110]. Ces mutations entrainent une augmentation de la transcription de TERT en créant un élément de réponse pour un facteur de transcription de la famille ETS, lui-même régulé positivement par la voie MAPK. Ainsi, la

mutation B-RAF^{V600E} responsable d'une activation puissante, constitutive de la voie MAPK va être responsable d'une surexpression du gène TERT, via l'activation de la liaison des facteurs de transcription ETS au site crée sur le promoteur de TERT muté. Ce mécanisme original pourrait expliquer l'agressivité (caractéristiques histo-pronostiques péjoratives et récidives fréquentes) des cancers de la thyroïde où les 2 mutations sont identifiées.

3.5 Mutation de B-RAF et thérapies ciblées.

L'identification de mutations de B-RAF dans de nombreux cancers humains a conduit au développement d'inhibiteurs ciblant cette kinase (tableau 4). Certaines de ces thérapies, comme le vemurafenib (PLX4032), le PLX4720 ou le dabrafenib, sont relativement spécifiques de la forme mutée B-RAF^{V600E}. D'autres inhibiteurs, comme le sorafenib inhibent les 3 sous-unités de RAF et B-RAF^{V600E} (« inhibiteur pan-RAF ») ainsi que d'autres kinases (tableau 4). Les inhibiteurs de B-RAF^{V600E} (vemurafenib, dabrafenib, PLX4720) limitent l'activation de ERK et la prolifération de lignées cellulaires humaines de mélanome et de xénogreffes de souris mutées B-RAF^{V600E} [111, 112].

Tableau 4. Inhibiteurs de B-RAF.

Inhibiteurs	Cibles	Concentration inhibitrice 50	Références
Sorafenib	KDR[a], FLT4[b], VEGFR1-3[c], PDGFR[d], RET, c-Kit, B-RAF, C-RAF	B-RAF : 25 nM B-RAF^{V600E} : 37 nM C-RAF : 6 nM VEGFR1 : 26 nM c-Kit : 68 nM	[113-115]
Vemurafenib (PLX4032)	B-RAF^{V600E}	B-RAF^{V600E} : 31 nM C-RAF : 48 nM B-RAF : 100 nM	[116, 117]
PLX4720	B-RAF^{V600E}	B-RAF^{V600E} : 13 nM	[117, 118]

		B-RAF : 160 nM C-RAF muté : 6.7 nM	
Dabrafenib	B-RAF^{V600E}	B-RAF^{V600E} : 0.6 nM B-RAF : 3.2 nM C-RAF : 5 nM	[119]

[a] KDR : kinase insert domain receptor (récepteur à activité tyrosine kinase),
[b] FLT4 : Fms-related tyrosine kinase 4 (récepteur à activité tyrosine kinase),
[c] VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor,
[d] PDGFR : platelet-derived growth factor receptor.

Une caractéristique notable de ces inhibiteurs de B-RAF^{V600E} est l'inhibition de la voie MAPK uniquement si la tumeur est porteuse d'une mutation de B-RAF (figure 6.B.) [120]. La voie MAPK est paradoxalement activée dans certaines lignées cellulaires humaines (cancer colorectal, cancer du sein, cancer du poumon, cancer hépatocellulaire) avec l'oncogène *B-RAF* sauvage (non muté), traitées par ces inhibiteurs, et en particulier si elles sont porteuses d'une mutation de RAS (figure 6.C et 6.D) [121-123]. Deux mécanismes assez proches ont été proposés pour expliquer cette activation paradoxale. Le premier mécanisme évoqué est la levée de l'auto-inhibition de la protéine B-RAF sauvage (figure 6.C) : dans les cellules tumorales où RAS est muté, B-RAF est principalement séquestré dans le cytoplasme dans une configuration inactive suite à son auto-phosphorylation. Il a été démontré que la liaison de l'inhibiteur de B-RAF^{V600E} à la protéine B-RAF sauvage conduisait à la levée de son auto-inhibition et donc son recrutement à la membrane plasmique où il forme alors un dimère avec C-RAF permettant l'activation de la voie en aval [121]. Le second mécanisme évoqué est la transactivation de dimères de RAF (figure 6.D.) [122] : à faibles concentrations (0.3 à 10 µM) la liaison de l'inhibiteur de B-RAF à l'un des protomères d'un dimère de RAF entraine une inhibition du protomère qui est lié à l'inhibiteur mais une transactivation de l'autre protomère suite à une modification conformationnelle de ce dernier entrainant ainsi une activation de la voie de signalisation en aval. A des concentrations croissantes (30 µM), les deux partenaires du dimère sont liés par un inhibiteur, aboutissant à l'inactivation de la voie ERK (figure 6.D.). Ainsi, tous les mécanismes favorisant l'activation de RAS et donc la formation de dimère de RAF sont susceptibles d'être responsables de l'apparition de résistance pharmacologique. Par conséquent, les inhibiteurs de B-RAF sont efficaces majoritairement dans les cellules où le niveau d'activation de RAS est faible et où donc RAF existe essentiellement sous la forme de

monomère. C'est le cas des mélanomes B-RAF^{V600E}, en raison des rétrocontrôles négatifs s'exerçant en amont de B-RAF [124]. Une toxicité habituelle des inhibiteurs de RAF est le développement de tumeurs cutanées bénignes, fréquemment porteuses de mutation de RAS [125, 126]. L'activation paradoxale de la voie MEK-ERK dans les cellules B-RAF sauvages serait à l'origine de ces tumeurs secondaires [126]. Les thérapies combinant l'inhibition de B-RAF et en aval de MEK pourraient diminuer l'incidence de ces tumeurs secondaires.

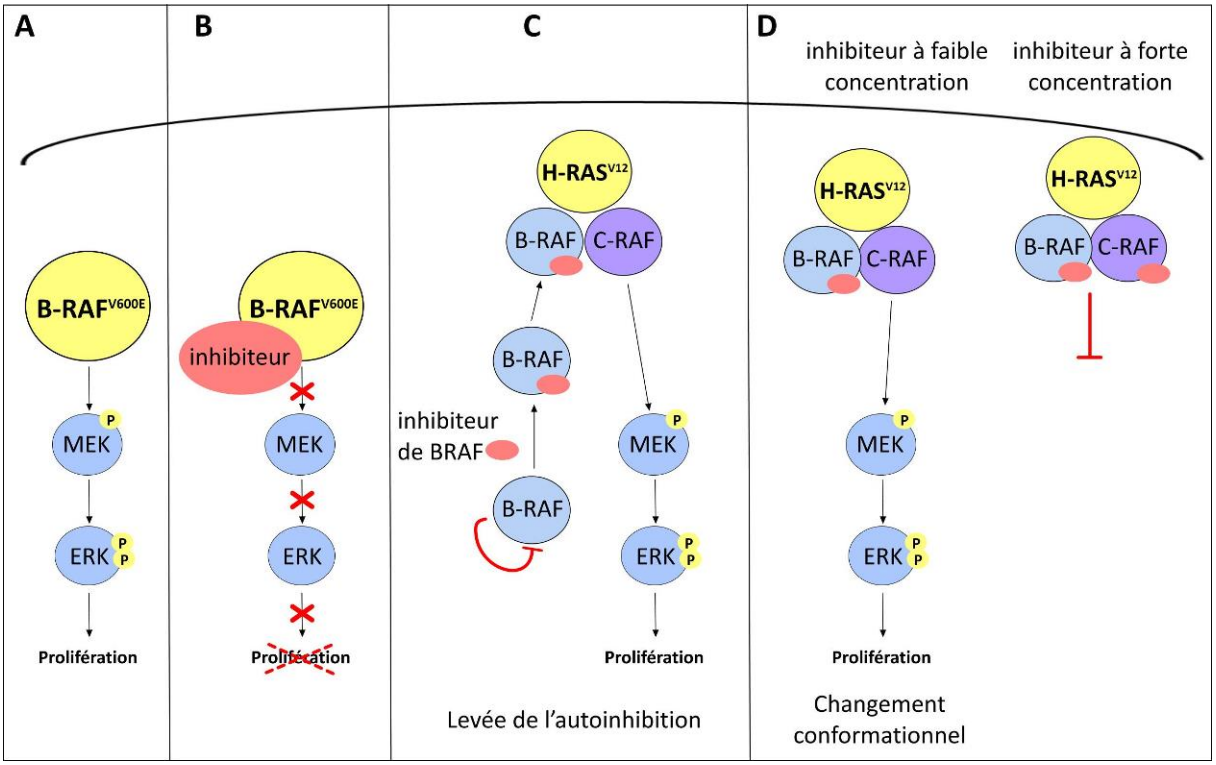

Figure 6. Activation paradoxale de la voie MEK-ERK dans des tumeurs traitées par inhibiteurs de B-RAF^{V600E}. **A.** Activation de la voie par l'oncogène B-RAF^{V600E}. **B.** Effet d'un inhibiteur B-RAF^{V600E} dans des tumeurs mutées B-RAF^{V600E}. **C.** Effet d'un inhibiteur B-RAF^{V600E} dans des tumeurs mutées RAS. B-RAF est séquestré dans le cytosol dans une conformation inactive. L'ajout d'un inhibiteur de B-RAF^{V600E}, entraine une levée de l'auto-inhibition de B-RAF, son recrutement à la membrane plasmique où il dimérise avec C-RAF et active ainsi la voie en aval. **D.** Un autre mécanisme de résistance repose sur des changements conformationnels de B-RAF et C-RAF, suite à la liaison de l'inhibiteur à des protomères RAF, capables d'entrainer une transactivation du protomère non lié à l'inhibiteur. A de forte concentration, l'inhibiteur se lie à tous les membres du dimère de RAF et bloque l'activation de la voie.

L'efficacité clinique démontrée de ces inhibiteurs pour les patients ayant des mélanomes porteurs de la mutation B-RAF^{V600E} est sans précédent [117, 127-131]. Bien que les données *in vitro* tendent à démontrer une relative résistance des lignées cellulaires dérivées de cancers thyroïdiens humains, dont le mécanisme moléculaire est détaillé plus bas [132], les données

cliniques préliminaires démontrent une certaine efficacité de ces inhibiteurs de B-RAF^{V600E} chez les patients atteints de CPT [129, 133, 134] ou de cancers anaplasiques de la thyroïde [132, 135]. Une réponse partielle et 2 stabilisations avec un délai avant progression compris entre 11 et 13 mois, avaient été observées pour les 3 patients ayant un CPT avec une mutation B-RAF^{V600E} inclus dans une étude de phase I avec le vemurafenib, dans laquelle avait également été inclus 49 patients ayant un mélanome métastatique B-RAF^{V600E} [129, 133]. Une étude de phase II avec le vemurafenib, a inclus 25 patients ayant précédemment reçu un inhibiteur de VEGFR2 et 26 naïfs de ces inhibiteurs. Une réponse partielle ou stabilisation de la maladie était observé respectivement chez 38 et 58% des patients respectivement dans le premier et le deuxième groupe (données provenant de « European CanCer Organisation »). La médiane de survie sans progression était respectivement de 16 et 6 mois. Ainsi l'efficacité du vemurafenib paraissait intéressante particulièrement dans le groupe naïf d'anti-angiogéniques. Dans une étude rétrospective de 25 patients, ayant un cancer thyroïdien différencié, traités en première ligne par du sorafenib interrompu pour progression et/ou toxicité inacceptable, 3 d'entre eux avaient reçu du vemurafenib en 2ème ligne. Parmi ces 3 patients, 2 d'entre eux présentaient une réponse partielle sous vemurafenib alors que la maladie était stable sous sorafenib [134]. Concernant le vemurafenib, toujours, une réponse spectaculaire avec quasi disparition de métastases pulmonaires diffuses et possibilité de sevrage de l'oxygénothérapie mise en route initialement, a été observée chez un patient âgé de 51 ans ayant un cancer anaplasique de la thyroïde avec mutation B-RAF^{V600E} [135]. Enfin, 14 patients ayant un CPT de la thyroïde avec une mutation B-RAF^{V600E} ont été inclus dans une étude évaluant le dabrafenib en phase I pour 184 patients avec tumeurs solides métastatiques évoluées (dont 156 mélanomes). Parmi les 9 patients avec CPT évaluables, 3 présentaient une réponse partielle [136]. Il n'existe à l'heure actuelle que des données pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* pour le cancer de la thyroïde concernant le PLX4720 [137]. Dans l'ensemble de ces études, ces inhibiteurs étaient relativement bien tolérés avec des effets secondaires modérés (asthénie, perte de poids, alopécie, altération du goût). L'effet secondaire principal est l'apparition de lésions secondaires cutanées bénignes ou malignes, possiblement liées à une activation paradoxale de la voie MAPK dans les cellules B-RAF sauvage, dont le mécanisme moléculaire est détaillé ci-dessus. Le développement de tumeurs latentes non cutanées avec mutation RAS a déjà été décrite dans ce contexte, notamment la progression rapide d'une leucémie avec mutation N-RAS méconnue chez un patient ayant un mélanome avec mutation B-RAF^{V600E} traité par vemurafenib [138]. Dans ce cas, l'administration intermittente de

vemurafenib et l'ajout d'un inhibiteur de MEK, le cobimetinib, ont permis de contrôler les 2 pathologies malignes pendant près de 20 mois.

Des inhibiteurs sélectifs de MEK ont également démontré un bénéfice clinique pour des patients atteints de mélanome muté pour B-RAF, en accord avec les données *in vitro* [139], bien qu'avec des taux de réponse plus faible que ceux observés avec les inhibiteurs de B-RAF [140]. Ces inhibiteurs ont également une efficacité pour limiter l'activation de ERK et la prolifération de lignées cellulaires humaines de cancer de la thyroïde [141]. Les données cliniques préliminaires pour les patients atteints de CPT montrent une certaine efficacité des inhibiteurs de MEK. Parmi les 32 patients ayant un CPT réfractaire à l'iode avec des métastases évolutives, inclus dans une phase II concernant le selumetinib, 54% d'entre eux présentaient une stabilisation de la maladie et 3% une réponse partielle. La survie médiane sans progression était de 8 mois. Cette survie était meilleure pour les patients ayant un cancer avec une mutation de B-RAF (un peu plus de 8 mois) que sans anomalie de cet oncogène (un peu moins de 3 mois) [142]. Plusieurs autres études de phase II concernant différents inhibiteurs de MEK utilisés seuls ou en association avec des inhibiteurs de B-RAF^{V600E} sont en cours aux Etats-Unis pour les patients atteints de cancer de la thyroïde [10]. L'utilisation d'inhibiteurs de MEK semble particulièrement intéressante pour « re-différencier » les cellules tumorales et les rendre sensibles à l'iode (discuté dans le paragraphe 3.9).

3.6 Inhibiteurs de B-RAF : le problème des résistances primaires et acquises.

Bien qu'une réponse aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} soit observée chez la majorité des patients ayant un mélanome muté pour B-RAF, celle-ci est très variable et les réponses complètes sont rares. Ces inhibiteurs posent le problème de résistance acquise (secondaire). La durée médiane de réponse à ces inhibiteurs dans de nombreux essais cliniques (conduits majoritairement chez des patients ayant un mélanome) était d'environ 6 mois avec des progressions de la maladie dans l'année suivant le début du traitement [143]. Ces thérapies posent également le problème de résistance intrinsèque (primaire). Ainsi, moins de 5% des patients atteints de cancer colorectal B-RAF^{V600E} vont répondre à ces inhibiteurs [117, 144]. Des données précliniques, démontrant une relative résistance des lignées cellulaires humaines de cancer colorectal, laissaient présager ces mauvaises réponses [132, 145]. Les données cliniques préliminaires concernant les cancers du poumon révèlent également une réponse au

dabrafenib moins bonne que pour les mélanomes [146]. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces résistances font l'objet d'une recherche intensive à l'heure actuelle.

Il découle du modèle expliquant la sélectivité des inhibiteurs de B-RAF, détaillé ci-dessus, que tout évènement capable de promouvoir la dimérisation de RAF secondaire à l'activation de RAS ou indépendamment de celle-ci sera à l'origine de résistance (Figure 7).

Des **mutations activatrices de l'oncogène *RAS*** ont été décrites dans des lignées cellulaires humaines de mélanome rendues résistantes au vemurafenib et dans du matériel tumoral humain de patients atteints de mélanome résistant au vemurafenib [147].

L'activation de RAS peut être également secondaire à une **réactivation de récepteurs à activité tyrosine kinase** (Figure 7): réactivation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) dans des lignées dérivées de cancer colorectal ou de mélanome mutés B-RAF^{V600E}, traitées par vemurafenib, suite à la levée des rétrocontrôles négatifs exercées en amont [145, 148, 149]; réactivation du PDGFRβ (platelet-derived growth factor receptor β) dans des lignées cellulaires humaines de mélanome rendues résistantes au vemurafenib et dans du matériel tumoral de patients atteints de mélanome résistant au vemurafenib [147]. La réactivation du récepteur HER3 (Human Epidermal Growth Factor receptor 3), activant la voie des MAPK et PI3K-AKT, dans des lignées dérivées de cancer de la thyroïde humain mutés B-RAF^{V600E}, après traitement par le vemurafenib et la surexpression naturelle de son ligand, la Neureguline 1, pouvaient expliquer la relative insensibilité des lignées à cet inhibiteur [132]. L'ajout d'un inhibiteur des kinases HER, le lapatinib, permettait de restaurer la sensibilité des lignées B-RAF^{V600E} au vemurafenib [132]. L'activation d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase a également été décrites : MET (Mesenchymal Epithelial Transcription Factor), également nommé Hepatocyte Growth Factor (HGF) receptor, IGF1R [124, 150-152].

La **surexpression basale de** certains de ces **récepteurs à activité tyrosine kinase**, comme l'EGFR ou l'IGF1R a également été décrite comme à l'origine de résistance primaire [143, 148].

La **perte de NF1**, qui physiologiquement maintient RAS dans une conformation inactive semble également à l'origine de résistance acquise des mélanomes aux inhibiteurs de B-RAF, via une activation de C-RAF et de la voie PI3K-AKT (Figure 7) [153-155].

Des **isoformes de mutants de B-RAF** ayant subi un **épissage alternatif**, leur permettant de former des dimères indépendamment de l'activation de RAS et donc d'activer la voie de signalisation en aval ont été identifiés dans des lignées cellulaires de mélanome mutées B-

RAF, rendues résistantes au vemurafenib et dans du tissu tumoral provenant de patients ayant un mélanome résistant à cet inhibiteur. [156]. Ces mutants ont pu être identifiés grâce à leur masse de 61kDa (p61B-RAF^{V600E}) différente de celle de B-RAF^{V600E} (90 kDa) et résultant de la délétion de l'exon 4 à 8 (Figure 7). Il est intéressant de noter que ce variant d'épissage ne perd pas sa capacité de lier le vemurafenib *in vitro*.

L'**amplification de B-RAF ou B-RAF^{V600E}** a été décrite comme mécanisme de résistance à l'inhibition de RAF (Figure 7) [157-160]. Une augmentation du niveau protéique de **C-RAF** a été décrite comme mécanisme potentiel de résistance *in vitro* [159]. Des **mutations de C-RAF** pourraient également être responsables de résistance, bien qu'elles n'aient jamais été encore décrites chez des patients [161].

La **surexpression de la kinase COT** (codée par le gène *MAP3K8*), dans des lignées cellulaires humaines de mélanome et de cancer-colorectal était associée à une résistance *de novo* au PLX4720, inhibiteur sélectif de B-RAF^{V600E}, secondaire à l'activation de MEK indépendamment de RAS et RAF (Figure 7) [157].

Une **surexpression des kinases de la famille MLK** (mixed lineage kinases) a été décrite chez des patients atteints de mélanome devenus résistants aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} (vemurafenib ou dabrafenib). Ces kinases étaient capables *in vitro* de phosphoryler MEK indépendamment de B-RAF, donc y compris en présence de l'inhibiteur pharmacologique. Un modèle de xénogreffe chez la souris, de lignées cellulaires dérivant de mélanomes humains confirme cette résistance aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} après surexpression de MLK1 [162]. Des **mutations gain de fonction de MLK1** pourraient également être responsables de résistance primaire [162].

Des **mutations des gènes codant pour MEK1 et MEK2** ont été décrites chez des patients ayant un mélanome avec résistance précoce ou acquise au vemurafenib ou au dabrafenib [163-165]. Ces mutations étaient capables *in vitro* d'induire une résistance à cet inhibiteur [163, 164]. Il est intéressant de noter que certaines mutations de MEK1 (codon 124) ont déjà été identifiées chez des patients répondeurs aux inhibiteurs de B-RAF [143 , 166 , 167]. Il a été démontré par une approche de transfection d'un vecteur d'expression de MEK porteur d'une mutation du codon 124 dans des lignées cellulaires humaines de mélanome mutées B-RAF^{V600E} que ces mutations n'étaient pas capables d'augmenter les niveaux de ERK phosphorylé par rapport à la situation contrôle, expliquant potentiellement l'absence de résistance lors d'introduction d'inhibiteurs de B-RAF [166].

Un autre mécanisme potentiel à l'origine de résistance est l'acquisition d'une dépendance des cellules tumorales, pour leur prolifération et leur survie, à d'autres voies de signalisation que la voie MAPK. Les résistances peuvent alors survenir malgré une inhibition efficace de ERK. L'**activation de la voie AKT**, **secondaire à des mutations inactivatrices de PTEN** et **RB1** dans des lignées cellulaires humaines de mélanome B-RAF^{V600E}, diminuent la dépendance de ces lignées à B-RAF et MEK [112]. L'activation de la voie PI3K-AKT suite à la **production d'HGF par le micro-environnement tumoral** a été démontrée, *in vitro*, dans des lignées de mélanome. L'expression d'HGF, pouvant se lier à son récepteur MET, était plus élevée dans les échantillons de tissus du micro-environnement tumoral provenant de patients « mauvais répondeurs » aux inhibiteurs de B-RAF que pour les patients « bons répondeurs » [143].

Des **altérations de protéines impliquées dans le cycle cellulaire** pourraient être à l'origine de résistance aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E}. A titre d'exemple, la surexpression de la cycline D1 jouant un rôle dans la progression dans le cycle cellulaire, induisait une résistance à ces inhibiteurs dans des lignées cellulaires de mélanome B-RAF^{V600E}. Une augmentation du nombre de copies de cette cycline chez des patients ayant un mélanome traité par dabrafenib était associé à une survie sans progression plus courte [143].

Une **amplification de MITF** (microphtalmia-associated transcription factor) un facteur de transcription de la lignée mélanocytaire, régulé par la voie MAPK dans les mélanocytes, était associée à une résistance aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E}, sans hypothèse physiopathologique permettant de l'expliquer [164].

Une **mutation hotspot de RAC1** (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), petite protéine G faisant partie de la famille des Rho GTPases, RAC1 P29S, fréquemment identifiée dans les mélanomes (4-9%) a été décrite comme facteur de résistance au vémurafenib et au dabrafenib parmi 3 des 45 patients étudiés par Watson et coll. [168]. Les données *in vitro* démontraient une résistance de lignées humaines de mélanomes ayant cette mutation, possiblement par l'intermédiaire d'une activation persistante et soutenue de la voie MAPK, malgré la présence d'un inhibiteur de B-RAF.

Le complexe d'initiation de la traduction eIF4F a été identifié *in vivo* et *in vitro* comme étant associé à une résistance aux inhibiteurs de B-RAF, selon des mécanismes complexes à la fois ERK dépendant et indépendant [169].

En résumé, différents mécanismes de résistance aux inhibiteurs de RAF ont été décrits dans des modèles cellulaires, animaux ou à partir de matériel tumoral humain, dont les principaux

sont résumés dans la figure 7. Ces mécanismes sont susceptibles d'expliquer les résistances primaires ou secondaires, selon qu'ils préexistent avant le début du traitement dans une minorité ou une majorité de cellules tumorales ou qu'ils apparaissent au cours de la thérapie [170]. Les données récentes montrent que plusieurs mécanismes de résistance peuvent co-exister chez un même patient [164].

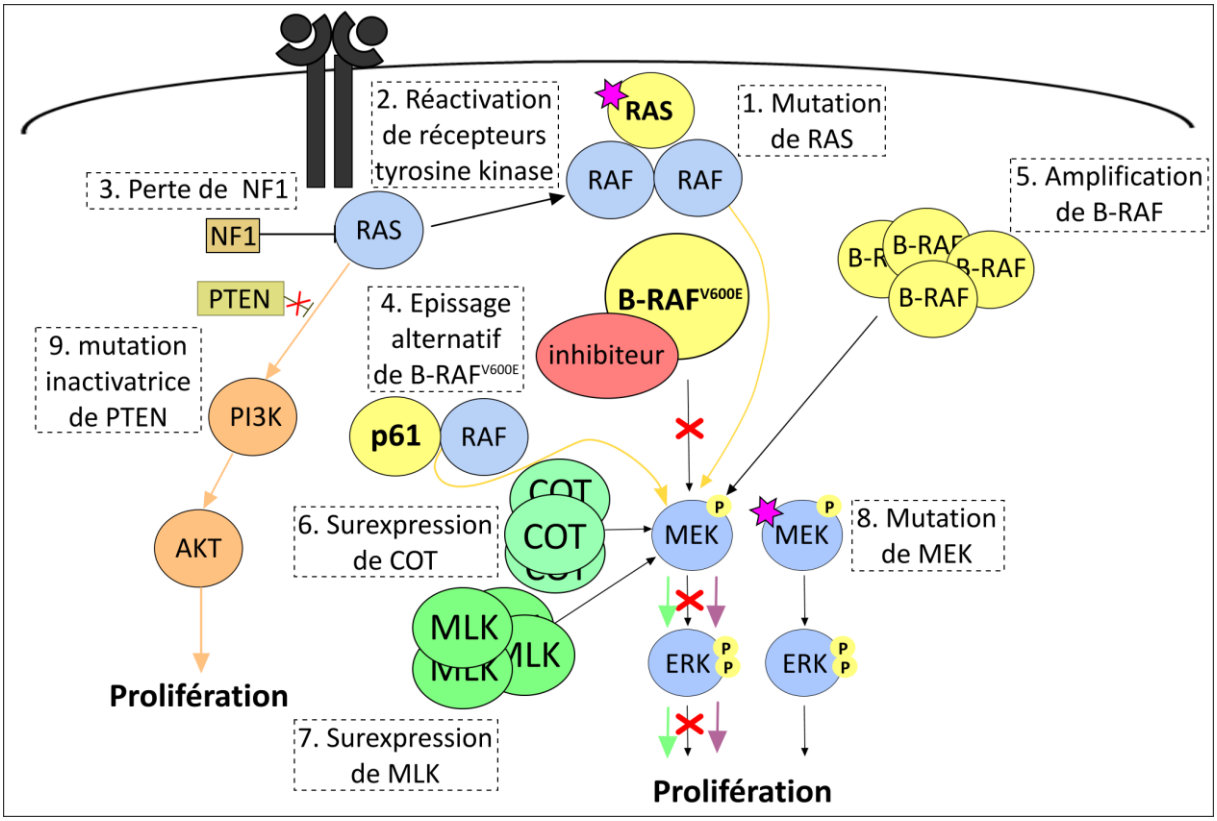

Figure 7. Principaux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} 1. Mutation activatrice de *RAS*. **2.** Réactivation de récepteurs à activité tyrosine kinase. **3.** Perte de NF-1 **4.** Epissage alternatif de B-RAF^{V600E}. **5.** Amplification de B-RAF **6.** Surexpression de COT. **7.** Surexpression de MLK **8**. Mutation de MEK **9**. Dépendance vis-à-vis de la voie PI3K, secondaire à une mutation inactivatrice de PTEN.

3.7 Inhibiteurs de B-RAF et adaptation tumorale.

Lors d'un traitement par inhibiteur de B-RAF^{V600E} se pose le problème d'une adaptation des cellules tumorales à l'inhibiteur (Figure 8). Avant traitement, la voie ERK est suractivée ce qui entraîne de multiples rétrocontrôles négatifs en amont, à plusieurs niveaux de la voie. L'activation de RAS est faible et B-RAF^{V600E} existe principalement sous la forme de monomère, constitutivement actif. Lors de l'instauration du traitement qui diminue l'activation de la voie ERK, les rétrocontrôles négatifs aux différents points de la voie sont levés, ayant pour conséquence la réactivation de plusieurs voies de signalisation, *via*

l'activation de récepteur à activité tyrosine kinase. Ceci est responsable d'une activation de RAS qui favorise la formation de dimères de RAF, insensibles à l'inhibiteur (possibilité de transactivation d'un monomère B-RAF par un monomère B-RAF^{V600E} lié à son inhibiteur spécifique). Il en résulte une réactivation de la voie ERK, malgré un traitement continu par l'inhibiteur. Au long cours, un nouvel état d'équilibre s'installe, suite à la réactivation des rétrocontrôles négatifs en amont de ERK, mais avec une efficacité moindre de l'inhibiteur spécifique de B-RAF^{V600E}. Cet effet est variable selon les lignées cellulaires et selon le modèle tumoral [124, 145, 171]. Il semble plus prononcé dans les modèles de cancer de la thyroïde et colorectal que dans celui du mélanome [132, 145, 171].

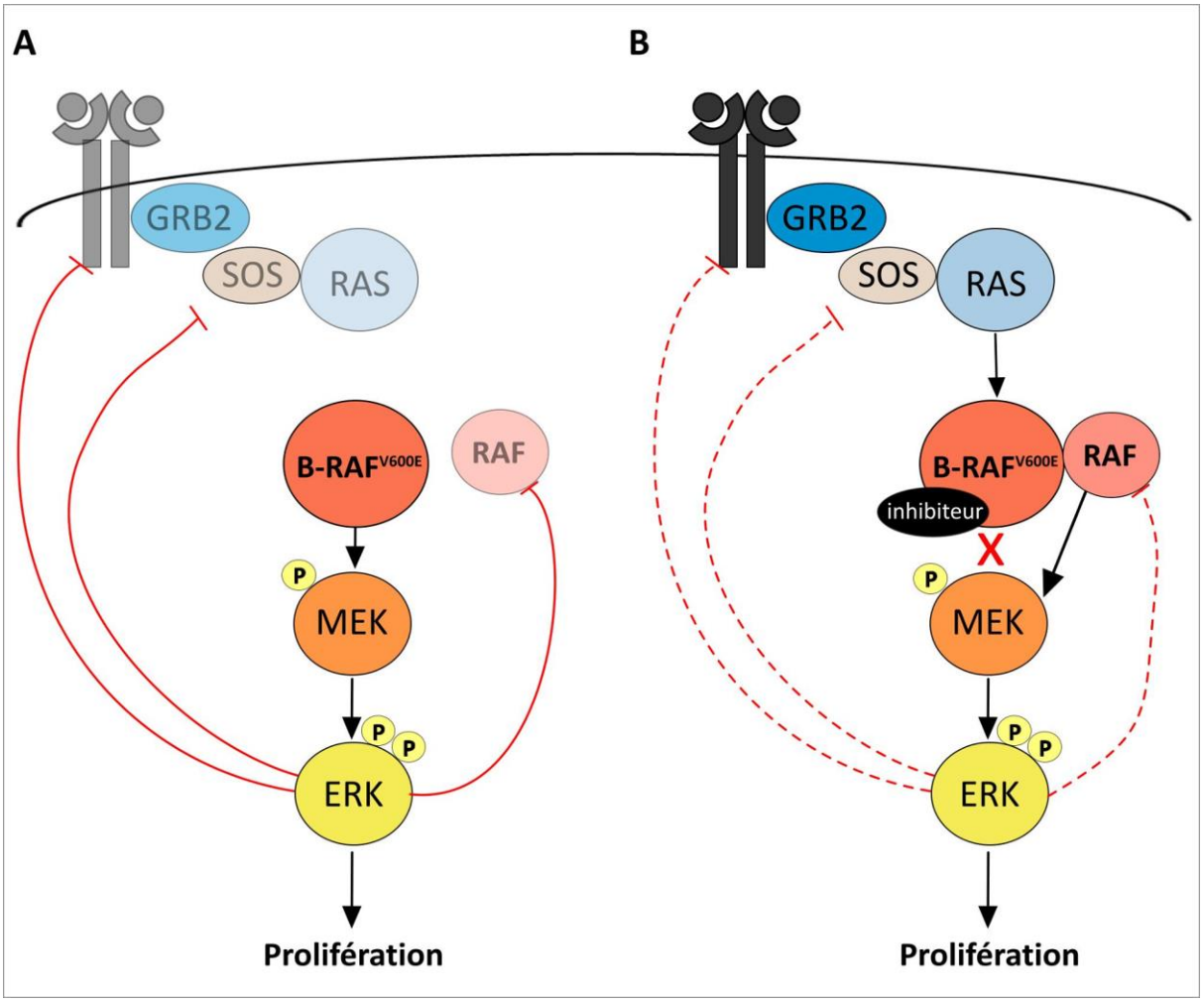

Figure 8. Adaptation aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} de tumeurs porteuses de cette mutation. A. En l'absence de l'inhibiteur, l'hyperactivation de la voie MEK-ERK est responsable de nombreux rétrocontrôles négatifs s'exerçant en amont de la voie. **B.** En présence de l'inhibiteur, les rétrocontrôles sont levés, entrainant l'activation de RAS et la formation de dimère de RAF résistant à l'inhibiteur.

3.8 Stratégies thérapeutiques pour contrer les résistances aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E}.

Une des alternatives pour pallier à la survenue de résistances, est un **traitement combiné par inhibiteur de MEK** en vue d'augmenter l'amplitude et/ou la durée de la réponse aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} [124, 172, 173]. On peut prédire qu'un traitement par inhibiteur de MEK introduit lors de la survenue de la résistance aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} ne soit pas aussi efficace que s'il est introduit d'emblée, en raison de la sélection de clones cellulaires ayant perdu leur dépendance à la voie MEK-ERK, suite à la réactivation d'autres voies de signalisation. C'est ce qui semble être observé en pratique clinique, pour le mélanome [136 , 172]. Un autre avantage des inhibiteurs de MEK est la diminution de l'incidence des cancers cutanés non mélaniques et possiblement d'autres tumeurs préexistantes avec mutation de l'oncogène *RAS*, tous deux liés à l'activation paradoxale de la voie MAPK sous inhibiteurs de B-RAF^{V600E}. Néanmoins, une mutation de MEK2 responsable d'une résistance à l'association dabrafenib et trametinib (inhibiteur de MEK) a déjà été décrite chez des patients atteints de mélanome [165].

Des **traitements combinés par inhibiteurs de récepteur à activité tyrosine kinase**, tel que HER dans des modèles de cancer de la thyroïde (lapatinib), où HER3 est surexprimé ou de l'EGFR dans des modèles de cancer colorectal où ce récepteur est surexprimé, s'accompagnent d'une efficacité plus importante et/ou prolongée [132, 145, 174]. De façon comparable, des inhibiteurs du récepteur au FGF (fibroblast growth factor), en association à des inhibiteurs de B-RAF sont responsables d'une baisse de la prolifération et d'une augmentation de l'apoptose de lignée cellulaire de mélanomes qui expriment fortement le récepteur au FGF et son ligand, le FGF [175]. Une des limites de cette approche est qu'elle suppose une adaptation aux inhibiteurs de RAF homogène d'une cellule tumorale à l'autre, avec la réactivation d'un type unique de récepteur à activité tyrosine kinase.

Des **inhibiteurs sélectifs de ERK** ont également été développés et pourraient être utilisés seuls ou en association aux inhibiteurs de B-RAF ou MEK [176]. Un inhibiteur de ERK1/2 (SCH772984), capable d'inhiber directement ERK, mais aussi la phosphorylation de ERK par MEK, entrainait une baisse de la prolifération de lignées de mélanome mutées B-RAF résistantes aux inhibiteurs de B-RAF ou MEK ainsi qu'à l'association des deux inhibiteurs [176]. On peut faire l'hypothèse que ces molécules auront un index thérapeutique étroit, en

raison de l'inhibition de la voie MAPK, y compris dans les cellules non-tumorales de l'organisme [173].

De **nouveaux inhibiteurs de MEK évitant la levée des rétrocontrôles négatifs** s'exerçant sur RAF, responsables d'une adaptation des cellules tumorales à l'inhibition de ERK, représentent une stratégie thérapeutique intéressante. L'efficacité des inhibiteurs classiques de MEK peut être limitée suite à la levée des rétrocontrôles négatifs s'exerçant en amont de la voie, notamment sur RAF (détaillé dans le paragraphe 4.3.3), induisant une augmentation des niveaux de phosphorylation de MEK. Il existe un nouvel inhibiteur (CH5126766) capable de lier sélectivement MEK dans une conformation inactive et d'entrainer sa liaison stable à RAF. Cet inhibiteur empêche ainsi la phosphorylation de MEK par RAF et inhibe également la kinase RAF. Il était responsable d'une activité anti-tumorale supérieure à celle des inhibiteurs de MEK de première génération, dans un modèle de mélanome murin [177].

Un **schéma d'administration discontinue du vemurafenib** permettait, dans un modèle de xénogreffe de lignées cellulaires humaines de mélanome mutées pour B-RAF et dans des panels de lignées de mélanomes mutés pour B-RAF, de prévenir le développement de résistance [149, 160, 178]. Le modèle proposé par certains est le suivant [178 , 179]:

- avant initiation du vemurafenib pour traiter un mélanome avec mutation B-RAF^{V600E}, la majorité des cellules ont un niveau d'activation de la voie MEK-ERK optimale et sont sensibles à la drogue, avec de rares clones cellulaires présentant une résistance primaire.
- l'ajout du vemurafenib diminue l'activation de la voie MEK-ERK dans la majorité des cellules, s'accompagnant d'une régression tumorale. Néanmoins, l'inhibiteur de B-RAF entraine une sélection des clones résistants qui gardent un niveau d'activation de la voie MEK-ERK optimal pour leur prolifération.
- à l'arrêt du vemurafenib, l'activation de la voie MEK-ERK au sein des clones résistants devient excessive. Les données de la littérature montrent que dans certaines situations une activation excessive de la voie MEK-ERK serait capable d'induire un arrêt de la prolifération et/ou une apoptose. L'arrêt du vemurafenib aurait donc un effet anti-prolifératif au sein de ces clones cellulaires. Néanmoins, les clones sensibles restaurent un niveau optimal d'activation de la voie MEK-ERK leur permettant à nouveau de proliférer, ce qui peut être à nouveau contrôlé par la réinstauration de la drogue.

Des **inhibiteurs « pan-RAF », en association avec les inhibiteurs B-RAF^{V600E}**, pourraient permettre de contrer les résistances liées à l'activation de MEK via C-RAF ou A-RAF [143].

Une autre perspective thérapeutique intéressante est celle des composés capables d'empêcher la dimérisation de RAF [170].

Différentes **molécules ciblant la voie PI3K** ont été développées pour contrer les mécanismes de résistance liée à l'activation de la voie PI3K (détaillés dans le paragraphe 3.6 et schématisés dans la figure 7). Une des principales préoccupations est la toxicité de ces inhibiteurs, étant donné qu'ils ne ciblent pas une anomalie spécifique des cellules tumorales et que la voie PI3K joue de nombreux rôles physiologiques. Une des stratégies développées est celle des inhibiteurs de la sous unité β de la PI3K qui pourraient être sélectifs des cellules tumorales caractérisées par une perte de PTEN [143]. Les études pré-cliniques suggèrent, de façon alternative, que la prescription des inhibiteurs de la voie PI3K pendant une courte période suffirait à apporter un bénéfice clinique [143].

Le développement d'**agents ciblant les protéines régulant le cycle cellulaire** est une alternative séduisante, compte tenu des nombreuses altérations de ces protéines (cyclines, protéine du rétinoblastome, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A par exemple) dans les pathologies cancéreuses [143]. A titre d'exemple des inhibiteurs de CDK (cycline-dependent kinase) représente une stratégie thérapeutique prometteuse [143].

Un **inhibiteur de la protéine HSP90** (Heat Shock protein 90), le ganetespib, protéine ubiquitaire qui stabilise de nombreuses protéines nécessaires à la croissance tumorale, parait intéressant. Dans des lignées cellulaires de mélanome résistantes aux inhibiteurs de B-RAF, le ganetespib induisait une apoptose et un arrêt du cycle cellulaire [143].

Les **inhibiteurs des histones désacétylases** (pan-HDAC) permettrait de lever les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de B-RAF d'origine épigénétique. En effet, ces inhibiteurs administrés en association avec les inhibiteurs de B-RAF pouvaient induire l'apoptose de lignées cellulaires de mélanome avec résistantes acquises aux inhibiteurs de B-RAF seuls.

Enfin, le développement d'**immunothérapie** est une piste intéressante. En effet, l'inhibition de la voie MAPK par les inhibiteurs de B-RAF ou MEK entraine l'expression de nombreux antigènes à la surface de lignées humaines de mélanome avec mutation activatrice de B-RAF [143]. L'analyse de biopsie de patients atteints de mélanome traités par inhibiteurs de B-RAF révèle une infiltration lymphocytaire dès le début du traitement [143]. Néanmoins, les essais de phase I combinant le vemurafenib et un anticorps anti-CTLA4 ont été interrompus en raison d'une toxicité importante. Les anticorps anti PD-L1 (Programmed death-ligand 1) et

anti PD-1 (programmed death-1) ont démontré des taux de réponse encourageants avec une toxicité acceptable dans les études cliniques préliminaires. Il reste à déterminer s'ils pourraient être utilisés en association avec les inhibiteurs de B-RAF^{V600E}.

3.9 Stratégie thérapeutique dans le cancer thyroïdien.

Les cancers thyroïdiens porteurs d'une mutation de l'oncogène *B-RAF* posent le problème d'une dédifférenciation tumorale avec perte de la sensibilité à l'iode suite à la perte de l'expression du NIS et d'autres gènes spécifiques de la thyroïde, bien démontré dans les modèles murins [29] et sur du tissu tumoral de patients atteints de CPT [90]. L'administration de thérapies capables de « redifférencier » les cellules tumorales et de restaurer un captage de l'iode représente une perspective thérapeutique intéressante. Une équipe hollandaise a traité 31 patients ayant un cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode et évolutif par du sorafenib, sans observer de restauration significative du captage de l'iode après 26 semaines de traitement [180]. Des résultats décevants avaient été obtenus avec l'acide rétinoïque [181-183]. Un regain d'intérêt pour cette stratégie est venu avec le modèle original de souris transgéniques, évoqué plus haut, où l'oncogène B-RAF^{V600E} était exprimé spécifiquement dans les cellules folliculaires thyroïdiennes (oncogène en aval du promoteur de la *thyroglobuline*), sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline. En présence de l'oncogène B-RAF^{V600E} le captage de l'iode par la thyroïde était diminué [29]. L'administration d'un inhibiteur de MEK ou spécifique de B-RAF^{V600E} (PLX4720) permettait de restaurer partiellement l'expression des gènes spécifiques de la thyroïde, notamment celui codant pour le NIS. Ceci s'accompagnait d'une augmentation significative du captage de l'iode par les cellules thyroïdiennes, démontrées par des scintigraphies de type TEP à l'iode 124. Les mêmes résultats étaient observés lors de l'interruption du traitement des souris par la doxycyline avec pour conséquence la perte d'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E}. L'inhibition pharmacologique (traitement par PLX4720) ou génétique (arrêt de la doxycycline) de B-RAF muté permettait de restaurer la sensibilité des cellules tumorales à une dose thérapeutique d'iode 131.

Ces données ont conduit par la suite à une approche similaire chez les patients. L'administration de selumetinib, un inhibiteur sélectif de MEK, pendant un minimum de 4 semaines, chez des patients ayant un cancer métastatique réfractaire à l'iode, s'accompagnait d'une restauration d'un captage significatif de l'iode sur des TEP à l'iode 124 pour 12 des 20 patients inclus dans l'étude (majoration du captage de la plupart des lésions secondaires de

plus de 100%) [184]. Parmi ces 12 patients, 8 d'entre eux avaient un captage de l'iode suffisant pour envisager une nouvelle irathérapie. Après 6 mois de suivi les patients avaient soit une maladie stable (3 patients), soit une réponse partielle (5 patients). Il est intéressant de noter qu'une restauration significative du captage de l'iode a pu être obtenue pour tous les patients de l'étude ayant un CPT avec mutation de N-RAS, contre seulement un des 9 ayant un CPT avec mutation de B-RAF. Une étude est actuellement en cours aux Etats-Unis afin d'étudier la récupération du captage de l'iode par les lésions métastatiques de CPT de la thyroïde B-RAF^{V600E}, réfractaire à l'iode, après traitement par dabrafenib (ClinicalTrials.gov/ NCT01534897).

4. Régulation de l'activité de ERK.

Les anomalies moléculaires de la voie MAPK identifiées dans les CPT sont responsables d'une activation constitutive de la voie MAPK et d'une augmentation du niveau de ERK phosphorylé (p-ERK).

Physiologiquement, le contrôle rigoureux de l'amplitude et de la durée de l'activation de ERK sont déterminants pour la régulation de la prolifération, la survie et la différentiation cellulaire, ainsi que l'activation de différentes cibles de ERK.

Il existe chez l'homme, 2 protéines ERK, ERK1 et ERK2 (codées par des gènes situés en 16p11.2 pour ERK-1 et 22p11.2 pour ERK-2), dont les séquences sont identiques à 84% et qui semblent avoir les mêmes fonctions [9, 185], raison pour laquelle ERK est souvent nommé ERK1/2. Les différents déterminants de l'activation et de l'inhibition de ERK sont détaillés dans ce chapitre.

4.1 Mécanismes conduisant à une activation de ERK.

4.1.1 Rôle prépondérant de MEK.

MEK1 et MEK2 (codées par des gènes situés en 15q22.1-q22.33 pour MEK1 et 19p13.3 pour MEK2), d'expression ubiquitaire, sont des kinases à double spécificité, qui phosphorylent ERK, à la fois sur des résidus thréonine et tyrosine. MEK catalyse la première phosphorylation du résidu tyrosine, puis ERK se dissocie de MEK et s'associe à nouveau avec la même molécule de MEK activé ou une autre qui catalyse alors la phosphorylation du résidu thréonine [9]. Ainsi activé, ERK est libéré du complexe qu'il forme avec MEK et peut

dimériser et transloquer vers le noyau ou rester dans le cytoplasme et activer différents substrats, comme des kinases ou des protéines du cytosquelette (détaillé dans le chapitre 6).

Pour mémoire, MEK est lui-même activé par phosphorylation par RAF et PAK1 (détaillé dans le paragraphe 3.1). Comme déjà évoqué ci-dessus, certains mécanismes de résistance aux inhibiteurs de B-RAF^{V600E} utilisés en cancérologie, impliquent une activation de MEK par les kinases COT ou de la famille MLK (détaillé dans le paragraphe 3.6).

4.1.2 Rétrocontrôles positifs favorisant l'activation de ERK.

Des mécanismes de rétrocontrôles positifs existent en différents points de la voie, modulant l'intensité et la durée de l'activation de la voie MEK-ERK.

La phosphorylation de C-RAF par ERK sur différents sites augmente l'activité de RAF d'un facteur 4 [44]. Certains sites de RAF phosphorylés par ERK peuvent être impliqués à la fois dans l'activation ou l'inhibition de RAF. Les facteurs déterminants l'effet de la phosphorylation de RAF par ERK ne sont pas encore bien compris [44].

La phosphorylation de la dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) par ERK favorisant sa dégradation par le protéasome est un autre mécanisme de rétrocontrôle positif (détaillé dans le paragraphe 5.1).

4.1.3 Rôle des protéines chaperonnes.

- **La protéine KSR (Kinase Suppressor of RAS)** est la mieux étudiée des protéines chaperonnes de la voie MEK-ERK. Il existe deux protéines KSR chez les mammifères : KSR1 et KSR2. KSR est capable de se lier à RAF, MEK et ERK. De plus, KSR peut aussi interagir avec 14-3-3, ce qui pourrait stabiliser l'interaction de KSR et RAF. A concentration optimale, KSR forme un complexe avec RAF, MEK et ERK augmentant l'activation de ERK. En réponse à une stimulation par des facteurs de croissance, KSR transloque vers la membrane plasmique et facilite l'activation de MEK probablement en favorisant la présentation de MEK à RAF activé. A concentration excessive, KSR se lie individuellement et séparément à chaque membre du complexe et empêche ainsi leur interaction, inhibant l'activation de ERK [44].

- **Connector enhancer of KSR (CNK)** ne lie que RAF, chez les mammifères. CNK augmente l'activation de C-RAF par RAS et Src, responsable ainsi de l'activation de ERK. CNK se lie à de nombreuses protéines provenant de différentes voies de signalisation et son mécanisme d'action chez les mammifères est difficile à préciser [44].

- **MEK Partner-1 (MP-1) et MAPK organizer-1 (Morg1)**: MP-1 se lie sélectivement à MEK1 et ERK1 mais pas à MEK2. Ceci augmente leur interaction et augmente l'activité de ERK. MP-1 forme aussi un complexe avec une protéine endosomale, p14 qui interagit avec PAK1 et augmente la phosphorylation et l'activation de MEK par PAK1 [44]. MP-1 interagit avec Morg1. Morg1 forme un complexe de haut poids moléculaire avec les kinases RAF, MEK1/2 et ERK1/2, ainsi que MP-1. Ce complexe est responsable d'une majoration de l'activation de ERK en réponse au sérum, aux esters de phorbols (PMA) et à l'acide lysophosphatidique (LPA), mais n'a pas d'effet sur l'activation de ERK par l'EGF ou le PDGF [44, 186]. Morg1 présente les caractéristiques typiques d'une protéine adaptatrice : activant à concentration optimale et inhibant la voie MEK-ERK à fortes concentrations [44, 186].

- **IQGAP1** se lie à B-RAF, MEK et ERK et facilite l'activation de ERK en réponse à une stimulation par l'EGF. IQGAP1, seule, peut activer B-RAF *in vitro* par un mécanisme inconnu.

- **β arrestine 1,2** : les Arrestines ont initialement été identifiées comme des protéines inactivant les récepteurs couplés aux protéines G. Les β arrestines 1 et 2 peuvent lier RAF, MEK et ERK et augmenter l'activité cytosolique de ERK [44]. La séquence d'export nucléaire de la β-arrestine 2 pourrait être impliquée [186].

- Il existe de nombreuses autres protéines adaptatrices de la voie MEK-ERK, augmentant l'activation de la voie [44, 186], comme:
    - la paxilline, constitutivement lié à MEK et qui se lie à C-RAF et ERK, en réponse à une stimulation par l'HGF
    - Sur-8 (Regulatory subunit of protein phosphatase 1) liant RAS et C-RAF

- MEKK1 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1) liant C-RAF, MEK1 et ERK2

4.2 Contrôle de la localisation cellulaire de ERK et conséquence sur l'activation de ERK.

La régulation de la localisation cellulaire de ERK est un moyen de contrôler son activité. La translocation de ERK dans le noyau est importante pour nombre de ces fonctions.

La translocation nucléaire de ERK nécessite sa phosphorylation rapide par MEK. Le mécanisme par lequel la dimérisation de ERK favorise sa translocation nucléaire est incomplètement compris, mais pourrait impliquer l'exposition de la séquence d'import nucléaire de ERK2 [44]. Certains ont proposé que la dimérisation de ERK activé pourrait masquer le site de liaison à MEK et contribuer à l'accumulation nucléaire du dimère [44]. MEK1/2 peut empêcher l'accumulation nucléaire de ERK inactif. MEK favorise l'export nucléaire de monomère inactif de ERK. Ainsi ERK inactif peut se réassocier avec MEK dans le cytoplasme et être à nouveau activé.

PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes) se lie à ERK1/2, quel que soit son état de phosphorylation et empêche son accumulation nucléaire. Le mécanisme par lequel PEA-15 prévient l'accumulation nucléaire de ERK est imparfaitement compris. La séquence d'export nucléaire de PEA-15 semble jouer un rôle. PEA-15 pourrait également bloquer l'interaction de ERK avec les pores nucléaires. La localisation cytoplasmique de ERK pourrait aussi impliquer son interaction avec RSK2 (ribosomal protein S6 kinase 2) (détaillé dans le paragraphe 4.3.3). PEA-15 étant exprimé essentiellement dans les astrocytes et les lymphocytes, cela pourrait être essentiellement dans ces 2 types cellulaires que ERK est dirigé de façon prédominante vers RSK2. L'interaction préférentielle de PEA-15 avec ERK pourrait être liée à la phosphorylation de PEA-15 par PKC ou CamK II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha). Ainsi ERK pourrait être dirigé essentiellement à RSK2 par PEA-15 suite à l'activation de ces voies de signalisation [44].

Sef (Similar expression to FGF genes), une protéine transmembranaire, a des fonctions proches de celles de PEA-15. Sef est également capable de bloquer la translocation de ERK dans le noyau, sans empêcher sa phosphorylation par MEK et donc l'activation de ses cibles cytoplasmiques. Sef lie MEK activé et empêche la dissociation du complexe MEK-ERK. Le complexe Sef/ MEK activé a aussi été identifié dans l'appareil de Golgi et pourrait donc contribuer à l'activation de la signalisation de ERK dans ce compartiment cellulaire [44].

Mxi2 prolonge l'activation de ERK dans le noyau mais n'a pas d'effet sur l'activité de ERK dans le cytoplasme [44]. Une fois dans le noyau, Mxi2 protège ERK activé de la déphosphorylation par les phosphatases [187].

Les DUSPs peuvent ancrer ERK dans le cytoplasme ou le noyau. Les rôles respectifs de DUSP5, qui ancre ERK dans le noyau et DUSP6 qui ancre ERK dans le cytoplasme seront détaillés dans le chapitre 5. DUSP2 et DUSP4 peuvent ancrer ERK dans le noyau [44, 188].

D'autres protéines capables de séquestrer ERK dans différents compartiments cellulaires, comme l'appareil de Golgi, l'endosome ou la membrane plasmique ont également été identifiées [44].

4.3 Mécanismes conduisant à une inhibition de ERK.

4.3.1 RAF kinase inhibitor protein (RKIP).

RKIP peut se lier à RAF et MEK et inhiber leur interaction. RKIP se dissocie de RAF sous l'influence de stimulus mitogénique, ce qui permet l'activation de MEK. De façon intéressante, RKIP est sous-exprimée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses [44].

4.3.2 Sprouty and SPRED (Sprouty-related proteins with an EVH1 Domain).

Les protéines de la famille Sprouty sont codées par 4 gènes : *SPRY 1-4*. Il a été montré que l'activation de la voie MAPK par le FGF ou l'EGF induisait l'expression de ces protéines qui participeraient donc à une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie MEK-ERK [189]. Les mécanismes d'action de ces protéines sont imparfaitement compris. Elles pourraient dans certains cas, interagir avec Grb-2 et perturber le recrutement de SOS et donc l'activation de RAS ; l'interaction avec le domaine catalytique de RAF pourrait être un deuxième mécanisme. Il a été démontré que le niveau d'expression de Spry2 était augmenté plus particulièrement dans des CPT humains porteurs d'une mutation de B-RAF, et que Spry2 pourrait être un marqueur d'activation de la voie MAPK dans ces cancers [102].

4.3.3 Mécanismes de rétrocontrôles négatifs.

Des mécanismes de rétrocontrôles négatifs existent en différents points de la voie, modulant l'intensité et la durée de l'activation de la voie MEK-ERK :

- MEK1/2 peut être inhibé suite à sa phosphorylation par ERK sur les thréonines 292 et 212. Ces phosphorylations empêchent une majoration de son activation par PAK1 et donc réduit l'activation de ERK. Ces deux résidus sont différents des deux sérines (S218 et S222) situées dans le segment activateur de MEK, qui sont responsables de son activation lorsqu'elles sont phosphorylées [44].
- L'hyper-phosphorylation de C-RAF par ERK sur de nombreux sites, perturbe son interaction avec RAS et favorise la déphosphorylation de RAF par des phosphatases [44]. L'hyper-phosphorylation de B-RAF par ERK diminue la durée de vie des dimères B-RAF/C-RAF [190].
- La phosphorylation de SOS par ERK a été un des premiers rétrocontrôles décrits sur la voie. La phosphorylation de SOS inhibe son interaction avec Grb-2, empêchant ainsi le recrutement de SOS à la membrane plasmique et donc l'activation de RAS. La phosphorylation de SOS par ERK est médiée majoritairement par RSK2 (Ribosomal S6 kinase 2) qui est une sérine/thréonine kinase directement activée par ERK dans le cytoplasme. PEA-15 augmente la liaison, la phosphorylation et l'activation de RSK2 par ERK à faible concentration et bloque ces étapes à fortes concentrations.
- L'activation ou l'induction de la transcription de phosphatases par ERK est un autre mécanisme de rétrocontrôle négatif. L'exemple de DUSP5 et DUSP6 est détaillé dans le chapitre 5.
- La phosphorylation de certaines sérines de DUSP1 (Ser 359 et 364) par ERK stabilise DUSP1 qui peut alors déphosphoryler ERK [191 , 192]. Il faut noter que la phosphorylation d'autres résidus de DUSP1 (Ser296 and Ser323) par ERK est responsable, au contraire, d'une accélération de la dégradation de DUSP1 [192].

4.3.4 Les phosphatases.

ERK peut être inactivé soit par déphosphorylation du résidu thréonine, soit du résidu tyrosine par des phosphatases que l'on peut classer en 3 catégories, selon leur capacité à déphosphoryler plutôt le résidu tyrosine ou thréonine ou les 2 résidus à la fois (phosphatases dites à double spécificité) [9].

Les phosphatases spécifiques du résidu tyrosine incluent : PTPRR (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R), STEP (striatum enriched phosphatase) et HePTP (hematopoietic tyrosine phosphatase) [9].

Les sérines/ thréonine phosphatases incluent la protéine phosphatase 2A et 2C (PP2A et PP2C). La PP2A (protéine phosphatase 2A) est une serine/thréonine phosphatase d'expression ubiquitaire. Sa fonction est complexe. Elle a été rapportée comme pouvant inactiver ERK ou MEK [44]. Par ailleurs, elle joue un rôle dans l'activation de RAF. Pour mémoire (détaillé dans le chapitre 2), à l'état basal, RAF est maintenu dans une conformation inactive dans le cytoplasme, où son extrémité phosphorylé N-terminale est liée à la protéine 14-3-3. Après stimulation par un facteur de croissance, RAF transloque à la membrane plasmique où il lie RAS activé. Cette liaison déplace l'interaction avec 14-3-3, permettant la déphosphorylation de l'extrémité N-terminale par PP2A. La protéine 14-3-3 se détache alors de RAF, permettant ainsi une modification conformationnelle autorisant son activation [44].

Les phosphatases à double spécificité, nommées DUSP (Dual Specificity Phosphatase) regroupent 61 membres :

- les DUSPs « classiques » (encore nommée MKPs pour « mitogen-activated protein kinase phosphatases », au nombre de 10)
- les DUSPs atypiques (au nombre de 16)
- les phosphatases Slingshot (SSH1L, SSH2L et SSH3L)
- les PRL (phosphatase of regenerating liver)
- les phosphatases Cdc14
- les phosphatases PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)-like et de type myotubularin.

Les DUSPs classiques comprennent dix membres qui sont les mieux caractérisés au sein de cette famille de phosphatases. Ces phosphatases ont été largement conservées au cours de l'évolution et partagent une structure commune comprenant un domaine non-catalytique N-terminal et un domaine catalytique C-terminal [193, 194]. Ces DUSPs sont divisées en 3 classes selon leur similarité de séquence, la structure de leur gène et leur localisation cellulaire (Tableau 5). La sélectivité de ces DUSPs vis-à-vis d'une ou plusieurs MAPK dépend du domaine d'interaction avec la kinase (nommé KIM pour kinase interaction motif) situé à l'extrémité N-terminale.

Tableau 5. Famille des 10 DUSPs classiques.

Classe	Nom	Autres dénominations	Localisation cellulaire	Substrat préférentiel		
				ERK1/2	p38	JNK
I	DUSP1	MKP-1, hVH1	nucléaire	X	X	X
	DUSP2	PAC-1	nucléaire	X	X	
	DUSP4	MKP-2, hVH2	nucléaire	X	X	X
	DUSP5	hVH-3, B23	nucléaire	X		
II	DUSP6	MKP-3, Pyst1, rVH6	cytoplasmique	X		
	DUSP7	MKP-X, Pyst2	cytoplasmique	X		
	DUSP9	MKP-4, Pyst3	cytoplasmique	X	x	
III	DUSP8	hHV5	Cytoplasmique/ nucléaire		X	X
	DUSP10	MKP-5	Cytoplasmique/ nucléaire		X	X
	DUSP16	MKP-7	Cytoplasmique/ nucléaire		X	X

D'après Bermudez et al.[195]

Il existe par ailleurs au moins 16 DUSPs dites atypiques, car bien que partageant certaines caractéristiques communes avec les DUSPs, elles sont plus proches de la phosphatase VH1 (vaccinia virus open reading frame H1) identifiée dans un virus. De plus, elles sont phylogénétiquement distinctes des DUSP classiques. Bien que certaines DUSPs atypiques puissent réguler les MAPK, ces phosphatases ont de nombreux substrats et rôles physiologiques qui les distinguent des autres DUSPs [196].

5 DUSP5 et DUSP6.

Nous avons choisi d'étudier deux phosphatases de la famille des DUSPs: DUSP5 de localisation nucléaire et DUSP6, de localisation cytoplasmique. Les raisons de notre choix sont:

- leur spécificité pour ERK [188, 197]
- leur expression ubiquitaire et donc thyroïdienne [198]
- leur activation, bien démontrée, par la voie MAPK [199-206]
- leur rôle en cancérologie en tant que gène suppresseur de tumeur ou en tant qu'oncogène (détaillé plus bas).

5.1 DUSP6.

DUSP6 est de loin la plus étudiée des DUSPs. Elle appartient à la classe des DUSPs cytoplasmiques spécifiques de ERK. DUSP6 est capable de transloquer vers le noyau, mais est essentiellement localisée dans le cytoplasme, grâce à un domaine d'export nucléaire (nuclear export signal, NES) situé dans la partie N-terminale et distinct du domaine KIM [207]. Elle est codée, comme les autres phosphatases de sa classe, par un gène ayant 4 exons. DUSP6 est hautement sélective de ERK1/2 [208]. DUSP6 se lie à ERK par son extrémité non catalytique N-terminale et inactive ERK par déphosphorylation [208-210]. Ainsi, DUSP6 est capable de séquestrer ERK dans le cytoplasme, par un mécanisme impliquant son domaine d'export nucléaire et même être responsable de la translocation de ERK déphosphorylé du noyau vers le cytosol [207, 211]. La liaison de ERK à DUSP6 stimule son activité phosphatasique d'un facteur 30 [210]. A son tour ERK phosphoryle DUSP6 sur deux résidus sérine, ce qui favorise la dégradation de DUSP6 par le protéasome [206, 212]. Ainsi, DUSP6 fait l'objet d'une régulation fine et complexe, puisque cette phosphatase est capable d'inactiver ERK, qui favorise alors l'inactivation de DUSP6, en l'adressant au protéasome. L'activation de la voie PI3K/mTOR est également responsable de la phosphorylation de DUSP6, dans sa région N-terminale, favorisant ainsi sa dégradation [213]. Il est probable que la kinase mTOR, elle-même, soit responsable de cette phosphorylation [213]. Une activité basale minimale de la voie MEK-ERK pourrait favoriser cette phosphorylation de DUSP6 [213].

L'invalidation de DUSP6 dans des embryons de souris est responsable de malformations du squelette avec nanisme, d'une fusion prématurée des sutures crâniennes et de surdité [214], ainsi que d'une hypertrophie myocardique, liée à une augmentation de la prolifération des myocytes [215].

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle de DUSP6 sont connus. La voie ERK est majoritairement responsable de l'induction de l'expression de DUSP6, dans de nombreux modèles cellulaires et animaux [201, 204, 206, 216-218]. La voie PI3K pourrait être impliquée dans l'induction de l'expression de DUSP6 dans les cellules humaines rénales H293T ainsi que dans l'embryon de poulet [217, 219], mais ces résultats n'ont pu être reproduits dans des cellules murines [204] ou des embryons de souris [218] ou dans des lignées cellulaires humaines de cancer du côlon ou de mélanome [205].

L'activation de DUSP6 par la voie MAPK dépend de la présence d'un élément de réponse, très conservé, pour les facteurs de transcription Ets-1 et Ets-2, appartenant à la famille des facteurs de transcription à domaine ETS (E-twenty six) [204, 220]. Cet élément de réponse est situé dans le premier intron du gène codant pour DUSP6 [220]. Ce mécanisme de régulation transcriptionnelle a été démontré dans des fibroblastes de souris, des cellules rénales humaines et également dans un modèle de lignée cellulaire humaine de cancer du poumon [201, 204, 220]. Ets-1 et Ets-2 étant des cibles nucléaires directes de ERK [221], ces données sont en faveur d'une régulation de l'expression de DUSP6 par la voie MEK-ERK, dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif. Un élément de réponse pour le facteur de transcription NF-κB, chevauchant avec le site ETS, a été identifié dans la région promotrice murine de *DUSP6*, mais ne semble pas avoir de rôle dans la régulation transcriptionnelle [204]. De la même façon, un élément de réponse pour un facteur de transcription de la famille Forkhead, cible de la voie PI3K, a été mis en évidence, mais sans qu'un rôle dans la régulation transcriptionnelle ait pu être démontré [204]. Enfin deux éléments de réponse p53 ont été identifiés dans la région promotrice de *DUSP6* et serait capable de lier p53, activant ainsi l'expression de DUSP6 en réponse à un stress génotoxique dans des lignées humaines de cancer colorectal [222]. Chez l'embryon de poisson-zèbre, la transcription de DUSP6, au début du développement, dépend de l'activité de la β-caténine maternelle [223].

DUSP6 fait également l'objet d'une régulation post-transcriptionnelle. L'ARNm de DUSP6 est stabilisé par l'activation de la voie MAPK (demi-vie de l'ARNm passant de 8 à 25 minutes environ), selon un mécanisme dépendant de l'extrémité 3' non traduite de l'ARNm [205]. L'hypoxie, caractéristique des tumeurs malignes, est également capable de stabiliser

l'ARNm de DUSP6, selon un mécanisme qui pourrait dépendre de HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) et de la voie MEK-ERK [205]. Ceci pourrait être un moyen pour les cellules tumorales de limiter l'activation excessive de la voie ERK, qui peut conduire à l'apoptose [224].

DUSP6 fait ainsi l'objet d'une régulation complexe par ERK, à plusieurs niveaux, transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel (figure 9). Ces mécanismes de régulation sont susceptibles d'expliquer les fréquentes discordances, observées dans la littérature, entre niveaux d'ARNm de DUSP6 et niveaux protéiques de DUSP6 [204-206]. Ces régulations complexes permettent de comprendre que l'augmentation de la phosphorylation de ERK conduit à une élévation parallèle de l'ARNm de DUSP6 et de la protéine, mais de manière limitée pour cette dernière en raison de sa dégradation par le protéasome, induite par p-ERK (boucle de rétrocontrôle).

5.2 DUSP5.

Les données sur DUSP5 sont beaucoup moins nombreuses que celles pour DUSP6. DUSP5 est une phosphatase nucléaire, dont l'expression est également induite par l'activation de la voie MAPK [199, 200, 203]. DUSP5, comme les autres phosphatases de classe I (tableau 5), est codé par un gène possédant 4 exons et 4 introns, à des positions très conservées entre espèces [195]. Il n'existe pas de modèle murin d'inactivation de DUSP5 publié à ce jour.

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle de DUSP5 sont mal connus. La protéine p53 a été décrite comme étant impliquée dans l'expression de DUSP5, par liaison directe à son promoteur, dans un modèle de lignée cellulaire humaine de cancer du côlon [225]. Ceci n'explique pas l'induction de l'expression de DUSP5 par la voie MAPK. Une démonstration indirecte de régulation par cette voie a été faite par Nunes-Xavier et coll. dans des lignées cellulaires humaines de cancer du sein [200]. Ces auteurs ont identifié un élément de réponse potentiel pour le facteur de transcription AP-1, en amont du site d'initiation de la traduction de DUSP5, sans néanmoins montrer sa séquence et sa position exacte sur le gène. Cet élément de réponse est capable de lier un dimère c-Fos/c-Jun, ce dernier étant régulé par la voie MAPK. La perte d'induction de l'ARNm de DUSP5, induite par du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, connu pour activer la voie MAPK), suite à l'inactivation de c-Jun par interférence d'ARN, apparait comme une démonstration indirecte de l'implication du site AP-1 dans la régulation transcriptionnelle de DUSP5. Ces mêmes auteurs ont également identifié

un site potentiel pour le facteur de transcription Ets-2, régulé par la voie MAPK, en amont du site d'initiation de la transcription de DUSP5. Néanmoins, l'inactivation spécifique de Ets-2, par interférence d'ARN ne modifiait pas le niveau d'ARNm de DUSP5 induit par le PMA. Ces données n'étaient pas en faveur du caractère fonctionnel de ce site Ets-2. Les mécanismes expliquant l'induction de l'expression de DUSP5 par la voie des MAPK sont donc largement méconnus.

Il n'y avait jusqu'à présent pas de données concernant la régulation post-transcriptionnelle de DUSP5 (stabilité de l'ARNm). Tout comme DUSP6, DUSP5 est soumis à une régulation post-traductionnelle. DUSP5 est ubiquitinylée, puis dégradée par le protéasome [199]. DUSP5 est également phosphorylé par ERK sur 3 résidus, au sein de son domaine C-terminal. Cette phosphorylation nécessite l'interaction de DUSP5 avec ERK, via un domaine d'interaction avec la kinase (KIM). Cette phosphorylation ne semble pas affecter la demi-vie de la protéine [199]. L'association de DUSP5 avec ERK stabilise la protéine (sans que la phosphorylation de DUSP5 par ERK ne soit responsable de cette stabilisation), ce qui pourrait permettre de renforcer son rôle phosphatasique et d'ancrage nucléaire de ERK inactivé [199]. Cet ancrage dépend du domaine de localisation nucléaire de DUSP5 [197]. La liaison de DUSP5 à ERK ou la phosphorylation de DUSP5 par ERK ne modifie pas l'activité phosphatasique de DUSP5 [197, 199]. L'activité catalytique basale de DUSP5 est d'emblée maximale et supérieure à celle de DUSP6 [197].

En résumé DUSP5 et DUSP6 sont activées par la voie MAPK et déphosphorylent ERK dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif. Par la suite les deux phosphatases sont dégradées par le protéasome. Cette régulation fine, dynamique, qui vise à maintenir un niveau régulé de p-ERK, est résumée dans la figure 9.

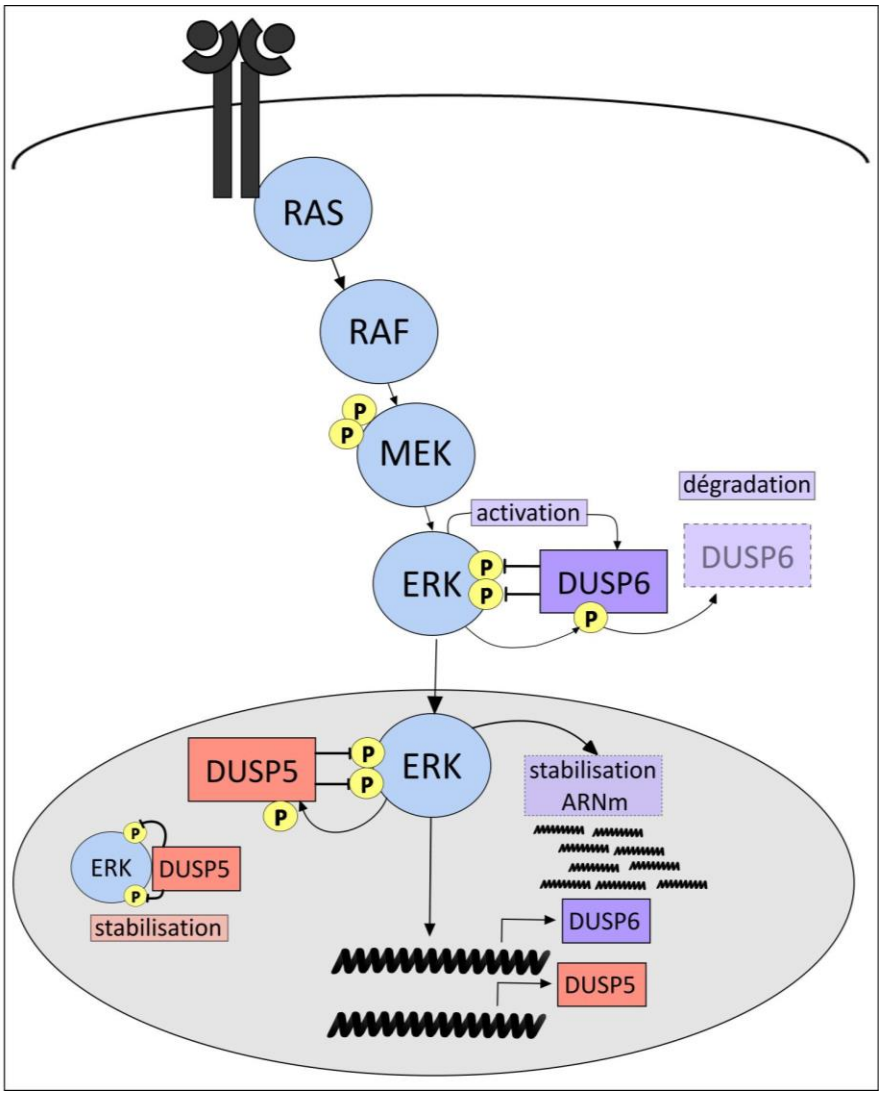

Figure 9. Régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de DUSP5 et DUSP6.

5.3 DUSP5 et DUSP6 en pathologie cancéreuse.

Le tableau 6 récapitule les modifications d'expression de DUSP5 et DUSP6 et leur rôle sur la prolifération, selon le modèle tumoral. Ces études montrent que DUSP5 et DUSP6 peuvent jouer, soit un rôle de gêne suppresseur de tumeur, soit, au contraire, favoriser la survie

cellulaire (oncogène). Il ressort du tableau 6, que le rôle de DUSP5 et DUSP6 sur la prolifération tumorale est extrêmement variable selon le modèle tumoral. DUSP5 et DUSP6 auraient un rôle de gène suppresseur de tumeur dans les cancers suivants :

- cancers du poumon non à petites cellules et colorectal, pour DUSP5 ;
- cancers du poumon non à petites cellules, colorectal, ovarien, pancréatique, épidermoïde de l'œsophage et de l'oropharynx, pour DUSP6.

En revanche, DUSP5 et DUSP6 ont un rôle d'oncogène dans les cancers suivants :

- sein, col utérin et lymphomes pour DUSP5 ;
- sein, col utérin, endomètre pour DUSP6.

Le rôle de DUSP6 est plus complexe dans les mélanomes et les glioblastomes, où selon le modèle cellulaire ou animal étudié, la phosphatase peut avoir soit un rôle de gène suppresseur de tumeur, soit d'oncogène.

L'absence de généralisation possible sur le rôle de ces phosphatases en cancérogenèse justifie d'étudier spécifiquement chaque modèle tumoral, ce qui nous a conduit à préciser leur fonction dans la tumorigenèse thyroïdienne.

Les phosphatases DUSP5 et DUSP6 ont déjà été impliquées dans la tumorigenèse des CPT. Les données de transcriptome de CPT démontrent une surexpression de ces phosphatases [198, 226-229]. Le niveau protéique de DUSP6 a aussi été démontré plus élevé dans des CPT humains que dans des adénomes thyroïdiens [230]. Aucune mutation de DUSP5 ou DUSP6 n'a été décrite parmi 500 cancers de la thyroïde analysés lors du programme de « Cancer Genome Atlas » (www.cbioportal.org). De même dans les mélanomes et les cancers du pancréas aucune mutation de DUSP5 ou DUSP6 n'a été identifiée ([231 , 232], www.cbioportal.org). D'exceptionnelles variations de séquence de DUSP5 ou DUSP6 ont été décrites, sans preuve de leur caractère délétère (www.cbioportal.org). Une mutation de DUSP5 a été identifiée au sein de malformations vasculaires et de tumeurs vasculaires bénignes [233].

Il existe des données concernant le rôle de DUSP6 sur la prolifération et le rôle potentiel invasif dans les cancers thyroïdiens. L'inactivation spécifique de DUSP6 dans la lignée cellulaire TPC1, porteuse d'un réarrangement RET/PTC1, réduit les propriétés de morphogenèse des cellules et leur potentiel invasif et migratoire [234]. Une baisse de prolifération n'était observée qu'au 5ème jour après l'inactivation de DUSP6, sans qu'un

phénomène d'apoptose n'ait pu être mis en évidence [234]. L'inactivation de DUSP6 dans les lignées humaines FRO (dérivée d'un cancer anaplasique de la thyroïde muté B-RAF^{V600E}) et NIM-1 (dérivée d'un CPT porteur de la mutation B-RAF^{V600E}) est responsable d'une baisse de la prolifération cellulaire et d'une diminution nette de la capacité de migration des cellules [230 , 234]. Le potentiel invasif et migratoire était également réduit dans deux autres lignées, K1 et B-CPAP, dérivées d'un CPT porteur de la mutation B-RAF^{V600E}. L'effet sur la prolifération pour ces deux dernières lignées n'était pas rapporté [234].

Les DUSPs sont des effecteurs clés du contrôle de la croissance et de la survie dans des conditions physiologiques ou pathologiques, comme par exemple les cancers [235]. Lors d'un crible large pour identifier des kinases et des phosphatases impliquées dans l'apoptose et la survie cellulaire, différentes DUSPs, dont DUSP5 et DUSP6 ont été identifiées comme jouant un rôle dans la survie cellulaire, grâce à une approche d'interférence d'ARN dans les cellules de cancer du col utérin HeLa, [236]. Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques des DUSPs représente un champ nouveau de recherche en thérapie cancéreuse, bien qu'aucun des inhibiteurs développés ne soient encore validés pour une utilisation clinique [235].

De façon intéressante, un inhibiteur pharmacologique de DUSP6 a été identifié au cours d'un crible large de nouveaux composés chimiques, dans un modèle transgénique de poisson-zèbre [237]. Cet inhibiteur, le BCI,(E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one, inhibait efficacement DUSP6, mais également DUSP1 *in vitro*, probablement en bloquant l'activation allostérique de DUSP6 par ERK [237]. Comme attendu cet inhibiteur était responsable d'une augmentation du niveau de ERK phosphorylé, dans des cellules de cancer du col utérin HeLa [237]. Cet inhibiteur n'a encore jamais été testé en cancérologie.

Tableau 6. Modification d'expression de DUSP5 et DUSP6 dans les cancers ou des lignées cellulaires humaines et rôle évoqué sur la prolifération par inactivation ou surexpression de la phosphatase correspondante *in vitro* et/ou *in vivo*.

Surexpression en vert ; sous-expression en rouge ; baisse de prolifération et/ou du potentiel invasif en bleu ; augmentation de prolifération et/ou du potentiel invasif en jaune

DUSP	Cancer	Modification d'expression	Rôle sur la prolifération		Réf
			Inactivation	Surexpression	
DUSP5	Sein	-	**Arrêt de croissance cellulaire** accéléré après traitement des cellules par le PMA*.	Acquisition d'un **phénotype migratoire** et **formation de colonies dans l'agar**.	[200]
	Col utérin	-	**Diminution de la prolifération** cellulaire et **apoptose** massive.	-	[236]
	Poumon non à petites cellules	-	-	**Diminution de la capacité à former des colonies.**	[225]
	Colorectal	-	-	**Diminution de la capacité à former des colonies** (2 lignées cellulaires exprimant ou non p53, dérivant de la même lignée).	[225]
	Lymphome	- Lignée de **lymphome de Burkitt** après induction de l'apoptose par des anticorps anti IgM **: surexpression**; - Lignées de **lymphome à cellules du manteau : surexpression**.	**Diminution de la prolifération** de lignées cellulaires humaines de lymphome à cellules du manteau.	-	[238, 239]
	Ovaire	Lignées dérivées de cancer de l'ovaire résistantes aux sels de	-	-	[240]

DUSP5		platine : **sous-expression**.			
DUSP6	Pancréas	- **Lésion dysplasique** ou **carcinome in situ : surexpression;** - **Carcinome invasif** (tissu ou lignées) : **sous-expression** (par hyperméthylation de la région promotrice ou par perte allélique en 12q21).	-	**Diminution de la prolifération cellulaire par apoptose.**	[232, 241-243]
	Sein	- **Lignée** épithéliale de **cancer du sein**, exprimant H-RAS de façon stable : **surexpression**; - **Tissu tumoral** provenant de patientes **résistantes aux tamoxifène : surexpression**; - Tissu tumoral de **cancers du sein HER2+ : surexpression**.	**Arrêt de la croissance cellulaire** accéléré après traitement des cellules par le PMA* ;	- Acquisition d'un **phénotype migratoire** et de **formation de colonies dans l'agar** ; - Induction d'une **résistante au tamoxifène** d'une lignée humaine de cancer du sein, exprimant le récepteur aux œstrogènes.	[200, 244, 245]
	Endomètre	**Lignée** de **cancer de l'endomètre** : **surexpression**.	**Diminution de la croissance cellulaire** induite par le tamoxifène ;	**Renforcement de l'effet agoniste du tamoxifène**.	[246]
	Myélome	**Lignée** de **myélome** exprimant une forme constitutivement active de N-RAS : **surexpression**.	-	-	[247]
	Mélanome	- Lignée de **mélanome** exprimant une forme constitutivement active de B-Raf : **surexpression**. - Dans certains **mélanomes humains : surexpression**.	-	- **Favorise la croissance** de colonies indépendante de l'ancrage et le **potentiel invasif** de mélanocytes de souris immortalisés ; - **Diminution de la prolifération** et du **potentiel invasif** de lignées de	[248-250]

				mélanome humain; - **Diminution de la résistance au cisplatine** de lignées de mélanome humain.	
	Gliome	Lignée de **gliome** exprimant une forme constitutivement active d'EGFR : **surexpression**.	-	-	[251]
	Glioblastome	Lignées de **glioblastome** : **surexpression**.	**Sensibilise au cisplatine** (in vitro et in vivo)	- **Diminution de la prolifération cellulaire** et **augmentation de la dépendance à l'ancrage** *in vitro* - **Augmentation du potentiel clonogénique** *in vitro* - **Résistance à l'apoptose induite par le cisplatine** *in vitro* et *in vivo*.	[252]
DUSP6	Poumon non à petites cellules**	- Dans la plupart des lignées de cancer du poumon : **sous-expression**; - **Lignées** ou **xénogreffes** humaines de cancer du poumon résistantes au cisplatine : **surexpression**; - Perte d'hétérozygotie dans 17% des tumeurs.	- **Augmentation de la prolifération cellulaire**, dans une lignée cellulaire exprimant fortement DUSP6;	- **Arrêt de la croissance cellulaire avec apoptose** dans certaines lignées; - **Diminution de la prolifération cellulaire** en présence d'un inhibiteur de l'EGFR, *in vitro*.	[201, 253-256]
	Ovaire	Lignées dérivées de cancer de l'ovaire, en particulier celles résistantes aux sels de platine : **sous-expression**.	**Augmentation de la prolifération** cellulaire et de la **résistance des lignées au cisplatine** ;	**Diminution de la prolifération** des cellules et du développement de tumeurs chez des souris nude et **sensibilisation des cellules à l'apoptose** induite par le cisplatine *in vitro* et *in vivo*.	[240 , 257]

DUSP6	Carcinome épidermoïde de l'œsophage et de l'oropharynx	Lignées cellulaires et cancers: **sous-expression** fréquente.	-	- **Diminution de la tumorigénicité** *in vitro* de la plupart des lignées cellulaires, et *in vivo* dans un modèle murin ; - **Altération** du processus de **transition épithélium-mésenchyme** *in vitro*.	[258]
	Col utérin	-	**Diminution de la prolifération** cellulaire avec **apoptose**.		[236]
	colorectal	-	**Baisse de la mort cellulaire** induite par le 5-Flurouracil.	- **Absence d'effet sur la prolifération** cellulaire *in vitro* ; - **Sensibilisation des cellules à l'apoptose** induite par le 5-Flurouracil ;	[222]

* PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate, connu pour activer la voie MAPK.

** **Il existe une corrélation inverse** entre niveau d'expression de **DUSP6** et grade ou nombre de **mitose** tumoral pour les cancers humains pulmonaires non à petites cellules. Une signature moléculaire incluant 5 gènes, dont DUSP6, a été identifiée comme corrélée à la survie globale et sans progression. La **faible expression de DUSP6** semble être corrélée à des **survies meilleures. Aucune mutation de DUSP6** n'est décrite.

6 Activation de la transcription par la voie ERK : l'exemple de *c-fos*.

ERK a plus de 150 cibles identifiées qui peuvent être réparties dans les catégories suivantes et dont le nombre augmente chaque année [187, 259] :

- facteurs de transcription
- kinases et phosphatases
- protéines du cytosquelette et adaptatrices
- récepteurs et molécules de signalisation
- protéines apoptotiques
- autres

La voie MEK-ERK peut contrôler l'expression de gènes de nombreuses façons [260].

La première passe par la liaison et la phosphorylation de différents substrats, notamment des facteurs de transcription.

Dans certains cas, la phosphorylation de ces facteurs de transcription permet de réguler leur stabilité [260]. Ainsi, c-fos, faisant partie du complexe protéique de transcription AP-1, n'est stable que s'il est phosphorylé à son extrémité C-terminal, en réponse à une activation soutenue de ERK. En revanche, en cas d'activation transitoire de ERK, c-fos n'est pas phosphorylé, il est dégradé.

ERK peut également phosphoryler certains composants du complexe d'initiation de la transcription et en faire partie intégrante [260]. Ainsi ERK peut phosphoryler l'extrémité C-terminale de la RNA polymérase II ou encore la TATA binding protein et ainsi augmenter sa liaison à la TATA box.

La voie MAPK peut également intéragir avec les voies régulant les modifications post-traductionnelles (incluant acétylation, méthylation, ubiquitination et sumoylation) des facteurs de transcription. A titre d'exemple, la phosphorylation de nombreux facteurs de transcription peut favoriser leur ubiquitination et ainsi leur dégradation [260]. La phosphorylation de certains facteurs de transcription entraine la perte de conjugaison par les protéines SUMO responsables de la répression de ces facteurs (voir paragraphe 6.1 à titre d'exemple) et donc l'activation de la transcription. ERK peut aussi intéragir directement ou indirectement avec des histone-acétyl transférases ou déacétyl-transférases modifiant la structure de la

chromatine, facilitant ainsi l'activation de la transcription ou au contraire réprimant la transcription [260] (voir paragraphe 6.1 à titre d'exemple).

L'activation de la transcription du gène de réponse immédiate *c-Fos*, probablement le plus étudié de cette famille de gène, récapitule une grande partie des mécanismes de régulation de l'expression des gènes par la voie MAPK.

6.1 Modifications de la chromatine et activation de la transcription de *c-fos*.

Le gène *c-Fos* a été identifié initialement comme étant très rapidement induit par le sérum ou des facteurs de croissance dans des lignées cellulaires de mammifères [261]. L'activation de sa transcription peut schématiquement être séparée en 2 étapes : des modifications de la chromatine qui modifient l'architecture du promoteur d'une part et d'autre part, le recrutement puis l'activation de la RNA polymérase qui permet la transcription.

Concernant les modifications de la chromatine, la phosphorylation et l'acétylation d'histone contribuent significativement à l'activation de *c-fos*. De façon plus précise, c'est le phénomène dynamique d'acétylation/déacétylation plutôt que l'augmentation constante du niveau d'acétylation qui est importante pour l'activation de *c-fos*. D'une manière générale, les modifications dynamiques d'histone les plus importantes ont lieu au sein des nucléosomes de la partie proximale du promoteur, en particulier ceux localisés en aval du site d'initiation de la transcription. Néanmoins, pour *c-fos*, le nucléosome le plus important semble être celui situé juste en amont (« nucléosome -1 ») du site d'initiation de la transcription. Les évènements les plus précoces à l'origine de l'activation de *c-fos* ont lieu au sein et autour de ce nucléosome.

Suite à la stimulation par des facteurs de croissance, un des membres de la sous famille TCF (Ternary Complex Factor) des facteurs de transcription ETS (E-twenty six), Elk (E26-like kinase)-1 est phosphorylé par ERK au sein de son domaine C-terminal. La phosphorylation de Elk-1 entraine une modification de sa conformation, augmentant sa capacité de liaison à l'ADN sur son élément de réponse EBS (Ets binding site). Elk-1 interagit alors avec le facteur de transcription SRF (serum response factor) qui est constitutivement lié à l'ADN, sous forme d'un dimère, sur son élément de réponse, nommé CArG Box, dont la séquence consensus est $CC(A/T)_6GG$. L'activation de l'expression de c-fos dépend du complexe TCF-SRF et d'une

série d'autres facteurs de transcription non encore clairement identifiés, se liant en amont et en aval du complexe. Le site de liaison du complexe TCF-SRF sur l'ADN nommé SRE (serum response element et constitué de l'association d'un EBS et d'un site CArG) est situé juste en amont du nucléosome -1 de *c-fos* (figure 10).

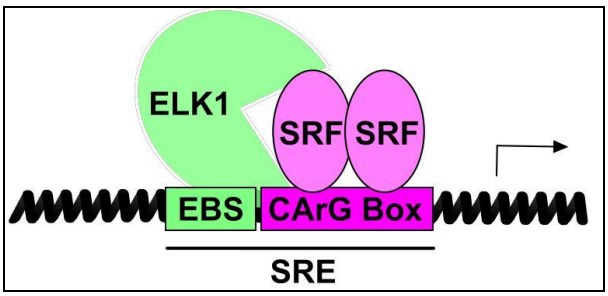

Figure 10. Représentation schématique d'un SRE (serum response element). Le SRE est constitué d'un site EBS (Ets binding site) capable de lier des facteurs de transcription appartenant à la famille TCF (ternary complex factor), comme Elk1 et d'une CArG Box, capable de lier le facteur de transcription SRF (serum response factor) sous forme d'un dimère.

Dans d'autres situations, SRF peut recruter et coopérer avec d'autres facteurs de co-régulation comme les membres de la famille MRTF (myocardin-related transcription factor), qui peuvent activer l'expression de c-fos. Les membres de la famille MRTF peuvent eux-mêmes être phosphorylés par la voie MEK-ERK.

A l'état basal, Elk-1, lié au promoteur de *c-fos*, est réprimé par SUMOylation (small ubiquitin-related modifier) et recrute un complexe contenant des co-represseurs dont des histones déacétylase (HDAC) maintenant ainsi une expression basale faible de c-fos. La stimulation de la voie MEK-ERK par un facteur de croissance déclenche une série d'évènements autour du nucléosome -1 de *c-fos*. La phosphorylation de Elk-1 entraine la perte à la fois de la SUMOylation et du complexe de co-répresseur. Le niveau d'acétylation des histones augmente. Ceci serait lié à une activation allostérique de l'activité acétyl-transférase de p300 par Elk-1, suite à sa modification conformationelle. Elk-1 a également été impliqué dans le recrutement de MSK (myocardial SNF1-like kinase) au promoteur de *c-fos*, promouvant ainsi la phosphorylation d'histone. Les modifications d'acétylation des histones permettent ainsi le recrutement de NF1 (nuclear factor 1) à l'ADN. NF1 recrute à son tour PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) qui pourrait également faciliter le recrutement d'autres complexes de remodellage de la chromatine. Après ces modifications de la chromatine, la protéine Médiator est recrutée, via sa liaison avec Elk-1, permettant

l'assemblage de la machinerie basale de transcription et l'augmentation de l'activité de la RNA polymérase. En plus de l'initiation de la transcription, un point de contrôle majeur de l'activation de la transcription de *c-fos* est le contrôle de l'élongation. Dans les cellules quiescentes, la RNA polymérase II est déjà liée à la région promotrice de *c-fos*. L'élongation de la transcription est bloquée à l'état basal et ce blocage est levé grâce au recrutement de facteurs d'élongation par l'intermédiaire de la protéine Médiator [261].

6.2 Autres mécanismes de contrôle de l'expression de *c-fos*.

L'activation de l'expression du gène de réponse immédiate *c-fos* est rapide mais également transitoire, avec un pic d'expression obtenue 30-60 minutes après stimulation par des facteurs de croissance, suivi d'un retour au niveau basal d'expression en 60 à 90 minutes. Il découle de cette observation que la stabilité de l'ARNm doit être courte pour permettre une élimination rapide de l'ARNm. Ceci est médié notamment par la protéine de liaison à l'ARN ZFP36 (zinc-finger protein 36) responsable de la dégradation de l'ARNm de *c-fos*. ZFP36, est elle-même codée par un gène de réponse immédiat dont l'expression est activée par la voie MAPK dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif [261].

Une autre caractéristique intéressante des gènes de réponse immédiate, comme *c-fos*, est leur très faible niveau basal d'expression [261]. Des micro-ARN ont également été impliqués dans ce processus et certains micro-ARN pourraient spécifiquement agir pour permettre de maintenir un très faible niveau d'expression basale des gènes de réponse immédiate, comme *c-fos* ou *jun* [261 , 262]. Ces micro-ARN sont intimement liés à la voie MAPK, puisque leur expression est rapidement éteinte suite à la stimulation par des facteurs de transcription, permettant ainsi l'accumulation des transcripts de gènes de réponse immédiate.

Hypothèses

Différentes anomalies moléculaires de la voie MAPK sont identifiées au sein des CPT, conduisant à son activation constitutive, se traduisant par une augmentation de la phosphorylation de ERK.

Ces différentes anomalies moléculaires n'ont pas les mêmes conséquences clinico-biologiques. Les tumeurs mutées pour l'oncogène *B-RAF* sont associées à des critères histo-pronostiques d'agressivité (métastases ganglionnaires ou à distance, extension extra-thyroïdienne, récidives, voire mortalité). Cette agressivité plus importante de ces cancers avec une mutation de B-RAF est relative, dans la mesure où globalement ce type de tumeur garde un bon pronostic. Toutefois, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de cette agressivité restent incompris.

Une hypothèse pourrait être un degré d'activation de la voie MAPK différent en fonction de l'anomalie moléculaire présente au sein d'un cancer donné. La voie MAPK pourrait être ainsi activée de manière plus intense dans les tumeurs thyroïdiennes mutées pour B-RAF par rapport aux cancers porteurs d'autres anomalies moléculaires.

Ceci nous a conduits à étudier les déterminants du niveau de phosphorylation de ERK dans ces tumeurs, et en particulier le rôle de deux inhibiteurs de la voie MAPK, à savoir deux phosphatases inactivant ERK spécifiquement : DUSP5 et DUSP6.

Nous avons formulé deux hypothèses opposées (figure 11):

- DUSP5 et DUSP6 pourraient être des marqueurs précoces d'activation de la voie MAPK : les données de la littérature sont en faveur d'une induction des phosphatases DUSP5 et DUSP6 par la voie MAPK, réalisant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif [101, 102]. On peut faire l'hypothèse d'une activation différentielle de ces deux phosphatases en fonction de l'anomalie moléculaire présente au sein d'un CPT.

- DUSP5 et DUSP6 pourraient être des gènes suppresseurs de tumeurs : leur perte d'expression ou d'activité conduirait à une phosphorylation augmentée de ERK et par là même à une prolifération accrue. DUSP6 a déjà été impliqué comme gène suppresseur de tumeurs dans les cancers du poumon non à petites cellules, de l'ovaire et colorectaux (tableau 6).

Dans l'hypothèse où DUSP5 et DUSP6 seraient de simple marqueur de l'activation de la voie MAPK, dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif, il est intéressant de connaitre les mécanismes à l'origine de l'induction de ces phosphatases. La régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de DUSP6 par la voie MAPK est bien connue. En revanche, les données dans la littérature concernant DUSP5 sont rares.

Nous avons étudié la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de DUSP5, en faisant l'hypothèse du rôle de facteurs de transcription régulés par la voie MAPK, toujours dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif.

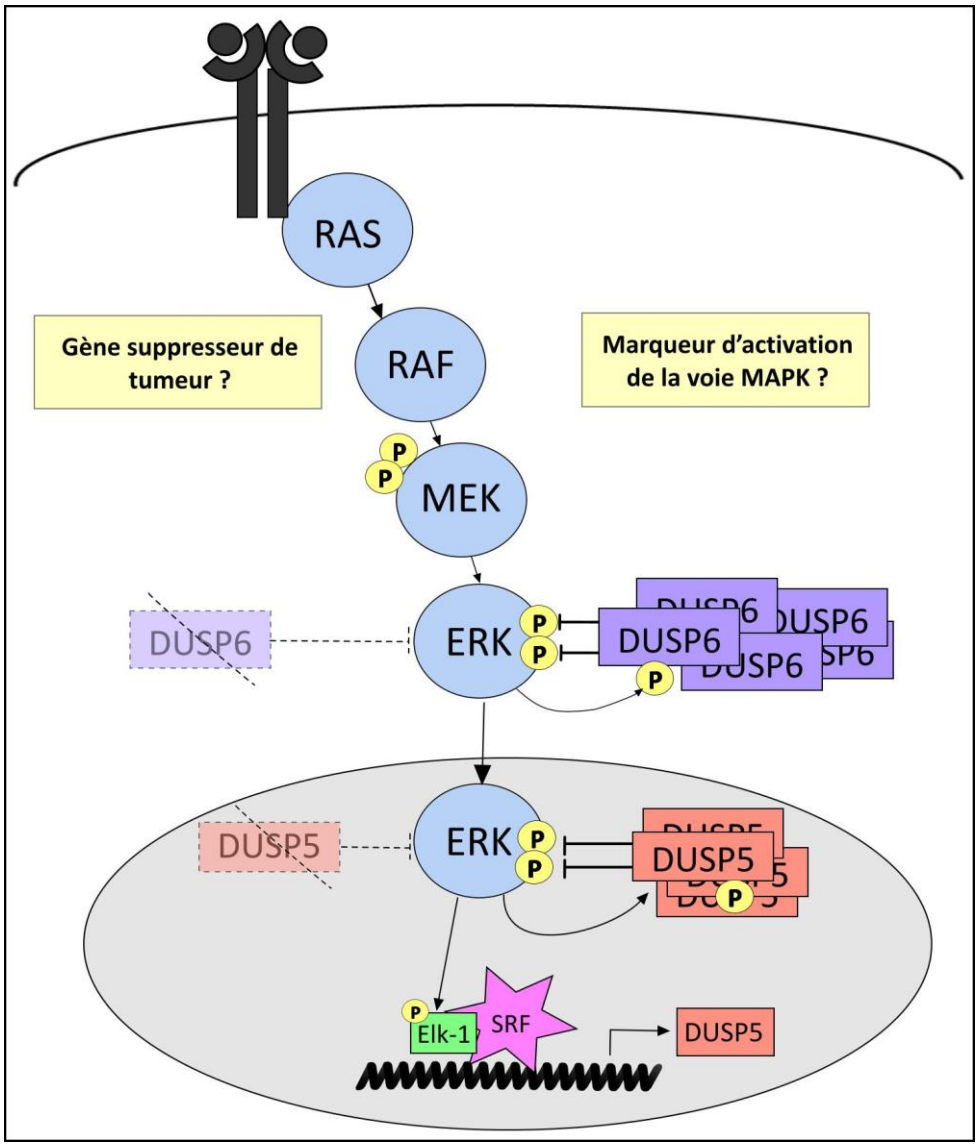

Figure 11. Etude des phosphatases spécifiques de ERK, DUP5 et DUSP6, cibles d'activation de la voie MAPK : gène suppresseur de tumeurs et/ou marqueurs d'activation dans les cancers papillaires de la thyroïde ?

Objectifs et méthodologie du travail

1. Etude de la régulation des phosphatases DUSP5 et DUSP6 et rôle dans la prolifération dans les CPT.

1.1. Etude du degré d'activation de la voie MAPK dans des lignées cellulaires dérivées de cancers de la thyroïde humains.

Nous avons étudié le degré d'activation de la voie MAPK, en fonction de l'anomalie moléculaire identifiée, dans 11 lignées cellulaires dérivées de cancers de la thyroïde humains, en analysant, par Western Blot, les niveaux protéiques de MEK phosphorylé et total ainsi que de ERK phosphorylé et total. La constatation de niveaux équivalents de p-ERK, quelles que soient l'anomalie identifiée, contrastant avec des niveaux de p-MEK plus élevés dans les lignées B-RAF^{V600E} que dans les autres, nous a conduits à étudier le rôle de phosphatases spécifiques de ERK : DUSP5 et DUSP6.

1.2 Etude de la régulation des phosphatases DUSP5 et DUSP6 dans les cellules PCCL3.

Nous avons étudié la régulation de ces phosphatases dans trois lignées stables dérivant de la lignée PCCL3 de thyroïde de rat, exprimant chacune de manière inductible par la doxycyline l'un des trois principaux oncogènes présents dans les CPT : RET/PTC3, H-RAS^{V12} ou B-RAF^{V600E} (figure 12). L'induction des phosphatases a étudié après une cinétique longue de 72h de traitement par la doxycycline (1µg/ml).

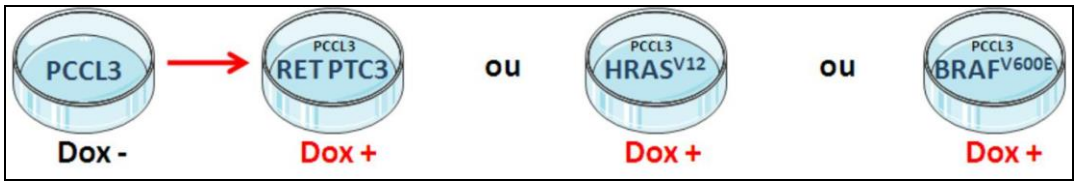

Figure 12. Lignées inductibles dérivant de la lignée PCCL3 de thyroïde de rat. Introduction d'un des trois principaux oncogènes mutés dans les cancers papillaires (RET/PTC3, H-RAS^{V12} ou B-RAF^{V600E}) dans la lignée d'origine PCCL3. Chaque oncogène est sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline.

1.3 Etude des voies de signalisation impliquées dans l'induction des phosphatases.

Les voies de signalisation impliquées dans l'induction des phosphatases par les oncogènes, ont été explorées, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, notamment des voies des PI3K et des MAPK (figure 13). L'effet du LY294002 (10 µM), inhibiteur de la voie PI3K et de l'UO126 (20 µM), inhibiteur de la voie MPAK ont été étudiés, lors d'une cinétique courte de traitement par la doxycycline (1µg/ml) : 6 et 9 h ou 12 et 15h selon la lignée étudiée.

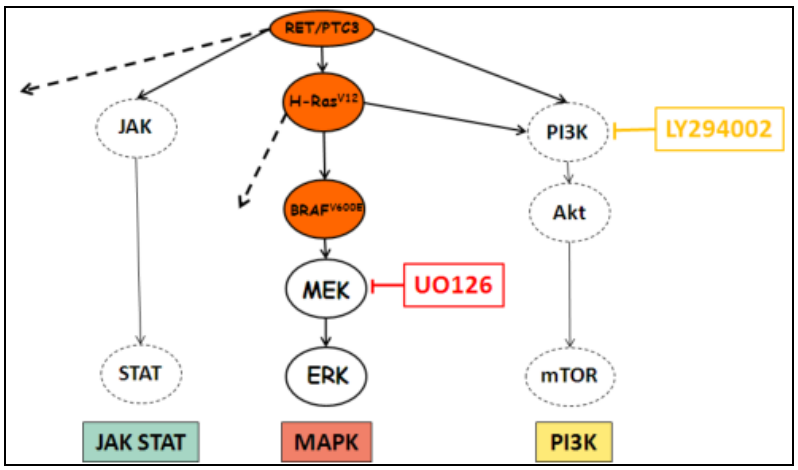

Figure 13 Voies de signalisation impliquées dans l'induction des phosphatases. Les oncogènes identifiés dans les CPT sont responsables de l'activation de voies de signalisation (MAPK, PI3K et JAK-STAT). Nous avons étudié plus spécifiquement la voie MAPK (inhibiteur UO126) et la voie PI3K (inhibiteur LY294002).

1.4 Analyse du niveau d'expression de DUSP5 et DUSP6.

Nous avons analysé le niveau d'expression de DUSP5 et DUSP6 dans des CPT humains, par RT-PCR quantitative en temps réel, et corrélé le niveau d'expression à l'anomalie moléculaire identifiée au sein de la tumeur (figure 14).

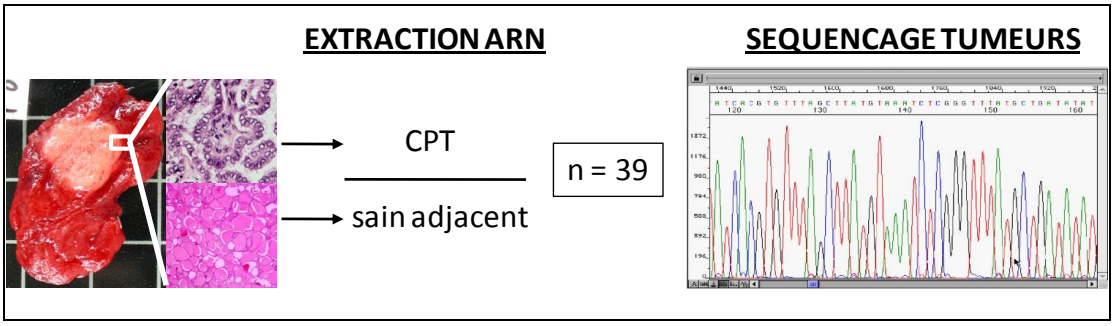

Figure 14. Analyse du niveau d'expression de DUSP5 et DUSP6 dans des CPT humains. Extraction de l'ARN de 39 CPT et du tissu adjacent à la tumeur. Nous avons recherché l'anomalie moléculaire présente au sein de chaque CPT, avant de quantifier par RT-PCR en temps réel le niveau d'expression de DUSP5 et DUSP6.

1.5 Rôle des phosphatases dans la prolifération tumorale de lignées cellulaires dérivant de cancer thyroïdien humain

Le rôle des phosphatases dans la prolifération tumorale de lignées cellulaires dérivées de cancer de la thyroïde humain a été étudié, par inactivation spécifique de DUSP5 et/ou DUSP6 par interférence d'ARN. Deux siRNA dirigés contre chacune des phosphatases ont été transfectés séparément à la concentration de 100 nmol/L pendant 3 jours. Une double inhibition des phosphatases a été réalisée en transfectant pour chacune des deux phosphatases le plus efficace des 2 si RNA à la concentration de 50 nmol/L pendant 3 jours également.

1.6 Effet d'un inhibiteur pharmacologique de DUSP6.

Les conséquences d'un inhibiteur pharmacologique de DUSP6 sur le niveau de phosphorylation de ERK et sur la prolifération dans des lignées cellulaires dérivées de cancer thyroïdien humain mutées B-RAF^{V600E} (8505c et BCPAP) ont été analysées.

L'analyse du niveau de ERK doublement phosphorylé (forme active de ERK) a été analysé par la technologie Nanopro® après traitement des cellules avec de faibles concentrations de l'inhibiteur (3µM) pendant une cinétique de 90 minutes.

L'analyse de la viabilité cellulaire a été analysée au cours d'une cinétique en utilisant de faibles concentrations de l'inhibiteur (1, 2 et 3 µM) pendant 3 jours.

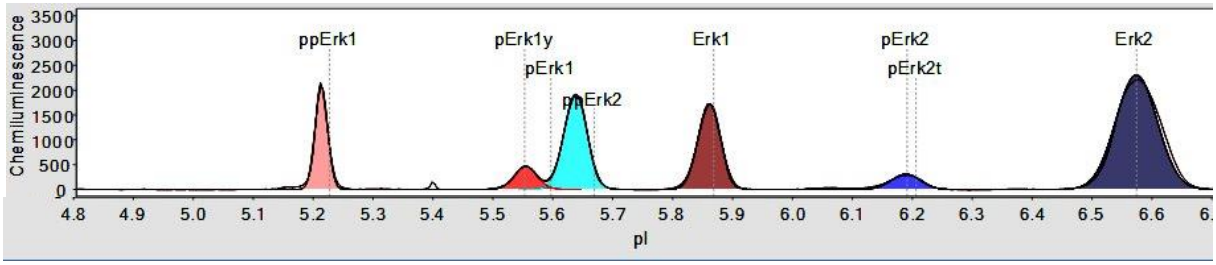

Figure 15. Profil Nanopro® après traitement de la lignée cellulaire 8505c $BRAF^{V600E}$ par un inhibiteur pharmacologique de DUSP6 (3µM). Les différentes formes de ERK phosphorylé sont séparées, selon leur point isoélectrique (en abscisse) et leur quantité est proportionnelle à l'intensité du signal détecté par chimiluminescence à l'aide d'un anticorps anti ERK (en ordonnée).

2 Etude de la régulation transcriptionnelle de DUSP5.

Dans un second temps nous avons cherché à comprendre les mécanismes de régulation d'une cible de la voie des MAPK, en l'occurrence DUSP5. Ce travail a été conduit dans une lignée non thyroïdienne, la lignée NIH3T3 de fibroblastes de souris qui est un modèle facile à étudier, en particulier pour la voie des MAPK.

2.1 Induction et demi-vie de l'ARNm de DUSP5.

L'induction de DUSP5 par les facteurs de croissance (stimulation par sérum de veau fœtal à 20% pendant une cinétique de 80 minutes) et les voies de signalisation impliquées ont été étudiées dans la lignée NIH3T3. L'effet de la wortmannine (10 µM), inhibiteur de la voie PI3K et de l'UO126 (20 µM) ont été étudiés.

2.2 Analyse des régions régulatrices du promoteur de *DUSP5*.

Une analyse de la région promotrice de *DUSP5* (975 paires de bases) a été réalisée à la recherche d'éléments de réponse liant des facteurs de transcription régulés par la voie MAPK. L'identification de plusieurs éléments de réponse, EBS, pouvant lier le facteur de transcription Elk-1, lui-même cible d'activation par ERK phosphorylé, nous a conduits à

déterminer le promoteur minimal nécessaire et suffisant pour l'induction de DUSP5 par le sérum. L'analyse de la séquence du promoteur minimal efficace de *DUSP5* (165 paires de bases) a révélé la présence d'éléments de réponse, nommés CArG Box pouvant lier le facteur de transcription SRF.

2.3 Rôle des EBS et des CArG Box dans la régulation de l'expression de DUSP5.

Le rôle de ces éléments de réponse a été étudié dans des expériences de transfection transitoire de gènes rapporteurs luciférase avec différentes parties du promoteur de *DUSP5*.

Pour tester l'implication des éléments de réponse identifiés, nous avons cotransfecté la partie identifiée comme le promoteur minimal de DUSP5 avec des vecteurs d'expression :

- soit de type dominant-négatif pour SRF, SRF-Engrailed (SRF-En) où SRF est lié au domaine répresseur Engrailed, mais est toujours capable de lier les CArG Box ; ou pour Elk (Elk-En) liant les sites EBS. Des quantités croissantes de ces vecteurs ont été transfectés: 25, 75 et 250 ng par condition.- soit de type dominant-positif pour SRF (SRF-VP16) ou pour Elk (Elk-VP16). Des quantités croissantes de ces vecteurs ont été transfectés: 25, 75 et 250 ng par condition.

- enfin, des formes sauvages de SRF (100 ng) et de Elk-1, porteur d'un tag HA (300 ng).

Une quantité de 250 ng des constructions luciférase du promoteur de DUSP5 ont été transfectées pour chaque expérience.

2.4 Conséquence de l'inactivation de Elk-1 sur le niveau d'ARNm de DUSP5

Les conséquences de l'inactivation de Elk-1 sur les niveaux d'ARNm de DUSP5, par approche d'interférence ARN a été étudiée dans la lignée NIH3T3 transfectée avec 2 siRNA Elk-1 à la concentration de 50 nmol/L chacun, pendant 24 heures.

2.5 Mutagenèse dirigée du promoteur de *DUSP5*.

Nous avons étudié le rôle des deux facteurs de transcription Elk-1 et SRF dans la régulation de l'expression de DUSP5, par une approche de transfection transitoire de vecteur d'expression du promoteur de *DUSP5* porteurs ou non de mutations des éléments de réponse précédemment identifiés (250 ng). L'induction obtenue avec chaque construction luciférase a été analysée après stimulation pendant 7 à 9 h par le sérum de veau fœtal à 20% ou après co-transfection avec les dominants positifs SRF-VP16 (250 ng) ou ELK-VP16 (250 ng).

2.6 Liaison de SRF et Elk-1 au promoteur de *DUSP5*

La liaison de SRF et Elk-1 sur leurs éléments de réponse respectifs a été étudiée par des expériences de gel retard et d'immunoprécipitation de chromatine.

Pour les gels retards, des sondes marquées radioactive (^{32}P), contenant des éléments de réponse de la partie proximale du promoteur de DUSP5 (sites CArG, ou site CArG et site EBS) ont été incubés en présence d'extraits nucléaires (4 à 5 µg) provenant de cellules NIH3T3, stimulées ou non par le sérum ou encore transfectées avec un vecteur d'expression de Elk-1. Les anticorps suivants ont été utilisés (2µg) à la recherche de supershift des bandes observées sur les gels retards : SRF de chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-13029X), HA de chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-805X), ou Ig G de lapin de chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-2027).

Pour les expériences d'immunoprécipitation de chromatine, les cellules NIH3T3 ont été déprivées en sérum pendant 24 heures, puis stimulées par le sérum de veau fœtal à 20% pendant 30 minutes, avant de procéder à la fixation des protéines à la chromatine par du formaldehyde (1%) pendant 10 minutes à température ambiante. La chromatine a ensuite été soniquée, puis incubée en présence de 5 µg des anticorps SRF ou IgG pendant 12 heures à 4°C. Les protéines ont ensuite été libérées de la chromatine par chauffage et traitement à la protéinase K, puis l'ADN purifié avant de procéder aux qPCR d'une région exonique de GAPDH (contrôle négatif), d'une région promotrice de SRF (contrôle positif) et de la région promotrice proximale de DUSP5.

Résultats

1. DUSP5 et DUSP6, deux phosphatases spécifiques de ERK, sont des marqueurs d'une activation forte de la voie MAPK, dans les cancers thyroïdiens papillaires mutés B-RAF.

DUSP5 and DUSP6, two ERK specific phosphatases, are markers of a higher MAPK signaling outpout in BRAF mutated thyroid cancers.

Camille Buffet[1], Karine Hecale-Perlemoine[1], Léopoldine Bricaire[1], Camille Baudry[1], Frédérique Tissier[1,2], Jeffrey Knauf[3,4] , Jérome Bertherat[1,5], Beatrix Cochand-Priollet[6], Marie-Laure Raffin-Sanson[7], James A Fagin[3,4], Lionel Groussin[1,5]

[1] Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR8104), INSERM U1016; Endocrinology, Metabolism, Diabetes Department, Paris, 75014, France.

[2] Department of Pathology, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, 75013, France.

[3] Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York, USA.

[4] Department of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

[5] Department of Endocrinology, Cochin Hospital, Paris, 75014, France.

[6] Department of Pathology, Cochin Hospital, Paris, 75014, France.

[7] Department of Endocrinology, Ambroise-Paré Hospital, Boulogne-Billancourt, 92100, France.

Running title (60 characters) Role of DUSP5 and DUSP6 in thyroid carcinomas

5 keywords: thyroid carcinomas, DUSP5, DUSP6, ERK, $BRAF^{V600E}$

Financial support (source and number of grants)

This work was supported by the American Thyroid Association [ATA R06059KK], a predoctoral fellowship from the French Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, the French National Academy of Medicine and a predoctoral and doctoral fellowship from the Ile de France Regional Health Agency.

Corresponding author (Full name, mailing address, phone and fax number, and e-mail address)

Lionel GROUSSIN, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg St Jacques 75014 Paris, Tel: 0033158411907, Fax: 003358411805, Email: lionel.groussin@cch.aphp.fr. .

Disclose any potential conflicts of interest;

Word count (excluding references), and the total number of figures and tables

Abstract

BRAF mutation occurs frequently (50%) in the most common type of endocrine cancer, i.e. papillary thyroid cancer (PTC), and is virtually in all cases a $BRAF^{V600E}$ mutation. It leads to constitutive activation of the MAPK pathway resulting in MEK and ERK phosphorylation and correlates with aggressive tumor characteristics. Activation of ERK is negatively feedback-regulated by Dual Specificity Phosphatases (DUSPs), especially two ERK-specific DUSPs, DUSP5 (nuclear) and DUSP6 (cytosolic). In this study, we found elevated phosphorylated MEK levels in $BRAF^{V600E}$ human thyroid cancer cell lines in comparison with other cell lines, suggesting a higher degree of MAPK pathway activation. Higher pERK levels were not observed in $BRAF^{V600E}$ human thyroid cancer cell lines. This led us to study the ERK phosphatases expression. Higher levels of DUSP5 and DUSP6 mRNA overexpression were found in human PTCs, especially in $BRAF^{V600E}$ PTC. DUSP5 and/or DUSP6 siRNA inactivation did not affect proliferation in these same cell lines, which may be explained by a compensation observed by one of the other phosphatase.

Altogether our results suggest that the MAPK pathway is more active in $BRAF^{V600E}$ PTC than in PTC with other genetic alteration. DUSP5 and DUSP6, as well as phosphorylated MEK, are markers of activation of the MAPK pathway. Neither phosphatase has tumor suppressor properties in our thyroid cancer cell models. Our results suggest redundancy and functional compensation among DUSPs.

Introduction

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common thyroid malignancy, representing approximately 80% of all cases. In PTC activating-mutations of genes encoding effectors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway are central for malignant transformation (1). This pathway transduces mitogenic signals via activation of receptor tyrosine kinases, leading to the successive recruitment and activation of RAS and members of the RAF family of serine/threonine kinases. A cascade of phosphorylation is then initiated, culminating in the activation by phosphorylation of MEK and secondary the extracellular signal-regulated kinases (ERK).

Rearrangements of the genes encoding the receptor tyrosine kinases *RET* or *NTRK* leading to expression of constitutively active fusion proteins, as well as activating-point mutations of *RAS* or *BRAF*, are found in 70% of all cases of PTC. Mutations only occur in a single component of the MAPK pathway, supporting the idea that constitutive functional activation of any of these effectors alone is sufficient to foster development of PTC. Mutation of the B-isoform of Raf kinases is the most frequent genetic alteration in PTC, with a frequency of approximately 45% (range: 27%-87%) (2,3). More than 90% of mutations are due to a valine to glutamic acid substitution at codon 600 (V600E) termed the $BRAF^{V600E}$ mutation.

There is a general consensus that PTCs with different mutations have distinct histopathologic appearance and biologic properties. Most studies in PTC suggest that BRAF activating mutation is closely associated with extrathyroidal extension, lymph node metastasis, advanced tumor stages, disease recurrence, and even patient mortality (3,4). The molecular mechanisms underlying the association of BRAF mutation with worse prognosis compared to PTC with no or other genetic alterations has so far never been elucidated. Some specific abnormalities have been found in BRAF mutated PTCs, but a complete explanation is still lacking. MAPK

pathway activation, resulting in ERK phosphorylation (pERK), may be very different upon *RET/PTC*, *Ras* or *BRAF* stimulation in PTC. Higher ERK activation in BRAF-associated PTC may explain the worse prognosis.

Levels of ERK phosphorylation are dictated by the coordinated activities of protein kinases and protein phosphatases. Identical pERK immunostaining levels described in human PTC regardless of the genetic alteration (5,6) could be explained by negative feedback control implementing at the pERK level. Though, we sought to study two dual-specificity (Thr/Tyr) MAPK phosphatases (DUSPs), DUSP5 and DUSP6, which belong to this large family known to act as central feedback regulators attenuating MAPK signaling. Both phosphatases are induced by ERK signaling and specifically inactivate ERK by dephosphorylation (7-10). DUSP5 localizes in the nucleus (11) while DUSP6 is in the cytoplasm (12). Complex post-translational regulation of both phosphatases allows pERK steady state levels to be tightly regulated. Accumulation of DUSP5 and DUSP6 protein is regulated by rapid proteasomal degradation (8,13). It has been shown that phosphorylation of DUSP6 by ERK1/2 enhances its proteasomal degradation (13). Accordingly, increasing levels of pERK will induce DUSP5 and DUSP6 expression, which in turn will be rapidly degraded.

DUSP6 is a candidate tumor suppressor gene. In pancreatic cancers, which have a high prevalence of KRAS mutations, loss of heterozygosity at the *DUSP6* locus, epigenetic inactivation and decreased DUSP6 expression is associated with invasive and poorly differentiated forms of the disease (14,15). Also, loss of DUSP6 expression in ovarian cancer cells, increases ERK activity, cell proliferation and resistance to chemotherapy (16). In PTCs, data from transcriptional expression profile studies suggest that DUSP6 is overexpressed (17). Notwithstanding that DUSP5 is the lead candidate to serve as the critical site for mitogenic signal termination and sequestration of ERK away from MEK, its cytoplasmic activator, published data on its role in carcinogenesis are scarce (18).

The functional and clinical significance of DUSP5 and DUSP6-mediated regulation of ERK signaling in PTC has not been investigated. We hypothesized that DUSP5 and DUSP6 may be biomarkers of the MAPK outpout in PTCs, in the context of a negative feedback loop. We also tested the hypothesis that these phosphatases could act as tumor suppressor genes in PTC. To this end, we studied the MAPK pathway activation, the expression and regulation of DUSP5 and DUSP6 and their inactivation in thyroid cancer cell lines and in human PTCs. We found that DUSP5 and DUSP6 are overexpressed in human thyroid carcinomas and are a surrogate marker of the MAPK pathway activation. Output of the pathway depends on the molecular alteration identified in the tumor. The MAPK pathway is strongly activated in *BRAF*^{V600E} thyroid carcinomas as suggested by elevated phospho-MEK and DUSP5/ DUSP6 mRNA levels. Silencing of DUSP5 or/and DUSP6 in these cell lines does not affect proliferation, possibly explained by an observed compensation between phosphatases.

Materials and Methods

Cell lines

PCCL3 RET/PTC3, HRAS^{V12} and BRAF^{V600E} cells are derived from the well differentiated, non-transformed rat thyroid cell line PCCL3 that conditionally express RET/PTC3, HRAS^{V12} or BRAF^{V600E} respectively, in a doxycycline-dependent manner (19-21). The PCCL3 derived cell lines were propagated in H4 complete medium, which consisted of Coon's modification of Ham's F12 media containing 5% FCS, glutamine (286 µg/mL), apotransferrin (5 µg/mL), hydrocortisone(10 nmol/L), insulin (10 µg/mL), thyroid-stimulating hormone(10 mIU/mL), penicillin, and streptomycin.

We used a panel of 11 human thyroid cancer cell lines, obtained in 2010: Hth74 (22), TTA1 (23), TPC1 (24), ACT1 (25), Cal62 (26,27), C643 (28), SW1736 (29), KTC1 (30), Hth104 (31), BCPAP (32), 8505c (33). The 8505c (DSMZ number: ACC 219) and B-CPAP (DSMZ number: ACC 273) cell lines were purchased from the German Collection of Microorganisms

and Cell Culture. This cell bank genetically fingerprinted these last two cell lines by multiplex PCR of minisatellite markers that revealed a unique DNA profile. They were passaged in our laboratory for fewer than 3 months after resuscitation. All other cell lines were provided by J. A. Fagin (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA) with permission from N.-E. Heldin (University Hospital, Uppsala, Sweden; HTh74, C643, SW1736), from N. Onoda (Osaka University of Medicine, Osaka, Japan; TTA-1 and ACT-1), from S.M. Jhiang (Department of Physiology and Cell Biology, the Ohio State, USA; TPC-1), from M. Santoro (Department of Biology and Cellular and Molecular Pathology, Institute of Endocrinology and Experimental Oncology National Research Council, Naples, Italy; Cal62), from J. Kurebayashi (Departments of Breast and Thyroid Surgery, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Okayama, Japan; KTC1) and from G. Andrew (Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden; Hth104). C643 and Cal-62 have been DNA profiled in 2010 (26) by short tandem repeat (STR) analysis and shown to be unique and identical to those reported in Schweppe et al., 2008 (34). Other cell lines were genetically fingerprinted by either single nucleotide polymorphism comparative genomic hybridization or polymorphic short tandem repeat and verified to be unique in 2008 (34).

All cell lines were cultured according to the manufacturer's recommendations.

Human thyroid samples

Formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) PTC and adjacent normal thyroid specimens were obtained from the Departments of Pathology at the Cochin Hospital in Paris and from the Ambroise-Paré Biobank, in Boulogne-Billancourt, France. Informed signed consent for genetic diagnosis, tumor analysis, and for access to the data collected was obtained from all the patients, and the study was approved by our Institutional Review Board. Total RNA was extracted from a 10-µm section of the FFPE tumor tissue using TRIzol Reagent (Life technologies) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was reverse transcribed to

generate cDNA using High-Capacity® cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Exon 14 and 15 of the *BRAF* gene was amplified with the following primers: 5'-GCA CAG GGC ATG GAT TAC TT-3' (forward) and 5'- GAT GAC TTC TGG TGC CAT CC-3' (reverse). The PCR reaction was set as follows: initial denaturation (2 min at 95°C) and then 35 cycles (denaturation for 30 s at 95°C, annealing for 30 s at 59°C, and extension for 30 s at 72°C).

HRAS, *NRAS*, and *KRAS* mutations at codons 12 and 13 in exon 1 and at codon 61 in exon 2 were amplified with their respective primers:

- *HRAS* forward: 5'- AGGAGACCCTGTAGGAGGAC - 3'
- *HRAS* reverse: 5'- ATGGCAAACACACACAGGAA - 3'
- *NRAS* forward: 5' - GGAGCTTGAGGTTCTTGCTG - 3'
- *NRAS* reverse: 5' - AAATACACAGAGGAAGCCTT - 3'
- *KRAS* forward: 5'- AGAGAGGCCTGCTGAAAATG - 3'
- *KRAS* reverse: 5'- AAAGAAAGCCCTCCCCAG - 3'

The PCR reaction was set as follows: initial denaturation (2 min at 95°C) and then 35 cycles (denaturation for 30 s at 95°C, annealing for 30 s at 58°C for *HRAS* and *NRAS* or 60°C for *KRAS*, and extension for 30 s at 72°C).

Direct sequencing of the purified fragments was then performed using the Genetic Sequencer ABI3100 Applied Biosystems (Foster City, CA) apparatus. Sequence comparisons were carried out using the Chromas Program.

RET/PTC rearrangement was detected from measurements of the tumor content in transcripts corresponding to the tyrosine kinase domain of RET. Transcripts were assayed by quantitative

PCR using the following primers: 5'-GAT CTC ACA GGG GAT GCA GT-3' and 5'-CTG GCT CCT CTT CAC GTA GG -3'. When the tumor transcript content was higher than that of the paired normal tissue and/or higher than the average transcript content of a control group of normal thyroid tissue samples, we concluded that the tumor contained the gene rearrangement. Cycling conditions were as follows: initial denaturation (10 min at 95°C) and then 45 cycles (denaturation for 10 s at 95°C, annealing for 5 s at 58°C, and extension for 7 s at 72°C).

Total RNA (1µg) extracted from PTC and adjacent normal thyroid specimens was reverse transcribed to generate cDNA using High-Capacity® cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCR was performed using LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN). The following primer pairs were used: DUSP5 (5'-GCC CGC GGG TCT ACT TCC TCA AA-3' and 5'-ATT TCA ACT GGG CCA CCC TGG-3'), DUSP6 (5'- TCC CTG AGG CCA TTT CTT TCA TAG ATG-3' and 5'-GCA GCT GAC CCA TGA AGT TGA AGT-3') and GAPDH (5'- GCC ACA TCG CTC AGA CAC CA -3' and 5'- TTC CCG TTC TCA GCC TTG AC -3'). Relative expression was calculated using the □□Ct method and the GAPDH as an internal control.

Reagents

The MEK inhibitor, UO126 (Cell Signaling Technology), the PI3K inhibitor, LY294002 (Euromedex) and the DUSP6 inhibitor, (E/Z)-BCI hydrochloride (Sigma-Aldrich) were used.

Western Blotting

Cells were lysed in a buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1mmol/L EDTA, NaCl 150 mM, NP40 1%) and protease inhibitor cocktail (Roche). Proteins were quantified using the Bradford protein assay and separated by SDS-polyacrilamide gel (10%), then transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

The following primary antibodies were used: anti-$BRAF^{V600E}$ (Spring Bioscience, #E19292), anti-pERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-7383), anti-pMEK 1/2 (Cell Signaling Technology, #9121), anti-total-ERK (Cell Signaling Technology, #9102), anti- total-MEK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., MEK-1(C18): sc-219), anti-phospho-AKT (Cell Signaling Technology, #9271), anti-total-AKT (Cell Signaling Technology, #9272), anti-DUSP5 (provided by Stephen Keyse (11)) anti-DUSP6 (Abnova, H00001848-M01) and anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-25778). The antigen-antibody complexes were visualized using secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) and anti-rabbit (Cell Signaling Technology, #7074) antibodies and enhanced chemiluminescence system.

RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR

Total RNA (500ng to 1µg) extracted from PCCL3 cells and human cell lines by RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.) was reverse transcribed to generate cDNA using High-Capacity® cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche). Relative expression of DUSP5 and DUSP6 was calculated using the ΔΔCt method and the cyclophilin or GAPDH as an internal control.

Caspase-3 Activity Measurement

The cells were seeded in triplicate in 6-well plates and treated with increasing concentrations of the the DUSP6 inhibitor, (E/Z)-BCI hydrochloride (Sigma-Aldrich). After 24 h, the cells were lysed in a buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1mmol/L EDTA, NaCl 150 mM, NP40 1%). Proteins were quantified using the Bradford protein assay. Caspase-glo 3/7 Assay (Promega): 25 µL of Caspase-glo reagent was added to 5 µg of proteins in 96-well plates and incubated for 1 h at room temperature. Caspase-3 activity was measured using

Luminescence and read with a Centro XS Luminescence Microplate Reader LB 960 from BERTHOLD TECHNOLOGIES.

NanoPro Assay

ERK phosphorylation was measured by the NanoPro 1000 System (Protein Simple) according to the manufacturer's instructions. In short, cells seeded in 6 well-plate, were treated with 3µM BCI for the indicated times or vehicle as a control. Cells were subsequently lysed in Bicine/CHAPS lysis buffer supplemented with 1x dimethyl sulfoxide inhibitor mix and 1x aqueous inhibitor mix. Lysates were centrifuged at 13 500 x g for 10 min at 4°C. Supernatant was loaded in small capillaries together with Ampholyte premix G2 and pI standard ladder 3. Isoelectric focusing of proteins was performed by applying 21000 microwatts for 40 min. After focusing, UV light was used to cross-link proteins to the inner capillary wall, and probed with a total anti-Erk antibody. Proteins were detected by chemiluminescence using appropriate horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies.

Small interfering RNA transfection

For small interfering RNA (siRNA) experiments, siRNA for human *DUSP5* (si*DUSP5* (1): 5'-GGCCTTCGATTACATCAAG- 3' and si*DUSP5* (2): 5'-GAGAAGATTGAGAGTGAGA- 3'), DUSP6 (si*DUSP6* (1): 5'-GAACTGTGGTGTCTTGGTA-3' si*DUSP6* (2): 5'- GGAATTCGGCATCAAGTAC- 3'), and a control siRNA (5'- GGCATAGATGTAGCTGTAA- 3') were purchased from Eurofins MWG Operon. siRNAs were transfected at the concentration of 100 nmol/L with Lipofectamine Plus (Invitrogen). After transfection, the suppression of targeted proteins was determined by reverse transcription quantitative PCR and Western blotting. Cell viability was determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) assay.

Proliferation assay

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma catalog no. M2128) was dissolved in PBS at 5 mg/ml and filtered. Cells were seeded in 96-well plates and incubated at 37°C.

Stock MTT (5mg/ml) solution (10 µ1 per 100µ1 medium) was added to all wells (10 wells per condition in each experiment) of an assay. After 4 hours of additional incubation, 100 µl of 0.04 N HCI in isopropanol was added to solubilize the cells. Plates were then read within 1 hour on an automatic enzyme linked immunosorbent assay plate reader (Tecan Austria GmbH). The absorption values at 570 nm were determined with corrected to the blanks. The optical density was calculated as the difference between the absorbance at a reference wavelength (690 nm) and that at a test wavelength (570nm) corrected to the blanks. Within each experiment, the mean and the standard error of the mean were calculated.

Statistical analysis

Wilcoxon and paired t tests were used to compare DUSP5 and 6 mRNA levels in human PTC and_normal adjacent thyroid tissues. Wilcoxon test was used to compare pMEK/t-MEK, pERK/t-ERK and pAKT/T-AKT levels in $BRAF^{V600E}$ human PTC cell lines *vs* the other cell lines.

Results

Higher MAPK pathway output in $BRAF^{V600E}$ mutated thyroid cell lines

Activation of the MAPK signaling pathway lead to a kinase cascade culminating downstream in the phosphorylation of ERK by MEK (35,36). We analyzed 11 human thyroid carcinoma cell lines representing the known MAPK pathway molecular alterations in thyroid cancers. Among them, 5 were $BRAF^{V600E}$ mutated cell lines, as confirmed by Western Blot with a sensitive and specific anti-$BRAF^{V600E}$ antibody (fig.1). All cell lines displayed detectable phospho-ERK levels, which although variable did not differ significantly ($p = 0.1$) between BRAF wild-type and $BRAF^{V600E}$ mutated cell lines (fig.1). In contrast, phospho-MEK/total-

MEK ratios (fig. 1) were markedly elevated in $BRAF^{V600E}$ mutated cell lines in comparison with others ($p = 0.007$), suggesting a higher MAPK output. Since phospho-ERK levels tend to be the same regardless of the genetic alteration, we assumed that the steady state of phospho-ERK levels would be maintained by high levels of feedback inhibitors that dephosphorylate ERK. In other words, elevated output of the MAPK signaling pathway should be associated with high levels of feedback inhibitors to allow tight regulation of phospho-ERK levels. Though, we studied DUSP5 and DUSP6, known to specifically dephosphorylate and inactivate ERK.

Induction of DUSP5 and DUSP6 expression in doxycycline inducible PCCL3 cell lines and differential MAPK pathway activation according to the genetic alterations

MAPK pathway regulation of these phosphatases was analyzed in three rat PCCL3 thyroid cell lines that conditionally express RET/PTC3, $HRAS^{V12}$ or $BRAF^{V600E}$ respectively, in a doxycycline-dependent manner. We first determined if the induction of oncogenic RET/PTC3, $HRAS^{V12}$ or $BRAF^{V600E}$ in PCCL3 cells was correlated with an increase in DUSP5 and DUSP6 mRNA levels. During a 72 hours kinetic of doxycycline treatment, we observed a marked increase of DUSP5 and DUSP6 mRNA compared to baseline (fig.2 A).

In parallel with doxycycline inducible expression of oncogenic RET/PTC3, $HRAS^{V12}$ or $BRAF^{V600E}$, phospho-ERK levels increased compared to baseline, albeit slightly and remain relatively constant during the 72 hours kinetic. These levels did not differ significantly between the 3 three cell lines (Fig. 2 A et B). However, levels of phospho-MEK was strongly elevated in PCCL3 cells with $BRAF^{V600E}$ and $HRAS^{V12}$ compared with those with RET/PTC3 rearrangement (Fig. 2 A et B). Once again, the levels of phospho-ERK tend to be the same regardless of the genetic alteration in contrast to phospho-MEK levels. These results suggest differential ERK signaling output according to the molecular alteration identified. The levels

of phospho-MEK seem to be better correlated with enhanced activation of ERK signaling than phospho-ERK levels.

Regulation of DUSP5 and DUSP6 mRNA by the MAPK pathway in PCCL3 cell lines

Using specific inhibitors, namely UO126 (MEK inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor), we tested the involvement of the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways respectively, in the up-regulation of DUSP5 and DUSP6 mRNA in the three PCCL3 cell lines. Once again, we observed after doxycycline inducible expression of oncogenic RET/PTC3, $HRAS^{V12}$ or $BRAF^{V600E}$, a marked and rapid increased of DUSP5 and DUSP6 mRNA in parallel to ERK activation (fig 2 C.). DUSP5 and DUSP6 induction was blocked by MEK inhibition, resulting in a decrease in ERK phosphorylation (fig 2 C). On the other hand, PI3K inhibition could not prevent the DUSPs up-regulation. Furthermore, after UO126 treatment, MEK phosphorylation was increased in RET/PTC3 and $HRAS^{V12}$ cell lines suggesting a relief of ERK feedback inhibition upstream of MEK (fig. 2 C). This was not observed in the $BRAF^{V600E}$ PCCL3 cell line. These data argue that $BRAF^{V600E}$ mutated cells are insensitive to relief of ERK dependent upstream negative feedback.

DUSP5 and DUSP6 are overexpressed in papillary thyroid carcinomas (PTCs), especially in *BRAF* mutated tumors

We showed in the three PCCL3 cell lines that the MAPK pathway drives the expression of DUSP5 and DUSP6, which are known to tightly regulate phospho-ERK, in the context of a negative feedback loop. We hypothesized that DUSP5 and DUSP6 mRNA levels might be a marker for MAPK pathway activation, with differences according to the genetic alteration present in the carcinoma. To test this hypothesis, a total of 39 human PTCs, characterized for known MAPK pathway genetic alterations, and their normal adjacent thyroid tissue, were studied by real time quantitative PCR (qPCR) to quantify DUSP expression. Twenty PTCs were *BRAF* mutated, four were *RAS* mutated, and five had a *RET/PTC* rearrangement. Two

specimens were found to have both *RET/PTC* rearrangement and $BRAF^{V600E}$ mutation, as already described (29). Ten PTCs had no identified genetic alteration. DUSPs mRNA levels were found overexpressed in PTCs compared to normal adjacent thyroid tissue, with an average ratio of 1.43 for DUSP5 (p= 0.001) and 2.26 for DUSP6 (p= 0.001). DUSP5 and DUSP6 mRNA are statistically overexpressed (p = 0.007 and 0.01 respectively) in *BRAF* mutated tumors in comparison with all tumors harboring either *RET/PTC* rearrangement or *RAS* mutation or none of these genetic alterations (fig. 3).

Silencing of DUSP5 and/or DUSP6 by siRNA does not affect proliferation of human $BRAF^{V600E}$ papillary or anaplastic thyroid carcinoma cell lines.

DUSP6 as well as DUSP5 act as natural terminators of MAPK signal transduction and therefore, a tumor suppressive role could be hypothesized. Nevertheless, there are conflicting data in the literature regarding the role of such phosphatases on tumor cell proliferation. Some have report a positive role on cell survival (37,38). On the opposite, down-regulation of either DUSP5 or DUSP6 have been found by others to favor proliferation of lung cancer cells (39) or ovarian cancer cells (16). We investigated the proliferative effect of DUSP6 and DUSP5 silencing in two $BRAF^{V600E}$ mutated human thyroid carcinoma cell lines (BCPAP and 8505c). Each siRNA effectively suppressed the targeted gene at the mRNA and protein level, but did not result in significant inhibition of cell growth (fig.4A and 4B). Interestingly, inhibition of DUSP5 in the 8505c cell line was associated with a compensatory increase in DUSP6 mRNA and protein levels (Fig.4A, left panel). This may explains the virtual lack of rise in the phospho-ERK levels while DUSP5 is inhibited (Fig.4A). Inhibition of DUSP6 in these cell lines is not combined with a significant modification of DUSP5 mRNA and/or protein levels (Fig.4A, right panel). Consequently phospho-ERK levels slightly increase while DUSP6 is inhibited (Fig.4A, left panel). In the BCPAP cell line, inhibition of one DUSP was accompanied with a trend to an increase of the other at the mRNA level (Fig.4B). To test

further a functional redundancy among this large phosphatase family, we decided to silence both DUSPs at the same time in the 8505c cell line. Simultaneous DUSP5 and DUSP6 silencing was confirmed at the mRNA and protein levels (Fig.5). Despite the lack of these two phosphatases the levels of phospho-ERK have not increased, again suggesting a putative compensation by other member of the DUSP family. The apparent steady state of ERK phosphorylation may explain why no change in the proliferation was seen after this double gene silencing.

A pharmacological DUSP6 inhibitor decreases the proliferation of two BRAF^{V600E} mutated thyroid carcinoma cell lines.

To confirm these previous results, i.e. the lack of proliferation effect of DUSPs silencing in thyroid cell lines, we decided to test a DUSP6 small-molecule inhibitor, (E/Z)-BCI hydrochloride (BCI), that has recently been identified (40). *In vitro* studies have shown that BCI specifically inhibits DUSP6 (and DUSP1) but not DUSP5, through inhibition of DUSP6 catalytic activation by ERK2 substrate binding. Cell viability assays were carried out in the same BRAF^{V600E} mutated human thyroid cancer cell lines used with the siRNA strategy. As shown in Fig.6A, BCI had a negative effect on proliferation in both cell lines at 2 and 3 µM, already at one day of treatment. At 1 µM, BCI induces a significant decrease in 8505c cell proliferation after one day of treatment but not in BCPAP cells (Fig. 6A). The reduction of cell viability was supported by activation of caspase 3 (Fig. 6A).

As the results were opposite to the siRNA DUSP6 silencing, and to see if the pharmacological inhibitor anti-proliferative effect was correlated with phospho-ERK variations, we decided to quantify precisely ERK activation with the NanoPro Assay. ERK is known to be active only when both tyrosine and threonine residues are phosphorylated (41). This assay allowed for precise and specific quantification of double-phosphorylated active form of ERK. We could observed an enhanced double phosphorylation of ERK upon DUSP6 inhibitor treatment at

low concentration, as early as 10 minutes of treatment and which further increased after 60 minutes (Fig. 6B). This increase in phosphorylated ERK with the BCI was observed in both cell lines by Western blotting (data not shown).

Discussion

Constitutive activation of the RAS-RAF-MEK-ERK pathway is thought to be mandatory to allow the growth of a PTC. $BRAF^{V600E}$ mutation is identified in up to 50% of PTC and is associated with aggressive feature such as extrathyroidal extension, lymph node metastasis, advanced tumor stages and anaplastic component leading to disease recurrence, and even patient mortality in case of resistance to treatment. The molecular mechanisms underlying this aggressiveness are incompletely understood. It can be hypothesized that the MAPK pathway is more activated in $BRAF^{V600E}$ thyroid tumors in comparison with PTC harboring other molecular alterations. In our work higher levels of phospho-MEK in human $BRAF^{V600E}$ thyroid carcinoma cell lines in comparison with the other cell lines suggest that the MAPK pathway is differentially activated according to the genetic alteration identified. *In vitro* kinase activity determined by measuring direct MEK phosphorylation revealed that $BRAF^{V600E}$ was about 5 fold more active than oncogenic RAS (RAS^{G12V}) and 500 fold more active than BRAF wild type (42). The increasing phospho-MEK levels in $BRAF^{V600E}$ PCCL3 cells during the kinetic suggest that the pathway is insensitive to upstream feedback inhibition. This hypothesis is supported by the observation that MEK kinase inhibition does not further induce phospho-MEK in $BRAF^{V600E}$ PCCL3 cells (fig. 3). On the opposite, phospho-MEK levels were low in *RET/PTC3* cells reflecting multiple negative feedback mechanisms upstream of MEK (Fig. 2). Consistent with this assertion, phospho-MEK levels were further induced after treatment with the MEK kinase inhibitor UO126 in these cells (fig 3). This induction was also observed in $HRAS^{V12}$ PCCL3 cells demonstrating sensitivity to upstream feedback inhibition, despite basal elevated levels of phospho-MEK (fig 3). Taken

together, our results suggest that MEK phosphorylation but not ERK phosphorylation should be a marker of elevated output of RAF-MEK-ERK pathway as already suggested in melanoma (35). Despite this apparent similarity between the two tumor models, lineage-specific differences in effect of MAPK inhibition warrant specific studies for each model (43,44). As an example, human thyroid and colorectal cancer cells were relatively refractory to pharmacologic inhibition of $BRAF^{V600E}$ comparatively to melanoma cells (43). Mechanisms that underlie resistance to inhibitors of the ERK/MAPK pathway are different according to the tumor model (43). *BRAF* mutation increases the aggressiveness of PTC but not in melanomas (45) where it is also frequently identified (about 80% of cases), underlying once again lineage specificity.

In human *BRAF* mutated PTCs, varying levels of phospho-MEK determined by immunochemistry are observed (46) and to the contrary of what is observed in human thyroid cancer cell lines, are not different with those observed in *BRAF* non mutated PTCs (6). Tissue sample heterogeneity of human PTCs in comparison with cell lines, or a lack of sensitivity of the technique used in carcinomas to quantify phospho-MEK levels could explain the difference.

Various hypotheses have been reported to explain *BRAF* mutated PTCs aggressiveness, which include down-regulation of important thyroid-specific genes that allow the thyrocyte to concentrate the iodine, such as *NIS* (sodium/iodide symporter) and render radioiodine therapy ineffective. This underexpression was markedly accentuated in *BRAF* mutated PTC in comparison with *BRAF* wild type PTC (47). Oncogenic BRAF renders thyroid cells susceptible to TGFβ-induced epithelial–mesenchymal transition through a MAPK activation dependent process, which ultimately enhances their invasive and metastatic potential and contribute to progression from differentiated to undifferentiated cancers (48). Metastatic potential could also be explained by induction of matrix metalloproteinase demonstrated in

$BRAF^{V600E}$ PCCL3 cells (49). $BRAF^{V600E}$ expression confers thyroid cells with genomic instability which may facilitate the acquisition of secondary genetic events and account for its aggressive properties (20).

Increased MAPK pathway activation leads to an increased feedback inhibition at multiple levels of the kinase cascade to prevent overactivation of signaling output. As phospho-ERK levels were relatively constant from one human or rat thyroid cell lines to another, we sought to study DUSP5 and DUSP6 which act respectively in the nucleus and the cytoplasm to dephosphorylate ERK, to maintain its steady state levels.

We have shown that DUSP5 and DUSP6 expression is regulated by the MEK-ERK pathway but not the PI3K pathway in PCCL3 cells. Similarly, doxycycline inducible expression of oncogenic BRAF in mouse thyroid follicular cells reversibly activates DUSP5 transcription (50). Plasmid-driven DUSP6 overexpression in transiently transfected PCCL3 cells, showing attenuation of ERK activation (data not shown), demonstrated that these phosphatases tightly regulate phospho-ERK levels in a negative feedback loop. This model predicts that DUSP5 and DUSP6 expression should be marker of MAPK pathway activation. We then looked for a differential expression level of these phosphatases in human PTC according to the genetic alteration identified that may reflect differential MAPK pathway activation. DUSP5 and DUSP6 were found to be overexpressed at mRNA levels in PTC compared to normal adjacent thyroid tissue showing constitutive activation of MAPK pathway. We found that $BRAF^{V600E}$ mutated PTCs express high levels of feedback inhibitors, i.e. DUSP5 and DUSP6 at the mRNA levels, suggesting higher MAPK pathway activation in comparison with other tumors. DUSPs overexpression in PTCs has been shown by transcriptional expression profile studies (51). Absence of mutation of DUSP5 and DUSP6 reported in thyroid cancers (The Cancer Genome Atlas (TCGA) Data Portal) as well as in melanomas (52,53) support the hypothesis that these phosphatases have not tumor suppressor role. It is worth noting that among the

$BRAF^{V600E}$ mutated PTCs different levels of DUSP5 and DUSP6 mRNA were observed. It could reflect a difference in feedback regulation mechanisms, preserved in some tumors and dysfunctional in others, as already suggested by Dultz and coll. (46). DUSP6 protein levels determined by immunohistochemistry are increased in PTC compared with those in benign thyroid neoplasm (38). Nevertheless, those levels were not correlated with $BRAF^{V600E}$ mutation status (38). Lack of correlation between DUSP6 mRNA and protein levels have already been described (18,54) and could be explained by DUSP6 destabilization as a direct consequence of ERK activation and targeting of the phosphatase to the proteasome (13).

DUSP5 and DUSP6 expression are markers of elevated output of the MAPK pathway. It could be hypothesized that both phosphatases play crucial role in tumorigenesis through the fine-tuning of magnitude and duration of ERK activation (55,56). RNA interference approach was adopted in our work to identify the role of these phosphatases in tumorigenesis and revealed no effect on cell proliferation. We reported here for the first time the consequences of DUSP5 inactivation in human thyroid cancer cells. So far, the impact of DUSP5 inactivation in tumorigenesis has only been studied in human gastric and uterine cervix cancer cells and was responsible respectively for enhanced cell proliferation or massive apoptosis (37,57). Our results concerning DUSP6 knock-down were in contradiction with previous report in $BRAF^{V600E}$ and RET/PTC human thyroid cell lines (38,58). However, the effect of both phosphatases on proliferation appears to be cell-type dependent (59). Impact on proliferation of DUSP5 or DUSP6 silencing has never been studied in 8505c and BCPAP cell lines. DUSP5 and to a lesser extent DUSP6 were identified to led to prompt (<72 hours) and massive cell death when suppressed in HeLa cells, in a large-scale RNA interference study performed to identify kinases and phosphatases that regulated cell survival and apoptosis (37). Apoptosis was mediated through caspase activation (37). On the opposite, DUSP6 siRNA does not cause apoptosis in human thyroid TPC1 cells harboring *RET/PTC1* rearrangement

but is still responsible for a decrease in proliferation. Similarly others found that DUSP6 depletion attenuated Acute Myeloid Leukemia cells proliferation (60), while some demonstrated a significantly increased of ovarian or lung cancer cells proliferation rate (16,39). Interestingly, Degl'Innocenti et al. (58) reported a reduction in the invasive behavior of the BCPAP cell lines when DUSP6 is silenced. It could be hypothesized that in our $BRAF^{V600E}$ mutated ATC cell line (8505c) expression of other ERK effectors may contribute to transformation and proliferation (44) and as a consequence render cells insensitive to DUSP5 or DUSP6 silencing. Compensatory changes in expression of DUSPs when a specific one is inactivated may explain the lack of clear induction in phospho-ERK levels, as already observed with DUSP1 and DUSP2 at the mRNA level (61). In our work DUSP5 inactivation is combined with a clear compensation by DUSP6 at the mRNA and protein level which may explain the absence of consequence on proliferation. DUSP1 deficient mice are in apparent health and with unaltered kinetics of ERK activation indicating that the lack of activity of DUSP1 can be compensated by other phosphatases *in vivo* (62).

DUSPs as important modulators of MAPK function appear to be rational targets for novel therapeutics. A small-molecule inhibitor of DUSP6 has recently been developed (40) but never been tested in *in vitro* cancer model. DUSP6 inhibition seems not to account for its anti-proliferative effect, as specific silencing of DUSP6 with siRNA has no impact on proliferation of $BRAF^{V600E}$ human thyroid cancer cell lines. It could be hypothesized that the anti-proliferative action is the consequence of off-target effect on DUSP1 (40) or unknown targets resulting in constitutive overactivation of the MAPK pathway. Overactivation of the MAPK pathway has been implicated in the initiation of apoptosis in non-tumor model and in a significant slower growth rate in human osteosarcoma cells (63).

In conclusion we have demonstrated that phospho-MEK, DUSP5 and DUSP6 mRNA levels are markers of activation of the MAPK signaling pathway in PTCs. Elevated output of the

MAPK pathway in $BRAF^{V600E}$ thyroid carcinoma provides an explanation for their poorer prognosis compared to others. DUSP5 and DUSP6 have no tumor suppressor properties in our model. The lack of effect in proliferation after specific inhibition of DUSP5 or DUSP6 or both DUSPs suggests redundancy and functional compensation in the large family of DUSP.

Acknowledgments

We thank Olivia Barreau, Cyril Garcia, Michèle Cahuzac and Pierre-Alexandre Just for their valuable help and advice.

We thank Philippe Chaffey and 3P5 proteomic facility, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris.

Grant Support

This work was supported by the American Thyroid Association [ATA R06059KK], a predoctoral fellowship from the French Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, the French National Academy of Medicine and a predoctoral and doctoral fellowship from the Ile de France Regional Health Agency.

References

1. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. J Endocrinol 2004;183(2):249-56.
2. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocr Rev 2007;28(7):742-62.
3. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. Cancer 2007;110(1):38-46.
4. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid

cancer. JAMA : the journal of the American Medical Association 2013;309(14):1493-501.

5. Zuo H, Nakamura Y, Yasuoka H, Zhang P, Nakamura M, Mori I, et al. Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma. Pathology international 2007;57(1):12-20.

6. Mitsiades CS, Negri J, McMullan C, McMillin DW, Sozopoulos E, Fanourakis G, et al. Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. Molecular cancer therapeutics 2007;6(3):1070-8.

7. Zeliadt NA, Mauro LJ, Wattenberg EV. Reciprocal regulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and mitogen activated protein kinase phosphatase-3. Toxicol Appl Pharmacol 2008;232(3):408-17.

8. Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA, Keyse SM. Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. Cell Signal 2009;21(12):1794-805.

9. Bellou S, Hink MA, Bagli E, Panopoulou E, Bastiaens PI, Murphy C, et al. VEGF autoregulates its proliferative and migratory ERK1/2 and p38 cascades by enhancing the expression of DUSP1 and DUSP5 phosphatases in endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 2009;297(6):C1477-89.

10. Furukawa T, Tanji E, Xu S, Horii A. Feedback regulation of DUSP6 transcription responding to MAPK1 via ETS2 in human cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;377(1):317-20.

11. Mandl M, Slack DN, Keyse SM. Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. Mol Cell Biol 2005;25(5):1830-45.

12. Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. J Biol Chem 2004;279(40):41882-91.

13. Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, et al. 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 2005;25(2):854-64.

14. Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, Matsuno S, Horii A. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. Am J Pathol 2003;162(6):1807-15.

15. Furukawa T, Fujisaki R, Yoshida Y, Kanai N, Sunamura M, Abe T, et al. Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. Mod Pathol 2005;18(8):1034-42.

16. Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao KM, Furukawa T, Chan KK, et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. Carcinogenesis 2008;29(9):1742-50.

17. Griffith OL, Melck A, Jones SJ, Wiseman SM. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. J Clin Oncol 2006;24(31):5043-51.

18. Nunes-Xavier CE, Tarrega C, Cejudo-Marin R, Frijhoff J, Sandin A, Ostman A, et al. Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation

response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester. J Biol Chem 2010;285(34):26417-30.

19. Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI, et al. Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells. Mol Endocrinol 2000;14(11):1725-38.

20. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. Cancer Res 2005;65(6):2465-73.

21. Wang J, Knauf JA, Basu S, Puxeddu E, Kuroda H, Santoro M, et al. Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. Mol Endocrinol 2003;17(7):1425-36.

22. Heldin NE, Cvejic D, Smeds S, Westermark B. Coexpression of functionally active receptors for thyrotropin and platelet-derived growth factor in human thyroid carcinoma cells. Endocrinology 1991;129(4):2187-93.

23. Yano Y, Kamma H, Matsumoto H, Fujiwara M, Bando H, Hara H, et al. Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylcyclase activator. Oncol Rep 2007;18(2):441-5.

24. Tanaka J, Ogura T, Sato H, Hatano M. Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model. Virology 1987;161(1):62-72.

25. Chung SH, Onoda N, Ishikawa T, Ogisawa K, Takenaka C, Yano Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation induces cell cycle arrest via the p53-independent pathway in human anaplastic thyroid cancer cells. Jpn J Cancer Res 2002;93(12):1358-65.

26. Salerno P, De Falco V, Tamburrino A, Nappi TC, Vecchio G, Schweppe RE, et al. Cytostatic activity of adenosine triphosphate-competitive kinase inhibitors in BRAF mutant thyroid carcinoma cells. J Clin Endocrinol Metab 2010;95(1):450-5.

27. Gioanni J, Zanghellini E, Mazeau C, Zhang D, Courdi A, Farges M, et al. [Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland]. Bull Cancer 1991;78(11):1053-62.

28. Gustavsson B, Hermansson A, Andersson AC, Grimelius L, Bergh J, Westermark B, et al. Decreased growth rate and tumour formation of human anaplastic thyroid carcinoma cells transfected with a human thyrotropin receptor cDNA in NMRI nude mice treated with propylthiouracil. Mol Cell Endocrinol 1996;121(2):143-51.

29. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. Cancer Res 2003;63(15):4561-7.

30. Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T, Moriya T, Kunisue H, Uno M, et al. All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1. J Clin Endocrinol Metab 2000;85(8):2889-96.

31. Lee JJ, Foukakis T, Hashemi J, Grimelius L, Heldin NE, Wallin G, et al. Molecular cytogenetic profiles of novel and established human anaplastic thyroid carcinoma models. Thyroid 2007;17(4):289-301.

32. Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM, Paulin C. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. Cancer 1994;73(8):2206-12.

33. Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, Hayashi T, Mizuno T, Tsuyama N, et al. In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. Cancer Res 1993;53(13):2940-3.

34. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenthi U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(11):4331-41.

35. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(11):4519-24.

36. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res 1998;74:49-139.

37. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. Nat Cell Biol 2005;7(6):591-600.

38. Lee JU, Huang S, Lee MH, Lee SE, Ryu MJ, Kim SJ, et al. Dual specificity phosphatase 6 as a predictor of invasiveness in papillary thyroid cancer. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 2012;167(1):93-101.

39. Zhang Z, Kobayashi S, Borczuk AC, Leidner RS, Laframboise T, Levine AD, et al. Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. Carcinogenesis 2010;31(4):577-86.

40. Molina G, Vogt A, Bakan A, Dai W, Queiroz de Oliveira P, Znosko W, et al. Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. Nat Chem Biol 2009;5(9):680-7.

41. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. Nature 1990;343(6259):651-3.

42. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell 2004;116(6):855-67.

43. Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, Knauf JA, Viale A, Sherman EJ, et al. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. Cancer discovery 2013;3(5):520-33.

44. Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. Molecular cancer research : MCR 2008;6(5):751-9.

45. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol 2011;29(10):1239-46.

46. Dultz LA, Dhar S, Ogilvie JB, Heller KS, Bar-Sagi D, Patel KN. Clinical and therapeutic implications of Sprouty2 feedback dysregulation in BRAF V600E-mutation-positive papillary thyroid cancer. Surgery 2013;154(6):1239-44; discussion 44-5.

47. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. J Clin Endocrinol Metab 2007;92(7):2840-3.

48. Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, et al. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. Oncogene 2011;30(28):3153-62.

49. Mesa C, Jr., Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. Cancer Res 2006;66(13):6521-9.

50. Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao XH, West BL, et al. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. The Journal of clinical investigation 2011;121(12):4700-11.

51. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. Oncogene 2005;24(44):6646-56.

52. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nature genetics 2012;44(9):1006-14.

53. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. Cell 2012;150(2):251-63.

54. Bermudez O, Jouandin P, Rottier J, Bourcier C, Pages G, Gimond C. Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. Journal of cellular physiology 2011;226(1):276-84.

55. Bluthgen N, Legewie S, Kielbasa SM, Schramme A, Tchernitsa O, Keil J, et al. A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts. The FEBS journal 2009;276(4):1024-35.

56. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Binder B, Geest CR, de Vaate AJ, Lankelma J, et al. Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. The FEBS journal 2005;272(1):244-58.

57. Shin SH, Park SY, Kang GH. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 in gastric cancer by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis. Am J Pathol 2013;182(4):1275-85.

58. Degl'Innocenti D, Romeo P, Tarantino E, Sensi M, Cassinelli G, Catalano V, et al. DUSP6/MKP3 is overexpressed in papillary and poorly differentiated thyroid carcinoma and contributes to neoplastic properties of thyroid cancer cells. Endocrine-related cancer 2013;20(1):23-37.

59. Nunes-Xavier C, Roma-Mateo C, Rios P, Tarrega C, Cejudo-Marin R, Tabernero L, et al. Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. Anti-cancer agents in medicinal chemistry 2011;11(1):109-32.

60. Arora D, Kothe S, van den Eijnden M, Hooft van Huijsduijnen R, Heidel F, Fischer T, et al. Expression of protein-tyrosine phosphatases in Acute Myeloid Leukemia cells: FLT3 ITD sustains high levels of DUSP6 expression. Cell communication and signaling : CCS 2012;10(1):19.

61. Caunt CJ, Armstrong SP, Rivers CA, Norman MR, McArdle CA. Spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases. J Biol Chem 2008;283(39):26612-23.

62. Dorfman K, Carrasco D, Gruda M, Ryan C, Lira SA, Bravo R. Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. Oncogene 1996;13(5):925-31.

63. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. The FEBS journal 2010;277(1):2-21.

Figure legends

Figure 1. Higher phosphorylated MEK levels in human thyroid cell lines harboring the BRAF^{V600E} mutation. Eleven human thyroid cancer-derived cell lines were studied for MEK and ERK activation: two cell lines without known MAPK pathway genetic alteration, one with a *RET/PTC* rearrangement, two with a RAS activating point mutation, and five with the BRAF^{V600E} mutation. Protein expression levels were assayed by immunoblot for the BRAF^{V600E} mutation, phospho-MEK (p-MEK), total-MEK (t-MEK), phospho-ERK (p-ERK), total ERK (t-ERK) and GAPDH. Graphs represent subsequent quantification of p-MEK/t-MEK and p-ERK/t-ERK ratios. The black star on the upper graph indicates that the quantification of p-MEK was impossible in the Hth74 cell line due to low t-MEK expression.

Figure 2. Induction of DUSP5 and DUSP6 expression by the MAPK pathway in rat thyroid PCCL3 cell lines harboring inducible oncogenes. A, Real-time Reverse-Transcription qPCR showing the expression levels of DUSP5 and DUSP6 mRNA in three PCCL3 cell lines harboring either RET/PTC1 or HRas^{V12} or BRAF^{V600E}. Oncogene expression was induced by doxycycline treatment (1µg/ml) for 72 hours. Results are

normalized to cyclophilin mRNA levels. Basal DUSP5 and DUSP6 mRNA levels were arbitrary set at 1. Lysates of the three PCCL3 cell lines were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. B, Graphs represent subsequent quantification of pMEK and pERK levels. C. The three PCCL3 cell lines were treated for the indicated times with doxycycline alone or in combination with the presence of the MEK inhibitor UO126 (20µM) and/or the PI3K inhibitor LY294002 (10µM). DUSP5 and DUSP6 mRNA were then analyzed using real time Reverse-Transcription qPCR and normalized to cyclophilin mRNA levels. DUSP5 and DUSP6 mRNA levels before doxycycline treatment were arbitrary set at 1. Lysates of the three PCCL3 cell lines were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies.

Figure 3. DUSP5 and DUSP6 are overexpressed in papillary thyroid carcinomas (PTCs), especially in *BRAF*^{V600E} mutated tumors. Real-time reverse transcription qPCR showing the expression levels of DUSP5 and DUSP6 in 39 human PTCs. Each dot represents the ratio between DUSP5 or DUSP6 mRNA levels in tumoral to normal adjacent thyroid tissue (mRNA expression normalized for GAPDH mRNA levels). Empty square are patients harboring both *RET/PTC* rearrangement and *BRAF* mutation.

Figure 4. Silencing of DUSP5 or DUSP6 by small interfering RNA (si RNA) does not affect proliferation of human BRAF^{V600E} BCPAP PTC or 8505c ATC cell lines. Cells were transfected with the indicated siRNA. Cell viability was determined using the MTT assay the day of transection and for the following 3 days. Results are representative of at least three independent experiments. Gene knockdown was confirmed by reverse-transcription qPCR and Western blotting. Cells transfected with control siRNA at each time point were used as control. A, 8505c cells were also subjected to Western blotting using the indicated antibodies. B, BCPAP cells.

Figure 5. Silencing of DUSP5 and DUSP6 by small interfering RNA (siRNA) does not affect proliferation of human BRAF^{V600E} 8505c ATC cell lines. Cells were transfected with the indicated siRNA. Cell viability was determined using the MTT assay the day of transection and for the following 3 days. Results are representative of at least three independent experiments. Gene knockdown was confirmed by reverse-transcription qPCR and Western blotting. Cells transfected with control siRNA at each time point were used as control.

Figure 6. Pharmacological inhibition of DUSP6 induced a concentration dependent decrease in proliferation of human BRAF^{V600E} ATC and PTC cells mediated through apoptosis. A, Human BCPAP papillary thyroid carcinoma or 8505c anaplastic carcinoma, BRAF^{V600E} mutated cell lines were treated for 3 days with 1, 2 or 3 µM of DUSP6 inhibitor. Cells cultured with DMSO at each time point were used as control. Cell viability was determined with the MTT assay. In parallel, caspase 3 activity was determined by enzymatic assay at first day of treatment. B, The NanoPro assay was used to quantitatively measure ERK phosphorylation in 8505c cells treated without or with 3µM BCI for the indicated times. The graph represents the ratio between the area under the curves of double phosphorylated form of ERK1/2 and total ERK.

Figures

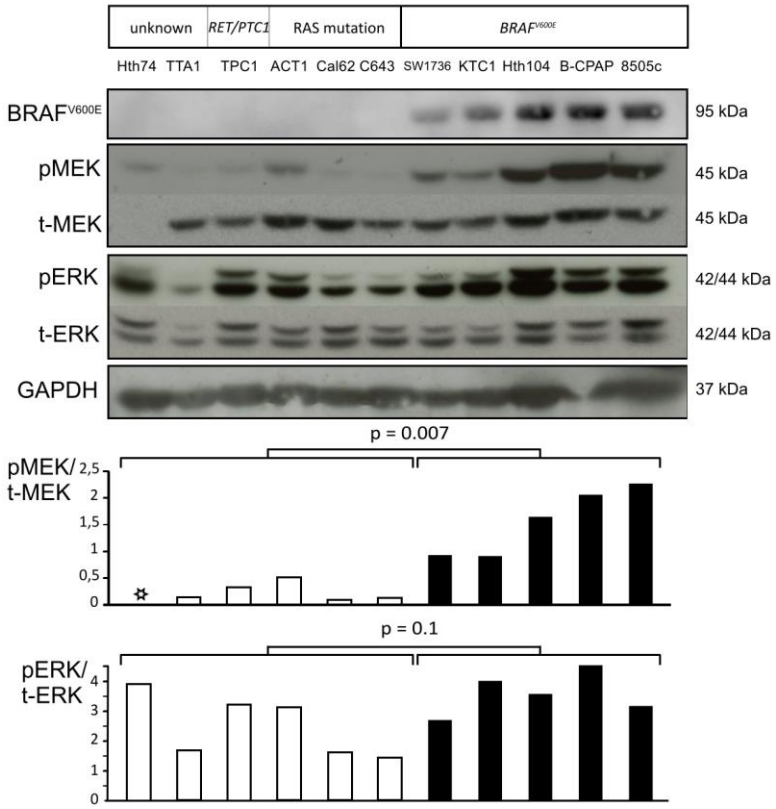
unknown
RET/PTC1
RAS mutation
BRAFV600E
Hth74 TTA1 TPC1 ACT1 Cal62 C643 SW1736 KTC1 Hth104 B-CPAP 8505c
BRAFV600E
pMEK
t-MEK
pERK
t-ERK
GAPDH
95 kDa
45 kDa
45 kDa
42/44 kDa
42/44 kDa
37 kDa
p = 0.007
pMEK/ t-MEK
2,5
2
1,5
1
0,5
0
p = 0.1
pERK/ t-ERK
4
3
2
1
0

Figure 1

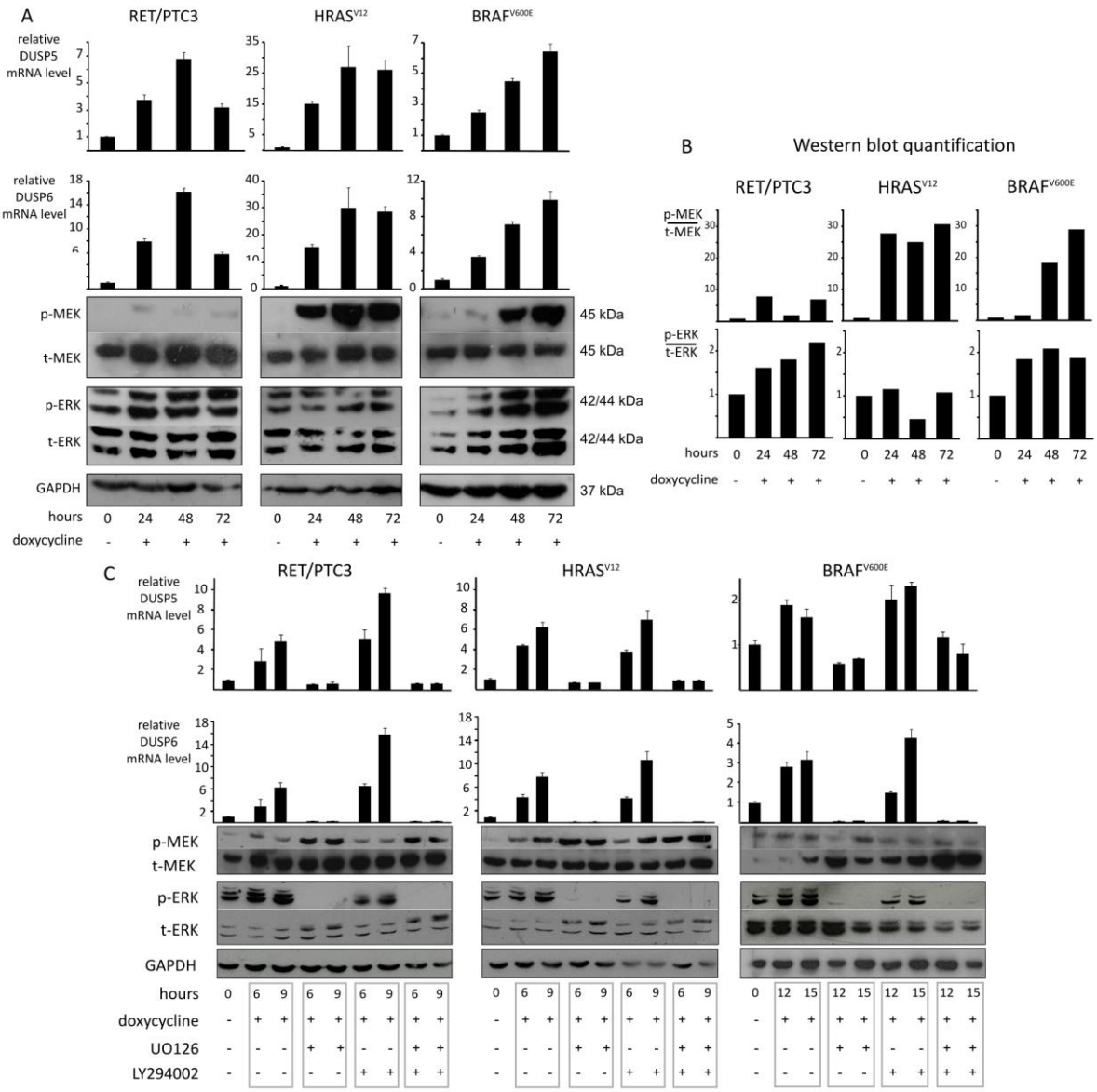
A
RET/PTC3
HRAS V12
BRAF V600E
relative DUSP5 mRNA level
relative DUSP6 mRNA level
p-MEK
t-MEK
p-ERK
t-ERK
GAPDH
45 kDa
45 kDa
42/44 kDa
42/44 kDa
37 kDa
hours 0 24 48 72
doxycycline
B
Western blot quantification
p-MEK / t-MEK
p-ERK / t-ERK
C
UO126
LY294002

Figure 2

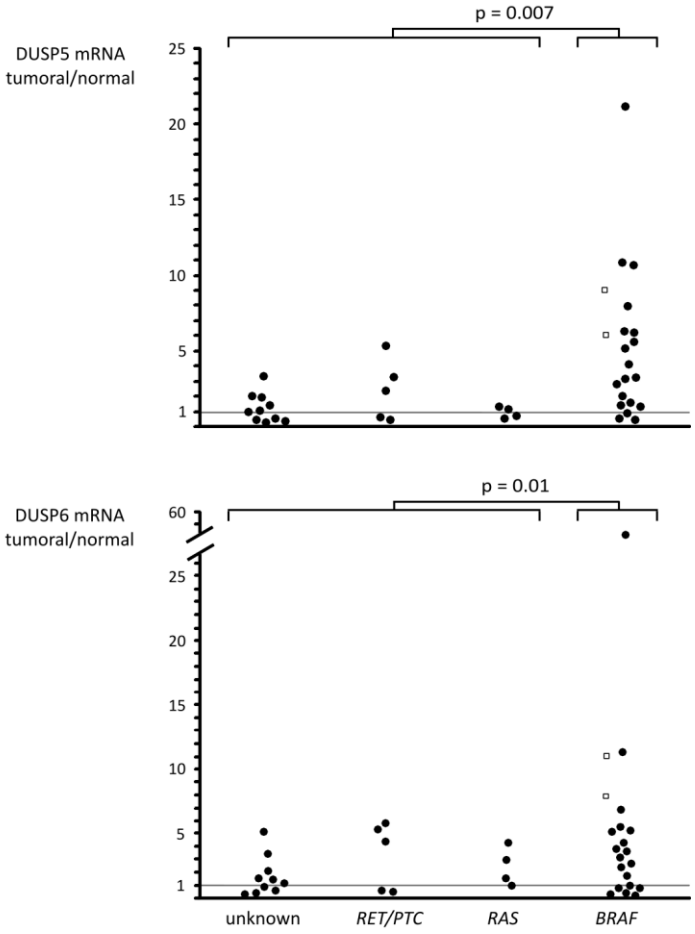
p = 0.007
DUSP5 mRNA
tumoral/normal
25
20
15
10
5
1
p = 0.01
DUSP6 mRNA
tumoral/normal
60
25
20
15
10
5
1
unknown
RET/PTC
RAS
BRAF

Figure 3

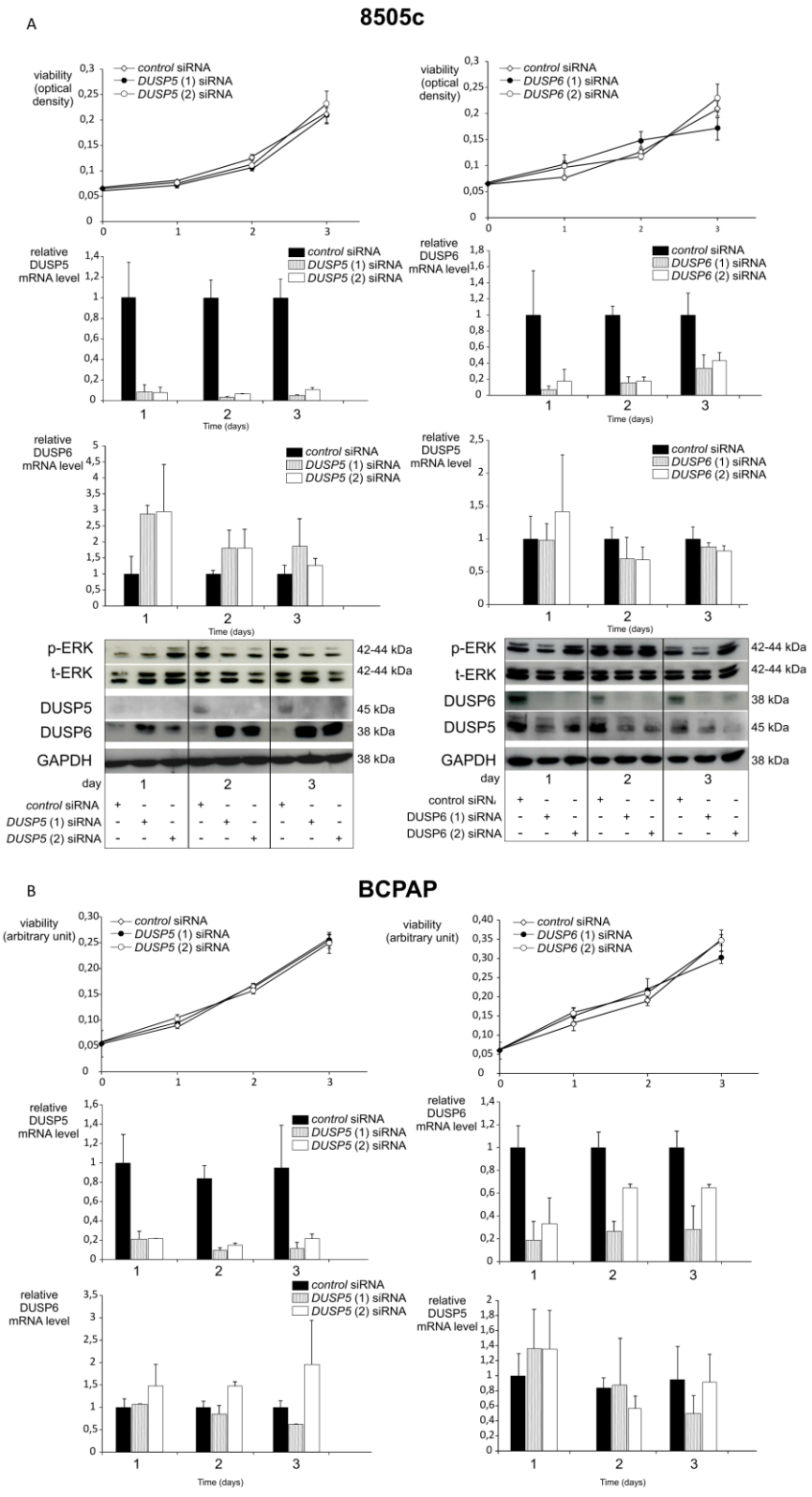
A
8505c
viability (optical density)
control siRNA
DUSP5 (1) siRNA
DUSP5 (2) siRNA
DUSP6 (1) siRNA
DUSP6 (2) siRNA
relative DUSP5 mRNA level
relative DUSP6 mRNA level
Time (days)
p-ERK
t-ERK
DUSP5
DUSP6
GAPDH
42-44 kDa
45 kDa
38 kDa
day
B
BCPAP
viability (arbitrary unit)

Figure 4

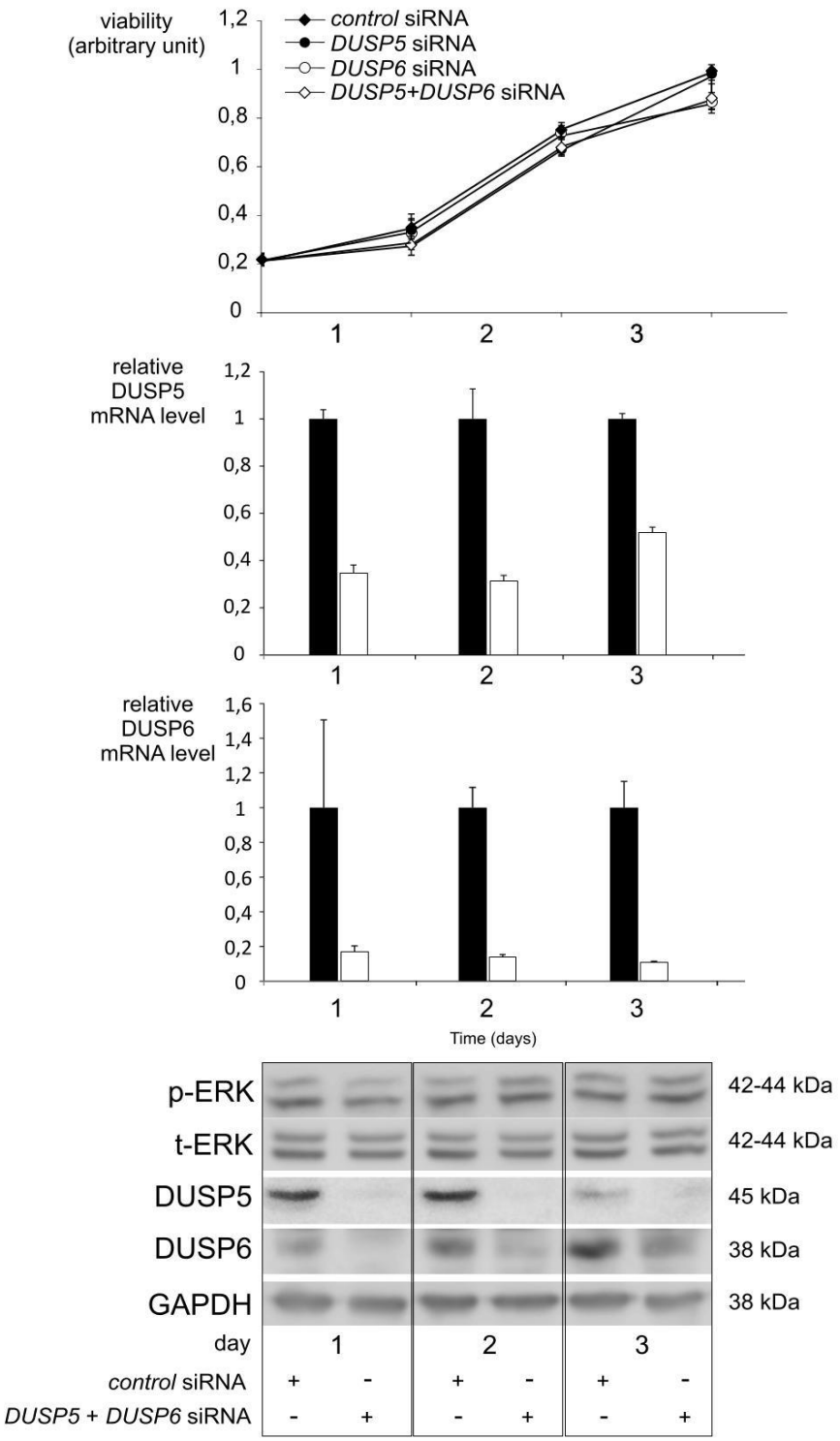
viability
(arbitrary unit)
control siRNA
DUSP5 siRNA
DUSP6 siRNA
DUSP5+DUSP6 siRNA
relative
DUSP5
mRNA level
relative
DUSP6
mRNA level
Time (days)
p-ERK
t-ERK
DUSP5
DUSP6
GAPDH
42-44 kDa
42-44 kDa
45 kDa
38 kDa
38 kDa
day
control siRNA
DUSP5 + DUSP6 siRNA

Figure 5

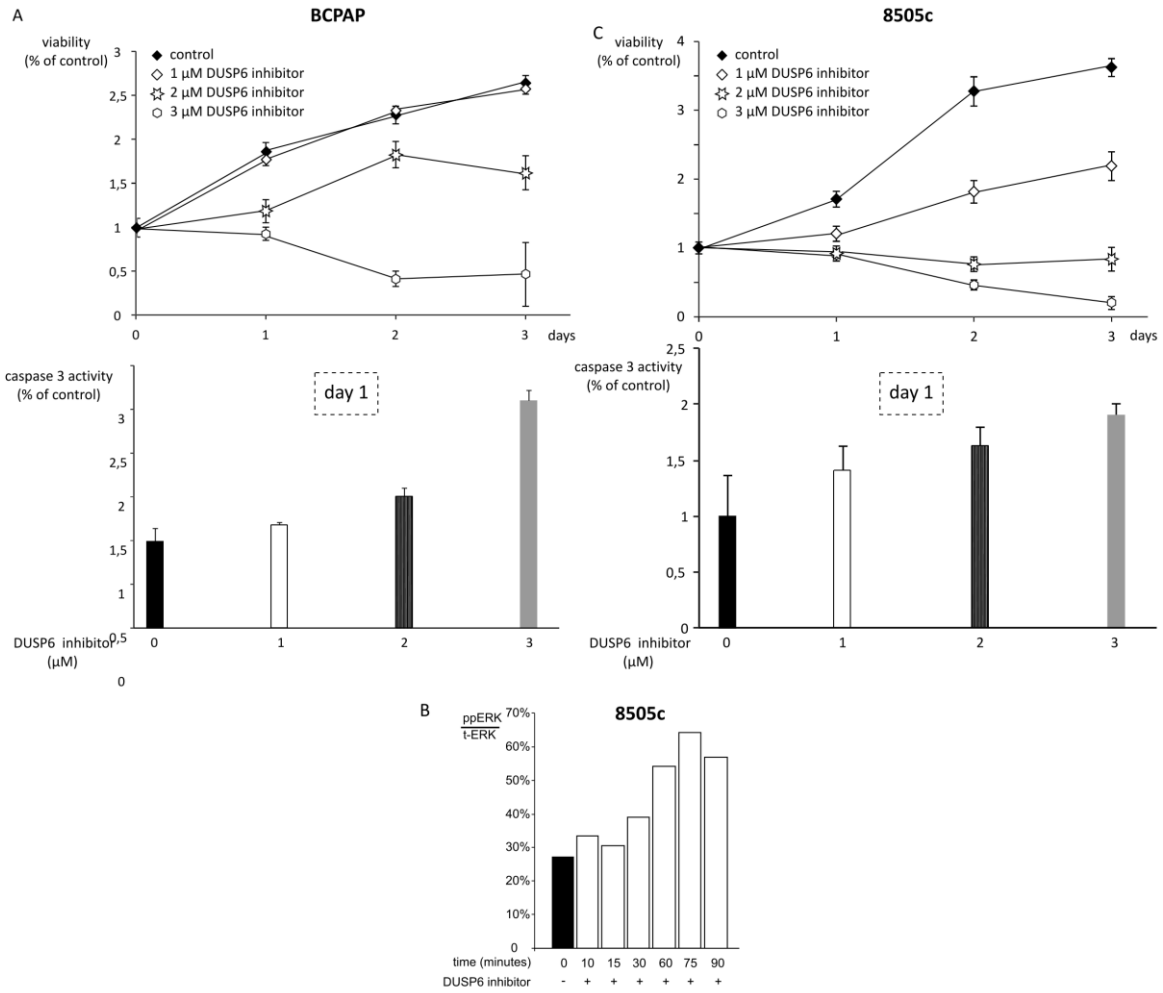
A
BCPAP
viability
(% of control)
control
1 µM DUSP6 inhibitor
2 µM DUSP6 inhibitor
3 µM DUSP6 inhibitor
days
caspase 3 activity
(% of control)
day 1
DUSP6 inhibitor
(µM)
C
8505c
B
8505c
ppERK
t-ERK
time (minutes)
0 10 15 30 60 75 90
DUSP6 inhibitor
- + + + + + +

Figure 6

2. DUSP5, phosphatase spécifique de ERK, est régulée par les facteurs de transcription SRF et Elk-1.

Dual Specificity Phosphatase 5, a specific negative regulator of ERK signaling, is induced by serum response factor and Elk-1 transcription factor.

Camille Buffet, [1] Maria-Grazia Catelli, [1] Karine Hecale-Perlemoine, [1] Françoise Cormier[1], Léopoldine Bricaire, [1] Camille Garcia, [1] Anne Gallet-Dierick, [1] Stéphanie Rodriguez, [1] Lionel Groussin, [1,2]

[1] Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR8104), INSERM U1016; Endocrinology, Metabolism, Diabetes Department, Paris, 75014, France.

[2] Department of Endocrinology, Cochin Hospital, Paris, 75014, France.

Corresponding author: Lionel Groussin, Cochin Hospital, Department of Endocrinology, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris, 75014, France. Tel: 0033158411907; Fax: 003358411805; E-mail: lionel.groussin@cch.aphp.fr

ABSTRACT

Serum stimulation of mammalian cells induces, *via* the MAPK pathway, the nuclear protein DUSP5 (dual-specificity phosphatase 5) specifically interacting with and inactivating the ERK1/2 MAP kinases. However, molecular mechanisms underlying *DUSP5* induction are not well known. Here we found that *DUSP5* mRNA increase depends on transcriptional regulation whereas its half-life is independent from the MAPK pathway. Two contiguous CArG boxes that bind serum response factor (SRF) were found in a 1Kb promoter region, as well as several E twenty-six transcription factor family binding sites (EBS). These sites potentially bind Elk-1, a transcription factor activated by ERK1/2. Using wild type or mutated *DUSP5* promoter reporters, we demonstrated that SRF plays a crucial role in serum induction of *DUSP5* promoter activity, the proximal CArG box being important for SRF binding *in vitro* and in living cells. Moreover Elk-1 was bound *in vitro* to a promoter region containing the proximal CArG box and a putative EBS. Its specific binding to SRF was necessary to elicit promoter response to dominant positive Elk-VP16 and to enhance the response to serum stimulation. SRF and Elk-1 form a ternary complex (Elk-1-SRF-DNA) on *DUSP5* promoter, consequently providing a link to an important negative feedback tightly regulating phosphorylated ERK levels.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascades are a conserved group of signal transduction pathways responsible for the transduction of various signals to a large number of cellular protein substrates [1]. The MAPK pathway, culminating in the activation of extracellular signal-related kinases (ERK1/2) by the MAPK kinase MEK, consists in a cascade of phosphorylation lying downstream of the cellular proto-oncogene RAS thus eliciting cellular responses like proliferation, differentiation, transformation, and survival. ERK1 and ERK2 isoforms are both phosphorylated at the conserved T-X-Y motif in the activation loop of the kinase. ERK is subject to negative regulation by specific protein phosphatases. Among them, two dual-specificity (Thr/Tyr) MAPK phosphatases (DUSPs), DUSP5 and DUSP6, localized in the nucleus [2] and cytoplasm, respectively [3], specifically dephosphorylate ERK [2,4,5]. These phosphatases belong to the large family of DUSPs, so-called as they dephosphorylate both tyrosine and serine/threonine residues [6]. The binding of DUSP6 to ERK is associated with catalytic activation of the bound phosphatase and can play a role in cytoplasmic retention of inactivated ERK through its NES (nuclear export signal) [7-9]. On the contrary, DUSP5 activity seems unaffected upon ERK binding and phosphorylation and its basal activity in the absence of ERK activation is greater than that of DUSP6 [2]. Thus, since DUSP5 possesses a functional NLS (nuclear localization signal) and has been proposed to act as a nuclear anchor for ERK, its substrate selectivity is only determined by the specific interaction with nuclear ERK [2].

DUSP5 and DUSP6 are known to be induced by ERK signaling [10-12], and thereby are involved in a negative feedback loop that tightly controls phosphorylated ERK (pERK) levels. The role of DUSPs in both cancer progression and cancer resistance becomes obvious, making them rational targets for new therapeutics [13]. In differentiated thyroid cancer, a tumorigenesis model studied in our laboratory, the MAPK pathway is constitutively activated [14]. Some DUSPs have been shown to be significantly up-regulated, compared to normal thyroid tissue [15] and are supposed to be a marker of high-risk feature in such tumors [16]. A recently published transcriptome analysis of 496 papillary thyroid cancers confirmed that cancers with the most robust activation of MAPK signaling presented high levels of DUSP4,

DUSP5 and DUSP6 mRNAs (TCGA, http://www.cbioportal.org) Modulation of *DUSP5* expression has been shown to alter the decision of growth arrest versus proliferation of human cancer cells [17,18].

Mechanisms regulating *DUSP6* expression have been largely elucidated, contrary to those controlling *DUSP5* expression. It has been shown that *DUSP6* is regulated by the MAPK pathway, at the transcriptional level, through a conserved binding site for transcription factors of the E twenty-six family (ETS) Ets-1 and Ets-2, within a 508 bp promoter region. [11,12,19]. Ets-1 and Ets-2 are well known direct targets of the MAPK pathway, as most of the ETS transcription factors [20]. The highly conserved ETS binding site (EBS) containing an invariable core motif, 5'-GGA(A/T)-3', defines this family of transcription factors, including Ets-1, Ets-2 and Elk-1 . For the *DUSP6* gene, Ets-1 and Ets-2 are supposed to be bound to their responsive element in the basal state, presumably associated with co-repressors [21]. ERK-phosphorylation of specific residues in the N terminal region of Ets-1 and Ets-2 could lead to the binding of a co-activator (such as CBP/p300) and to an increased transcription of target genes [21-23]. *DUSP6* not only is regulated by the MAPK pathway at the transcriptional level but also at the post-transcriptional level as MEK-ERK pathway has been shown to stabilize *DUSP6* mRNA [24].

Concerning *DUSP5*, one previous study has demonstrated in a human colon-cancer cell line that p53 could bind to a sequence located approximately 1.2 kb upstream of the transcription start site and induce *DUSP5* expression [18]. Nevertheless regulation of *DUSP5* by p53 does not explain how MAPK pathway activation is responsible for the induction of *DUSP5* expression.

The purpose of this paper was to determine the precise mechanism of regulation of the *DUSP5* gene by the MAPK pathway at the transcriptional and/or post-transcriptional level. Bioinformatic analysis allowed us to identify many EBS, putatively binding Elk-1, a member of the ternary complex factors (TCF) sub-family of ETS transcription factors, as well as binding sites for the serum response factor (SRF), namely CArG boxes, in a ~ 1kb promoter region of *DUSP5*. The combination of one EBS and one CArG box corresponds to a serum responsive element (SRE). In the present work we found that *DUSP5* mRNA is a short-lived messenger rapidly induced by ERK activation and that its mRNA stability is independent from the activation of the MAPK pathway, unlike DUSP6. Different experimental approaches were used to understand the role of the regulatory components of the *DUSP5* promoter. Our findings indicate altogether that the ternary complex SRF-Elk-1-SRE is crucial in regulating *DUSP5* transcription, providing a mechanistic link between MAPK pathway signaling and *DUSP5* induction.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

Actinomycin D and cycloheximide were purchased from Sigma-Aldrich. Wortmannin was from Calbiochem. The MEK inhibitor UO126 was from Promega.

Cell lines

NIH/3T3 (mouse fibroblast) cell line was purchased from ATCC (American Type Culture Collection) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, containing 10% foetal calf serum (FCS) and antibiotics. Serum starvation and stimulation consisted of maintaining cells in respectively 0.25% or 20 % FCS.

Quantitative reverse transcription-PCR assay

Total RNA was extracted from cultured cells using the RNeasy Mini Kit from Qiagen and was reverse transcribed to generate cDNA (High-Capacity® cDNA Reverse Transcription

Kit, Applied Biosytem cat # 4368814). Real-time PCR was done using a light cycler instrument (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I, *Roche*). The relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta C}{}_{T}$ method.

Immunoblotting

Whole cell lysates were analyzed by Western Blotting. Briefly, cells were lysed in 50mM TrisHCl (pH 7.5)/ 1mM EDTA/ 150mM NaCl/ 1% Nonidet P-40 and a cocktail of protease inhibitor (PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail tablets and Complete protease inhibitor cocktail tablets; Roche Diagnostics). Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-Rad). Twenty µg of lysate were subjected to SDS–PAGE on 10% acrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech). Nonspecific protein-binding sites were blocked by incubation for 1 hour at room temperature in 50mM Tris-HCl (pH8), 150mM NaCl and 0.1% Tween 20 (TBS-T) containing 10% nonfat dry milk. Incubation with primary antibodies was carried in the same buffer overnight at 4°C. Antibodies directed against pERK from Santa Cruz Biotechnology (1:1000), Inc. (sc-7383); total ERK (1:10000) from Cell Signaling Technology® (#9102), pAKT (1:1000) from Cell Signaling Technology® (#9271), t-AKT (1:1000) from Cell Signaling Technology® (#9272), and GAPDH (1:2000) from Santa-Cruz Biotechnology (sc-25778) were used. Secondary antibodies used were peroxidase-conjugated antirabbit IgG at 1:10000 or peroxidase-conjugated antimouse at 1/10000. The specific complexes were detected using the enhanced chemiluminescence (ECL) system from Amersham Pharmacia Biotech.

Plasmid constructs for cellular transfection

A promoter region of 975 base-pair of the *DUSP5* gene, containing a putative TATA box, was isolated by PCR from a rat bacterial artificial chromosome (BAC) CH230-312K10 (CHORI.ORG) and sub-cloned into pGL3b plasmid (Promega) containing the reporter firefly luciferase. Three shorter reporter plasmids bearing different lengths of *DUSP5* promoter region were then produced. Responsive elements in the shortest plasmid (165 bp) were mutated at various sites with the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Plasmids SRF-VP16, Elk-VP16, Elk-En, and Elk-VP16 (L158P) were a gift from A.D. Scharrocks and E.R. Vickers [25,26]. SRF-En was a gift from B. Knöll [27]. Elk-1-HA was a gift from P. Vanhoutte [28]. Plasmid expressing SRF was a gift from A. Sotiropoulos [29]; Cellular transient transfection was performed with Lipofectamine Plus (Invitrogen). Luciferase assays were performed in triplicate. A representative experiment of at least three independent ones is presented.

Small interference RNA transfection

Two small interfering RNA (siRNA) were purchased from Eurofins MWG Operon. Two mouse *Elk-1* siRNA were transfected simultaneously at the concentration of 50 nmol/L each (5'-GCACUCUGAGUCCAAUUGC-3' and 5'-CCGGGCCTTGCGGTACTA-3' [30] with Lipofectamine Plus (Invitrogen) in two independent experiments. A scramble siRNA was used as control (5'-GCCACTACCTCGTTTCACA-3'). After transfection, the level of protein knockdown was assessed by reverse transcription quantitative PCR.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA was performed using nuclear extracts of NIH/3T3 cells, different ^{32}P-labeled fragments of the *DUSP5* promoter and of an unrelated probe. To demonstrate the specificity of DNA/protein complex formation, a 20-fold molar excess of the various unlabeled probes was used. To demonstrate the presence of a specific protein in the complexes, nuclear extracts were mixed with 2 µg of the following antibodies: SRF from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-13029X), HA-probe from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-805X), or rabbit Ig G from

Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-2027). A representative experiment of at least three independent ones is presented.

Chromatine Immunoprecipitation

NIH/3T3 cells were serum starved for 24 hours and then stimulated with 20% FCS for 30 minutes. Cells were cross-linked with formaldehyde (1%) at room temperature for 10 minutes. Cross-linking was stopped by adding glycine and the cells lysed. Cell lysates were sonicated under conditions yielding fragments ranging from 200 bp to 800 bp. Sonicated chromatin was incubated with 5µg of specific antibodies for 18 hours at 4°C and precipitated complexes washed four times. Cross-linking was reversed by incubation at 65°C (5 hours or overnight). After digestion with Proteinase K (10mg/ml, 2 hours at 37°C), DNA was purified and used for qPCR. The results were reproduced in three independent experiments. The following mouse oligonucleotides were used for qRT-PCR in ChIP assays: GAPDH: 5'-AGAGAGGGAGGAGGGGAAATG (forward primer) and 5'-AACAGGGAGGAGCAGAGAGCAC (reverse primer) and *DUSP5* promoter: 5'-CCACTTCCTCTTTCTCGCTCT (forward primer) and 5'CGCAGGGTTTTATGTGAATG (reverse primer) SRF promoter: 5'-GGCTCCACTGTTCCTTTAAGGAGTTGGC (forward primer) and 5'-CCCCCATATAAAGAGATACAATGTTTCCTT (reverse primer).

Statistical analysis

Statistical significance was determined using the Student's test (online GraphPad Software)

RESULTS

Induction and half-life of DUSP5 mRNA **-** To study the induction of *DUSP5* mRNA, we first evaluated the response of *DUSP5* gene to extracellular signals (fig 1). NIH/3T3 cells were serum deprived for 12 hours and then stimulated by 20% FCS up to 80 minutes. A rapid increase of *DUSP5* mRNA level was observed after 30 minutes (five-fold, $P = 0.02$), with a further increase of about twenty fold at 60 ($P = 4.10^{-3}$) and 80 minutes ($P < 1.10^{-4}$), in parallel with an increased ERK phosphorylation. The *DUSP5* mRNA increase was inhibited by 50 to 70% in the presence of UO126 (MEK inhibitor) and not significantly affected (about 30 % decreased at 60 min and 30% increased at 80 min) by the PI3K inhibitor wortmannin. We confirmed at the protein level, that DUSP5 increased in parallel with the serum stimulation and decreased with MEK-ERK inhibition. On the opposite, DUSP5 protein levels were not affected by the PI3K inhibitor. We can conclude that *DUSP5* is an early response gene and that its induction by FCS in NIH/3T3 cells is essentially dependent on the MEK/ERK pathway.

To test whether the rapid and consistent accumulation of *DUSP5* mRNA after serum stimulation was essentially due to an activation of transcription or was dependent on the mRNA stability, the serum treatment of NIH/3T3 cells was combined with low dose actinomycin D (transcriptional inhibitor) or cycloheximide (protein synthesis inhibitor) treatment. While actinomycin D efficiently inhibited the increase of *DUSP5* mRNA level, cycloheximide treatment had no effect (fig 2A). These data are in favor of a regulation mainly at the transcriptional level. To evaluate if *DUSP5* mRNA was stabilized by the MAPK pathway activation, NIH3T3 cells were stimulated with 20% FCS for one hour, then the half-life of *DUSP5* mRNA was calculated in the presence of actinomycin D with or without UO126. Results presented in figure 2B indicate that *DUSP5* mRNA is a short-lived messenger (t ½=35 min) which is not stabilized by ERK activation, unlike *DUSP6* [24].

Regulatory regions of DUSP5 promoter **-** To understand the mechanisms of transcriptional regulation of the *DUSP5* gene, a search for transcription factors binding sites in the promoter sequence using the Transcription Element Search System (TESS) program from the

Department of Biology of the University of Pennsylvania (http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess) revealed the presence of many core sequences GGA(A/T) or GGA(A/C) potentially implicated in the binding of ETS-domain transcription factors (EBS) [20]. We hypothesized that binding sites for ETS-domain transcription factors, well known targets of the MAPK pathway [20], were involved in the transcriptional regulation of *DUSP5* gene. To test this hypothesis and in order to determine the core regulatory region of the promoter, EBS located in the 5' region of the sequence were progressively deleted to obtain the four constructs represented in figure 3A. Basal luciferase activities of these four reporter constructs in serum-deprived NIH/3T3 cells were similar. Serum-induced luciferase activities were significantly increased compared to basal values (P <0.05). An identical level of stimulation was observed with the four constructs. Within the limits of transfection experiments, this suggests that the shortest *DUSP5* promoter construct is sufficient to elicit a significant serum response, excluding a major role for sequences upstream the nucleotide -165 in transcriptional regulation. These induction levels (i.e. between 2 and 4) have already been observed for the *DUSP6* promoter [12,19]. ERK drives the upregulation of DUSP5 and DUSP6, which in turn dephosphorylates and thus inactivates ERK [2,31]. When ERK signaling is turned off, *DUSP5* and *DUSP6* expression decreases. These low induction levels of *DUSP5* and *DUSP6* can be explained by this negative-feedback mechanism. Similar experiments were conducted in the rat pheochromocytoma-derived PC12 cell line, with nerve growth factor (NGF) as stimulation. Identical results were observed (data not shown).

Altogether, these results suggest that the proximal part of the *DUSP5* promoter is sufficient to enable activation of transcription by serum and growth factors, such as NGF, known to activate the MAPK pathway.

The sequence of the proximal promoter region is reported in figure 3B and putative regulatory sites are indicated. Further analysis of this region revealed the presence of sequences of interest for the regulation of early response gene: two contiguous putative binding sites for SRF, namely CArG boxes. A putative TATA box, corresponding to an alternative of classical TATA box [32], located -22 base pairs upstream from the transcription start site is underlined.
.

Role of SRF and Elk-1 transcription factors - Among transcription factors binding to EBS, Elk-1 binding sites are known to co-localize frequently with CArG box [33]. To test the implication of SRF and Elk-1 in *DUSP5* promoter regulation, the shortest *DUSP5* promoter reporter was transfected with plasmids expressing SRF or Elk-1 (HA tagged) separately or in combination (fig. 4). SRF or Elk1 were both able to induce the luciferase activity of the reporter (2 fold, $P < 1.10^{-3}$) with a further increase when SRF and Elk-1 were combined with or without serum stimulation.

Significant decrease in *Elk-1* mRNA levels with double *Elk-1* siRNA transfection led to a significant decrease in DUSP5 mRNA levels after serum stimulation ($P = 0.02$) in comparison with the control situation. A trend toward a decrease in DUSP5 mRNA levels was also observed in serum-deprived condition, albeit not statistically significantly (Fig 5).

Experiments with plasmids expressing dominant negative forms of SRF (SRF-En) [27] or Elk-1 (Elk-En) [25] also support the implication of SRF and Elk-1. Serum-induced luciferase activity of the shortest *DUSP5* promoter reporter was decreased to control level by SRF-En and even more inhibited by Elk-En in a dose-dependent manner (fig. 6A). In figure 6B the reverse experiment is reported: both dominant positive forms of SRF and Elk-1, SRF-VP16 [26] or Elk-VP16 [34], were able to induce the luciferase activity of the reporter, although with variable levels (see fig. 6B and 7.A).

These results suggest that both SRF and Elk-1 may cooperate to induce the activity of *DUSP5* promoter.

Mutational analyses of DUSP5 promoter - To study in more detail promoter consensus sequences necessary and sufficient for regulation by serum, single or combined mutation of each CArG and EBS site were performed in the shortest *DUSP5* reporter vector and analysed after transfection in NIH/3T3 cells. Mutations of the CArG boxes performed in our study were in agreement with a reported mutation [35,36] resulting in the inability of binding endogenous SRF, and pointing to the crucial role of the central 6(A/T) for SRF DNA binding [37]. The two central core EBS (GGAA and GGAC respectively) were mutated to TTC as described previously [12,38].

SRF-VP16 and Elk-VP16 induced luciferase activity of the wild type promoter, three- and six-fold, respectively ($P < 0.05$) (fig. 7A). Mutations of distal or proximal CArG each allowed the response to both dominant positive forms to occur. This result suggests that both CArG sites may be functional and able to bind SRF even though their activity does not seem to be additive. A combined mutation of the CArG sites reduced dramatically the response to both dominant positive constructs ($P < 0.05$): no induction by SRF-VP16 was observed and the induction by Elk-VP16 was reduced by 50%, indicating that, at least, one CArG site integrity is necessary for SRF action and required for optimal stimulation by Elk-VP16. Single mutation of each EBS did not influence the responses to SRF or Elk dominant positive forms (not shown). The same result was obtained with mutation of both EBS (fig. 7A), suggesting that Elk-1 may act even in the absence of binding to promoter sequences. When the four sites considered were disrupted, response to Elk-VP16 was significantly ($P < 0.05$) reduced to the level observed with the double mutant CArG (fig. 7A). The same panel of reporter vector was then tested for induction by the serum (fig. 7B). Mutation of distal CArG (CArG1) lightly inhibited (statistically insignificant) the serum response while the proximal (CArG2) and double CArG mutation (CARG1+2) almost abolished the serum effect ($P < 0.05$) (fig. 7B). This result suggests that the proximal CArG seems to play a predominant role as compared to the distal one. Single mutation of each EBS did not result in significant inhibitory effect (not shown). Mutation of both EBS did not have any inhibitory effect either, suggesting again that Elk-1 DNA binding is not essential for transcription activation. Finally, mutation of the four sites completely counteracted the serum induction ($P < 0.05$) (fig. 7B).

Elk-1 can regulate the expression of target genes through SRF-independent and SRF-dependent mechanisms [39]. In the first case, Elk-1 can bind to high affinity with EBS independently from SRF and activate transcription. In the second case, specific interaction between the B-box region of Elk-1 and SRF is essential for transcriptional activation of Elk-1 target genes [29,40] and it is known that leucine 158 is a crucial amino acid for such a contact [41]. The stimulation of *DUSP5* promoter activity was investigated in the presence of Elk-VP16 and Elk-VP16(L158P) mutant [25]: only the wild type Elk-VP16 construct able to interact with SRF produced an increase in luciferase activity demonstrating that an interaction between Elk-1 and SRF is required for *DUSP5* gene activation by Elk-VP16 (fig. 8).

Binding of SRF and Elk-1 to DUSP5 promoter sequences - EMSA experiments were performed to study the binding of SRF and Elk-1 to CArG boxes and EBS over the *DUSP5* promoter. 5' ^{32}P labelled oligonucleotides utilized to study the binding of SRF are represented in figure 9A. Each probe was incubated with nuclear extracts from control or serum-treated cells, in presence or not of competitor oligonucleotide and of control or specific antibodies. The interaction was analyzed by non-denaturing gel electrophoresis and autoradiography (fig. 9B). A retarded band, suggesting binding of SRF, was detected in control and stimulated cell extracts with the wild type (WT) probe containing two CArG boxes (CArG1+2 WT, lane 2 and 3) and with the probe containing a mutation of the distal CArG (CArG1 mut) (lane 4 and 5). EMSA performed with serum-stimulated nuclear cell extracts resulted in a retarded band of increased intensity (compare lane 3 with lane 2 and lane 5 with lane 4) suggesting a higher DNA affinity and/or level of SRF following serum stimulation. The same band was of

decreased intensity with the labelled probe mutated in the proximal CArG (CArG2 mut) (lane 6 and 7), indicating that the proximal SRE may have a better affinity for SRF, and plays a predominant role in serum response, according to our previous results (see fig. 7B). Competition with unlabelled excess of CArG1+2 WT (lane 10) and CArG1 mutated (lane 11) oligonucleotides was more efficient than with CArG2 mutated probe (lane 12). No competition was observed with a probe containing a mutation of both CArG boxes or an unrelated oligonucleotide (lane 13 and 14). Most importantly, in the retarded band, the presence of SRF in control and in stimulated cell extracts was demonstrated by the supershift with specific SRF antibody (lane 16 and 17), indicating that SRF may bind each CArG box of *DUSP5* promoter even in the absence of serum stimulation (lane 2, 4, and 6).

Then the interaction of ELK-1 with promoter sequences was investigated. The probes that were used are listed in figure 10A. They consisted of sequences including the CArG2 box (the most efficient for serum response) and the proximal EBS. Moreover, due to difficulties in obtaining a supershift with only endogenous Elk-1, the HA tagged Elk-1 expression plasmid [28] was transfected in NIH/3T3 cells used for preparation of nuclear extract. The EMSA experiment with a labelled probe containing WT CArG2 box and EBS (fig. 10B) showed a retarded band specifically competed by excess of WT oligonucleotide (lane 3), and by probe containing WT CArG box and mutant EBS (lane 3). On the contrary, the retarded band was not competed by CArG2 mutant (lane 5), the double mutant (lane 6), or the unrelated probe (lane 7). Moreover anti SRF (lane 9), anti HA (lane 10), antibodies produced a supershift indicating the presence of SRF and Elk-1 in a ternary complex with the WT oligonucleotide. The EMSA experiment with a labelled probe containing WT CArG2 box and mutated EBS (figure 10 C), showed a retarded band supershifted by anti SRF (lane 4), but not by anti HA antibody (lane 5). Altogether these results demonstrate the presence of SRF in the complex bound to the labelled probe, as expected with a WT CArG2 site. On the contrary Elk-1-HA is not found any more in the complexe suggesting that the mutation created in the EBS site is deleterious for Elk-1 binding,

SRF binds to the endogenous DUSP5 gene promoter **-** To further evaluate the binding of SRF in the *DUSP5* proximal promoter region, we performed ChIP experiments (fig. 11). Using SRF antibody, we demonstrated, as a positive control, that SRF was bound to its own promoter region (18.5-fold enrichment corrected from IgG binding), as already known [42]. We found that it was also bound to the promoter region of *DUSP5* encompassing the two CArG boxes (13-fold enrichment corrected from IgG binding). No significant enrichment was seen using primers amplifying the exon 2 of *GAPDH* gene (used as negative control).

DISCUSSION

In this study, we investigated the mechanisms involved in the regulation of *DUSP5* gene expression. First, we confirmed that *DUSP5* is an early response gene and that the MEK-ERK pathway is essentially involved in the regulation of *DUSP5* mRNA expression in NIH/3T3 cell line [10,43,44]. The Ras-ERK and PI3K-AKT pathways can negatively regulate each other's activity [45]. AKT negatively regulates ERK activation. Such cross-inhibition is revealed when the PI3K pathway is chemically blocked by wortmannin, thereby releasing the cross-inhibition and effectively activating the MAPK pathway. In our work DUSP5 mRNA decreased in the presence of wortmaninn as observed by Tullai et al. [46]. They reached the same conclusion of a predominant role for the MAPK pathway in the regulation of *DUSP5* expression and also found that PI3K pathway inhibition, as compared with induction with PDGF alone, decreased *DUSP5* mRNA levels of ~ 45% (35% in our work) [46]. Nevertheless, DUSP5 protein levels do not seem to be affected by PI3K pathway inhibition [10].

We found that *DUSP5* gene expression is regulated at the transcriptional level and that *DUSP5* mRNA is not stabilized by the MEK-ERK pathway, contrary to *DUSP6* [24]. When MAPK pathway is inhibited *DUSP6* mRNA half-life is very short (about nine minutes) and ERK activation results in the stabilization of *DUSP6* mRNA (half-life ranging from 23 to 37 minutes) [24]. ERK is also able to bind to DUSP6 and cause its catalytic activation through the stabilization of the active phosphatase conformation [7-9]. On the contrary, in our work, *DUSP5* mRNA half-life remained unchanged after MAPK pathway inhibition. Previous work has shown that DUSP5 interacts with ERK and is responsible for its nuclear anchoring, but this binding is not accompanied by the catalytic activation of the phosphatase [2]**.** Furthermore, basal activity of DUSP5 is greater than that of DUSP6 before and even after its activation by ERK [2]. *DUSP5* mRNA half-life is also comparable to that of the early response gene c-fos mRNA (about 15 minutes) [47]. The rapid induction and short half-life of *DUSP5* mRNA may lead to quick variation of DUSP5 protein level and enzymatic activity, responsible for a tight control of pERK levels.

We identified several EBS in the proximal and distal part of the *DUSP5* promoter sequence, which could provide a link with the MAPK pathway regulation through the binding of TCF. The presence of multiple binding motifs for ETS-domain transcription factors has previously been reported as a characteristic of Elk-1 target genes [33].

However, we showed that the proximal part of the *DUSP5* promoter is sufficient for its basal and serum or growth factor-induced activity, excluding a major role for EBS located in the distal part of the promoter. This is in accordance with previous demonstration that regions which are uniquely bound by Elk-1 tend to contain fewer and/or weaker ETS binding motifs and are often bound by other partner transcription factors such as SRF[48].

We also identified in this proximal part two contiguous CArG boxes binding SRF. Tandem CArG elements have been described only for few genes, including SRF itself, whereas multiple non-contiguous CArG boxes in CArG containing genes are frequently found [49]. An analysis of the *DUSP5* promoter region using the Vertebrate Multiz Alignment & Conservation track [50] within the UCSC genome browser revealed that both core EBS sequences flanking the two contiguous CArG boxes are identical and almost in the same position in mouse, rat, and human. Two principal pathways regulate SRF differentially. The first one is RHO dependent, utilizes MRTF (myocardin-related transcription factors) family, and is regulated by the level of G-actin [51]. The second one is RAS dependent and, *via* ERK activation, SRF is involved in nucleoprotein complexes containing members of the TCF subfamily of the ETS domain transcriptional regulators, such as Elk-1 and recruited to EBS [51]. This pathway is illustrated by the paradigm of regulation of the early response gene c-fos where Elk-1 and SRF dimer form complexes on SRE which is composed of two binding sites (a CArG box for SRF and an EBS for Elk-1) and is involved in many cellular activities including cell growth and differentiation [52-56]. Binding of SRF to the CArG box with high affinity is required for the recruitment of one of the members of the TCF subfamily [54,55,57]. Among members of the ETS transcription factor family, Elk-1 seems to be a good candidate for the regulation of *DUSP5* gene expression for several reasons. Elk-1 is phosphorylated by ERK [36,58,59], thus providing an explanation for the induction of DUSP5 by the MAPK pathway signaling. ChIP-chip analysis highlighted that Elk-1-binding regions, mostly found within 1 kB of the transcription start site, are frequently co-bound by SRF, over the promoter of more than 200 genes. These co-occupied regions are more likely to be bound specifically by Elk-1 and not by other ETS-domain transcription factors, such as GABPA [33]. Furthermore, Nunes-Xavier et al. [17] tested the effect of RNA silencing of Ets-2 on *DUSP5* and *DUSP6* mRNA levels and found no inhibitory effect for *DUSP5* but only for *DUSP6*. In an extensive attempt to identify candidate transcription factor binding sites in genes regulated by specific signaling pathways in growth factor-stimulated human

glioblastoma cell line, Tullai et al. [46] reported a predicted SRF binding sites in the *DUSP5* promoter. However, fully experimental validation of the putative CArG box remained to be provided.

As expected, the dominant negative SRF-En and Elk-En repressed *DUSP5* promoter activity. SRF-En has been shown to repress c-fos promoter activity and this effect was abolished by mutating the c-fos CArG box [27]. Elk-En has been shown to repress luciferase activity of an SRE reporter vector, containing both SRF binding site and an adjacent EBS motif [25]. Moreover, Elk-En is also able to repress the transcription of the SRF/TCF (Elk-1) c-fos-regulated gene but does not interfere with the expression of the Rho-actin SRF target gene *vinculin* [25]. On the other hand, dominant positive forms of SRF, SRF-VP16, and Elk-VP16 have been shown to efficiently activate a c-fos SRE-luc construct [34,60]. In our work, the dominant positive Elk-VP16 and SRF-VP16 induced *DUSP5* promoter activity.

Our luciferase reporter assays with different mutants of the *DUSP5* promoter stimulated with serum suggest that the proximal CArG box may play a regulatory key role in *DUSP5* expression. Consistently, EMSA suggests that SRF may bind the proximal CArG box with higher affinity than the distal CArG. Moreover, in myotubes transduced with a constitutively active form of SRF (SRF-VP16), microarray data analyses revealed a statistically significant 1.4 fold increase in DUSP5 expression in comparison with the control situation [61]. We suppose that only one of the two contiguous CArG boxes of the *DUSP5* promoter could play a predominant role *in vivo* because sterical hindrance should exclude the possibility that both CArG boxes were bound by SRF homodimers [62,63]. As expected, the mutation of both CArG boxes and EBS in the proximal promoter of *DUSP5* abolished the induction by the serum or SRF-VP16, but surprisingly not completely by Elk-VP16. Residual activations by Elk-VP16 of c-fos SRE reporter vectors containing ETS mutated binding site have already been reported in serum deprived NIH/3T3 cells [34,35]. We have eliminated the possibility of creation of new responsive elements in the mutated promoters, which could bind Elk-1 or other transcription factors. The binding of Elk-1 to one or both EBS of the proximal *DUSP5* promoter gene does not seem to be essential to activate transcription, as suggested by induction of luciferase activity by the serum and Elk-VP16 in the context of double EBS mutation. On the contrary, the protein-protein interaction between SRF and Elk-1 seems to be essential for efficient ternary complex formation, as highlighted by the absence of induction of *DUSP5* promoter reporter with the mutant Elk-VP16(L158P) which has lost its ability to bind SRF. Likewise, the mutant dominant negative Elk-En(L158P), which is not able to bind SRF either, has been shown to cause little repression of an SRE reporter vector (containing both SRF and EBS), but on the contrary can efficiently repress a reporter containing just ETS motifs [25]. Thus Elk-En(L158P) failed to repress SRE-mediated transcription but retained its ability to repress transcription from genes whose promoter regions are uniquely bound by Elk-1[25].

We hypothesize that Elk-1 could interact directly with SRF, independently of its binding to EBS, as already described *in vitro* [64,65]. A direct protein-protein interaction between the transcription factors Elk-1 and SRF, in the absence of the SRE, has been demonstrated previously, using pull-down assays [64]. Our results suggest a model in which SRF is constitutively bound to the *DUSP5* promoter, as already proposed for c-fos [36]. Upon activation of the ERK pathway, Elk-1 is phosphorylated [58,66] and forms a ternary complex with SRF over one SRE of the *DUSP5* promoter to activate transcription, without necessarily binding to the EBS. Furthermore our data suggesting that serum stimulation may result in increased binding capacity of SRF to CArG boxes is consistent with results previously reported [67-69]. Site specific phosphorylation of SRF by several kinases including $pp90^{rsk}$ which is itself phosphorylated and activated by MAPK, has been shown to enhance the rate and affinity with which SRF associates with the SRE [67]. Increased DNA binding capacity

does not seem to be explained by an increased dimerization of SRF, whereas change in the conformation of SRF that facilitates DNA binding could be an alternative explanation [69]. However, SRF mutants that cannot be phosphorylated were capable of activating transcription of SRF-dependent proliferation genes such as c-fos [65,68]. Moreover, SRF level seems to remain unchanged after serum stimulation [70].

One limitation of our study is that we could not demonstrate *in living cells* the presence of Elk-1 over the SRE of the *DUSP5* gene by ChIP assay. This pitfall is due to technical trouble as we failed to find enrichment for the promoter regions of predicted positive genes (such as c-fos [54,55] or SRF [71] in chromatin immunoprecipitates with anti-Elk-1 antibody) despite our observance of the published protocol [72]. Note that, one previous ChIP-Seq study identified in a mammary human cell line the putative promoter region of *DUSP5* as significantly enriched in Elk-1 signal only once though two experiments were realized [48], underlying unexplained difficulties in achieving this demonstration. Potential weakness of the proximal EBS site of the DUSP5 promoter should be kept in mind. The core sequence of the proximal EBS site (i.e. GGAC) of the DUSP5 promoter identified by the TESS program has never been described *in vivo* but only *in vitro* [20]. Nevertheless, our EMSA performed with nuclear extracts from NIH/3T3 cells transfected with a plasmid expressing Elk-1-HA, demonstrated, *in vitro*, the presence of Elk-1 in the supershifted bands obtained with anti-HA antibody and suggested that the mutation created in this site may be deleterious for Elk-1 binding. Moreover, our mRNA and luciferase activity data obtained with Elk-1 siRNA and Elk-1-HA vector suggested a role for endogenous Elk-1 in the regulation of DUSP5 expression.

A single mechanistic explanation was previously described for the MAPK pathway and the transcriptional regulation of *DUSP5* in human breast carcinoma cells. A presumed AP-1 binding site was described upstream of the translation initiation site of the *DUSP5* gene [17]. As c-Jun, regulated by the MAPK pathway, can form dimer with c-fos over the AP-1 binding site, demonstration of down-regulation of *DUSP5* mRNA by silencing c-Jun appears as indirect evidence of ERK-dependent stimulation of *DUSP5* transcription [17].

In summary, we have shown that the DUSP5 phosphatase is regulated at the transcriptional level by the MAPK pathway and that SRE is involved in the regulation of this early response gene. We propose a model in which SRF is bound to *DUSP5* promoter in the basal state. In stimulated conditions, Elk-1 could be recruited at the *DUSP5* promoter through direct association with SRF regardless of its DNA-binding or through its binding site and activate transcription. Thus induction of DUSP5 by the MEK-ERK pathway serves as an important feedback loop that controls activation of ERK1/2.

Acknowledgements - We thank Pascale Bossard, Françoise Cormier, Angelique Gougelet, Athanassia Jonvel, Solenne Marmier, Renaud Dentin, Michèle Cahuzac, and Patrick Lores for their valuable help and advice. We cordially thank Andrew Scharrocks, Elaine Ruth Vickers, Bernd Knöll, and Peter Vanhoutte for providing the plasmids used in this work.

REFERENCES

1. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410: 37-40.
2. Mandl M, Slack DN, Keyse SM (2005) Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. Mol Cell Biol 25: 1830-1845.
3. Groom LA, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S, Keyse SM (1996) Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. Embo J 15: 3621-3632.
4. Muda M, Theodosiou A, Gillieron C, Smith A, Chabert C, et al. (1998) The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. J Biol Chem 273: 9323-9329.
5. Arkell RS, Dickinson RJ, Squires M, Hayat S, Keyse SM, et al. (2008) DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5. Cell Signal 20: 836-843.
6. Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. Curr Opin Cell Biol 12: 186-192.
7. Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM (2004) Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. J Biol Chem 279: 41882-41891.
8. Fjeld CC, Rice AE, Kim Y, Gee KR, Denu JM (2000) Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. J Biol Chem 275: 6749-6757.
9. Dowd S, Sneddon AA, Keyse SM (1998) Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. J Cell Sci 111 (Pt 22): 3389-3399.
10. Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA, Keyse SM (2009) Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. Cell Signal 21: 1794-1805.
11. Zhang Z, Kobayashi S, Borczuk AC, Leidner RS, Laframboise T, et al. (2010) Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. Carcinogenesis 31: 577-586.
12. Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, et al. (2008) Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. Biochem J 412: 287-298.
13. Bermudez O, Pages G, Gimond C (2010) The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. Am J Physiol Cell Physiol 299: C189-202.
14. Knauf JA, Fagin JA (2009) Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. Curr Opin Cell Biol 21: 296-303.
15. Griffith OL, Melck A, Jones SJ, Wiseman SM (2006) Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. J Clin Oncol 24: 5043-5051.

16. Lee JU, Huang S, Lee MH, Lee SE, Ryu MJ, et al. (2012) Dual specificity phosphatase 6 as a predictor of invasiveness in papillary thyroid cancer. Eur J Endocrinol 167: 93-101.

17. Nunes-Xavier CE, Tarrega C, Cejudo-Marin R, Frijhoff J, Sandin A, et al. (2010) Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester. J Biol Chem 285: 26417-26430.

18. Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y (2003) Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. Oncogene 22: 5586-5591.

19. Furukawa T, Tanji E, Xu S, Horii A (2008) Feedback regulation of DUSP6 transcription responding to MAPK1 via ETS2 in human cells. Biochem Biophys Res Commun 377: 317-320.

20. Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ (2011) Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. Annu Rev Biochem 80: 437-471.

21. Foulds CE, Nelson ML, Blaszczak AG, Graves BJ (2004) Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment. Mol Cell Biol 24: 10954-10964.

22. McCarthy SA, Chen D, Yang BS, Garcia Ramirez JJ, Cherwinski H, et al. (1997) Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. Mol Cell Biol 17: 2401-2412.

23. Yang BS, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, et al. (1996) Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. Mol Cell Biol 16: 538-547.

24. Bermudez O, Jouandin P, Rottier J, Bourcier C, Pages G, et al. (2011) Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. J Cell Physiol 226: 276-284.

25. Vickers ER, Kasza A, Kurnaz IA, Seifert A, Zeef LA, et al. (2004) Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. Mol Cell Biol 24: 10340-10351.

26. Dalton S, Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68: 597-612.

27. Stritt C, Stern S, Harting K, Manke T, Sinske D, et al. (2009) Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. Nat Neurosci 12: 418-427.

28. Vanhoutte P, Nissen JL, Brugg B, Gaspera BD, Besson MJ, et al. (2001) Opposing roles of Elk-1 and its brain-specific isoform, short Elk-1, in nerve growth factor-induced PC12 differentiation. J Biol Chem 276: 5189-5196.

29. Treisman R, Marais R, Wynne J (1992) Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. EMBO J 11: 4631-4640.

30. Demir O, Kurnaz IA (2008) Wildtype Elk-1, but not a SUMOylation mutant, represses egr-1 expression in SH-SY5Y neuroblastomas. Neurosci Lett 437: 20-24.

31. Zeliadt NA, Mauro LJ, Wattenberg EV (2008) Reciprocal regulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and mitogen activated protein kinase phosphatase-3. Toxicol Appl Pharmacol 232: 408-417.

32. Bucher P (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. J Mol Biol 212: 563-578.

33. Boros J, Donaldson IJ, O'Donnell A, Odrowaz ZA, Zeef L, et al. (2009) Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery. Genome Res 19: 1963-1973.

34. Price MA, Rogers AE, Treisman R (1995) Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). Embo J 14: 2589-2601.

35. Hill CS, Wynne J, Treisman R (1994) Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. Embo J 13: 5421-5432.

36. Hill CS, Marais R, John S, Wynne J, Dalton S, et al. (1993) Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. Cell 73: 395-406.

37. Pellegrini L, Tan S, Richmond TJ (1995) Structure of serum response factor core bound to DNA. Nature 376: 490-498.

38. Withers DA, Hakomori SI (2000) Human alpha (1,3)-fucosyltransferase IV (FUTIV) gene expression is regulated by elk-1 in the U937 cell line. J Biol Chem 275: 40588-40593.

39. Shaw PE, Saxton J (2003) Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. Int J Biochem Cell Biol 35: 1210-1226.

40. Janknecht R, Nordheim A (1992) Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. Nucleic Acids Res 20: 3317-3324.

41. Ling Y, Lakey JH, Roberts CE, Sharrocks AD (1997) Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1. EMBO J 16: 2431-2440.

42. Spencer JA, Misra RP (1996) Expression of the serum response factor gene is regulated by serum response factor binding sites. J Biol Chem 271: 16535-16543.

43. Ishibashi T, Bottaro DP, Michieli P, Kelley CA, Aaronson SA (1994) A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock. J Biol Chem 269: 29897-29902.

44. Kwak SP, Dixon JE (1995) Multiple dual specificity protein tyrosine phosphatases are expressed and regulated differentially in liver cell lines. J Biol Chem 270: 1156-1160.

45. Mendoza MC, Er EE, Blenis J (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. Trends Biochem Sci 36: 320-328.

46. Tullai JW, Schaffer ME, Mullenbrock S, Kasif S, Cooper GM (2004) Identification of transcription factor binding sites upstream of human genes regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase and MEK/ERK signaling pathways. J Biol Chem 279: 20167-20177.

47. Kabnick KS, Housman DE (1988) Determinants that contribute to cytoplasmic stability of human c-fos and beta-globin mRNAs are located at several sites in each mRNA. Mol Cell Biol 8: 3244-3250.

48. Odrowaz Z, Sharrocks AD (2012) ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes. PLoS Genet 8: e1002694.

49. Sun Q, Chen G, Streb JW, Long X, Yang Y, et al. (2006) Defining the mammalian CArGome. Genome Res 16: 197-207.

50. Blanchette M, Kent WJ, Riemer C, Elnitski L, Smit AF, et al. (2004) Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. Genome Res 14: 708-715.

51. Posern G, Treisman R (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. Trends Cell Biol 16: 588-596.

52. Chai J, Tarnawski AS (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. J Physiol Pharmacol 53: 147-157.

53. Konig H, Ponta H, Rahmsdorf U, Buscher M, Schonthal A, et al. (1989) Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. Embo J 8: 2559-2566.

54. Shaw PE, Schroter H, Nordheim A (1989) The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. Cell 56: 563-572.

55. Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES, Nordheim A (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. Nature 354: 531-534.

56. Sharrocks AD (2002) Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. Biochem Soc Trans 30: 1-9.

57. Hassler M, Richmond TJ (2001) The B-box dominates SAP-1-SRF interactions in the structure of the ternary complex. EMBO J 20: 3018-3028.

58. Marais R, Wynne J, Treisman R (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell 73: 381-393.

59. Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, Nordheim A (1993) Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. EMBO J 12: 5097-5104.

60. Schratt G, Philippar U, Hockemeyer D, Schwarz H, Alberti S, et al. (2004) SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. EMBO J 23: 1834-1844.

61. Guerci A, Lahoute C, Hebrard S, Collard L, Graindorge D, et al. (2012) Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. Cell Metab 15: 25-37.

62. Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. Cell 55: 989-1003.

63. Mo Y, Ho W, Johnston K, Marmorstein R (2001) Crystal structure of a ternary SAP-1/SRF/c-fos SRE DNA complex. J Mol Biol 314: 495-506.

64. Shore P, Sharrocks AD (1994) The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. Mol Cell Biol 14: 3283-3291.

65. Iyer D, Chang D, Marx J, Wei L, Olson EN, et al. (2006) Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 4516-4521.

66. Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. Nature 358: 414-417.

67. Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, et al. (1993) A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. Mol Cell Biol 13: 6260-6273.

68. Janknecht R, Hipskind RA, Houthaeve T, Nordheim A, Stunnenberg HG (1992) Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. EMBO J 11: 1045-1054.

69. Manak JR, Prywes R (1991) Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II. Mol Cell Biol 11: 3652-3659.

70. Manak JR, Prywes R (1993) Phosphorylation of serum response factor by casein kinase II: evidence against a role in growth factor regulation of fos expression. Oncogene 8: 703-711.

71. Kasza A, O'Donnell A, Gascoigne K, Zeef LA, Hayes A, et al. (2005) The ETS domain transcription factor Elk-1 regulates the expression of its partner protein, SRF. J Biol Chem 280: 1149-1155.

72. O'Donnell A, Yang SH, Sharrocks AD (2008) MAP kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch. Mol Cell 29: 780-785.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *DUSP5* is an early response gene induced by ERK signaling. NIH/3T3 cells were stimulated by FCS 20% and treated either with 20 µM UO126 (MEK inhibitor) or 80nM wortmannin (PI3K inhibitor) for the indicated time. *DUSP5* mRNA levels were measured by RT-qPCR and normalized for cyclophilin mRNA levels. *DUSP5* mRNA levels at baseline were set at 1 and values at subsequent time points are indicated as fold induction compared to baseline. Protein expression levels were assayed by immunoblot for phosphorylated ERK (p-ERK), total ERK (t-ERK), phosphorylated (p-AKT) and total AKT (t-AKT). The effect of inhibitors on p-ERK and p-AKT levels is shown. * $P < 0.05$; ** P = non-significant

Figure 2. *DUSP5* expression is regulated at the transcriptional level. (A) NIH/3T3 cells were treated with FCS 20% alone or in combination with the transcriptional inhibitor actinomycin D (5 µg/ml) or the protein synthesis inhibitor cycloheximide (100 µg/ml) for the indicated times. *DUSP5* mRNA levels were measured by RT-qPCR and normalized for cyclophilin mRNA levels. *DUSP5* mRNA levels at baseline were set at 1 and values at subsequent time points are indicated as fold induction compared to baseline. (**B)** NIH/3T3 cells were stimulated with 20% FCS for one hour and then were treated with 5 µg/ml of actinomycin D with or without 20µM of UO126 (MEK inhibitor) for the indicated times. *DUSP5* mRNA levels, before actinomycin D treatment, were taken as 100%. *DUSP5* mRNA levels were measured at different times after UO126 treatment. *DUSP5* mRNA half-life (t ½) is indicated in cells with and without (control) UO126 treatment.

Figure 3. The proximal region of *DUSP5* promoter is sufficient for its serum induction. (A) Reporter vectors harboring full-length or various truncations of the promoter region of *DUSP5* (250 ng) were transfected in NIH/3T3 cells with (black boxes) or without (white boxes) stimulation by FCS 20% for nine hours (Luciferase activity was normalized to Renilla activity). Basal luciferase activities were related to that of full-length construct. Induced luciferase activities of each vector were reported to their own basal activity. * $P < 0.05$. **(B)** The sequence of the putative proximal promoter region of *DUSP5* gene is shown. Putative transcription factor binding sites are indicated: two contiguous CArG boxes potentially implicated in binding of SRF, two EBS sequences GGA(A/C) potentially implicated in

binding of Elk-1, one putative Lef-TCF binding site (Wnt/ β-catenin pathway), and one cAMP response element (CRE).

Figure 4. Induction of *DUSP5* promoter by transcription factors SRF and Elk-1. NIH/3T3 cells were transiently transfected with 250 ng of *DUSP5* proximal promoter reporter alone or in combination with SRF (100 ng) or Elk1-HA (300 ng) expression vectors. Luciferase assays were performed in sixplicate and mean values ± S.D. are shown. Cells were starved (0.25% FCS) for 24 hours and then stimulated or not with 20% FCS for nine hours before assessment of luciferase activity. Luciferase activities were reported to the basal luciferase activity of DUSP5 reporter vector without SRF, Elk-1 vectors and FCS stimulation. * $P < 1.10^{-3}$.

Figure 5. Decrease in DUSP5 mRNA levels after Elk-1 inactivation. NIH3T3 cells were transfected with two specific Elk-1 (50 nmol/L each) or control (100 nmol/L) small interfering RNA (siRNA) and serum deprived for 12 hours and then stimulated or not with 20% FCS for one hour. Results are representative of three independent experiments. Elk-1 and DUSP5 mRNA levels were assessed by reverse-transcription qPCR. In each condition, mRNA levels were reported to the level observed with the control siRNA.

Figure 6. *DUSP5* promoter regulation by dominant negative and constitutively active expression vectors of SRF and Elk-1. NIH/3T3 cells were transiently transfected with 250 ng of *DUSP5* proximal promoter reporter in combination with the indicated expression vectors or an empty control vector. Luciferase assays were performed in triplicate and mean values ± S.D. are shown. **(A)** Additional transfected plasmids were the dominant negative SRF-En or Elk-En at increasing concentrations. Cells were starved (0.25% FCS) for 24 hours and then stimulated or not with 20% FCS for nine hours before assessment of luciferase activity. * $P < 0.05$ **(B)** Increasing concentrations of the constitutively active SRF-VP16 or Elk-VP16 was transfected. Cells were starved (0.25% FCS) for 24 hours before assessment of luciferase activity. * $P < 0.05$

Figure 7. Role of CArG Boxes and EBS in *DUSP5* transcriptional regulation. Schematic representation of the wild type *DUSP5* proximal promoter is shown on the upper left part of the figure. Different reporter constructs with the indicated CArG Box and EBS mutated sites are illustrated below. Cells were transfected with 250 ng of each construct. At six hours post-transfection cells were serum-starved for 24 hours before assessment of luciferase activity. Luciferase assays were performed in triplicate and mean values ± S.D. are shown. **(A)** Cells were additionally transiently transfected with 200 ng of the constitutively active SRF-VP16 or Elk-VP16 or an empty control vector. **(B)** Alternatively cells were stimulated with 20% FCS for nine hours before assessment of luciferase activity, normalized to Renilla activity.

Figure 8. Elk-VP16(L158P) mutant is defective in *DUSP5* transcriptional activation. Serum starved (0.25%) NIH/3T3 cells were transiently transfected with 250 ng of *DUSP5* proximal promoter reporter and with 200 ng of the plasmids Elk-VP16 or Elk-VP16(L158P) before assessment of luciferase activity. Luciferase assays were performed in triplicate and mean values ± S.D. are shown. * $P < 0.05$, ** *P*: statistically insignificant.

Figure 9. Proximal promoter region of *DUSP5* contains two functional CArG boxes. (A) Probes used in Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) containing CArG boxes of the

proximal promoter region of *DUSP5* and an unrelated probe are shown. **(B)** EMSA was performed with the end labeled CArG boxes probe using 4 µg of nuclear extracts isolated from NIH/3T3 cells stimulated or not with 20% FCS for 30 minutes. For competition experiments, different unlabeled oligonucleotides (lane 10 to 14) were used. The indicated antibodies (lane 15 to 17) were used for supershift analysis.

Figure. 10. Proximal promoter region of *DUSP5* contains a functional serum responsive element. (A) DNA sequences of *DUSP5* promoter region containing proximal CArG box (CArG2) with proximal EBS and unrelated probe used in Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA). **(B)** EMSA was performed with the end labeled probe containing wild type CArG Boxe and EBS using 5 µg of nuclear extracts isolated from NIH/3T3 transfected with hemagglutinin (HA) tagged Elk-1expression plasmid. For competition experiments, different unlabeled oligonucleotides (lane 3 to 7) were used. The indicated antibodies (lane 8 to 10) were used for supershift analysis. **(C)** EMSA was performed with the end labeled probe containing wild type CArG Boxe and mutated EBS using 5 µg of the same nuclear extracts. The indicated antibodies (lane 3 to 5) were used for supershift analysis.

Figure 11. SRF binding to the endogenous *DUSP5* promoter proximal region. ChIP assay was performed, in NIH/3T3 cells stimulated for 30 minutes with 20% FCS after 24 hours of serum starvation, using an unrelated control antibody (IgG) and antibody specific for SRF. Binding of SRF to an exonic part of the *GAPDH* gene (negative control), to the SRF promoter (positive control) and to the proximal part of the *DUSP5* promoter was measured by qPCR and corrected for background measured in IgG immunoprecipitates. Graphs show the most representative result of at least three independent experiments.

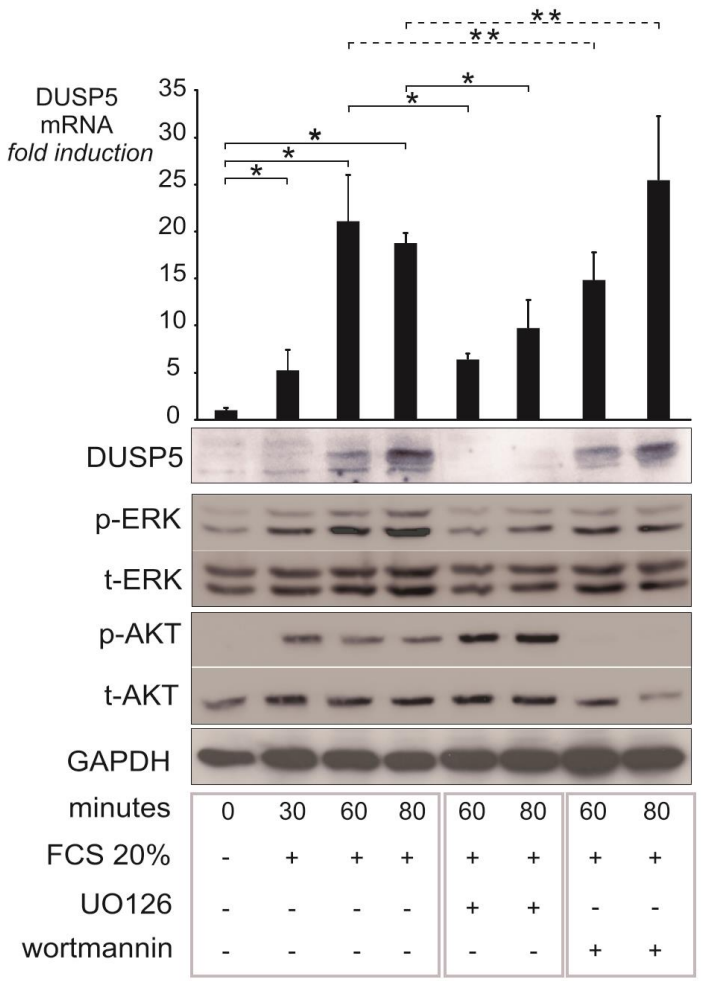

Figure 1

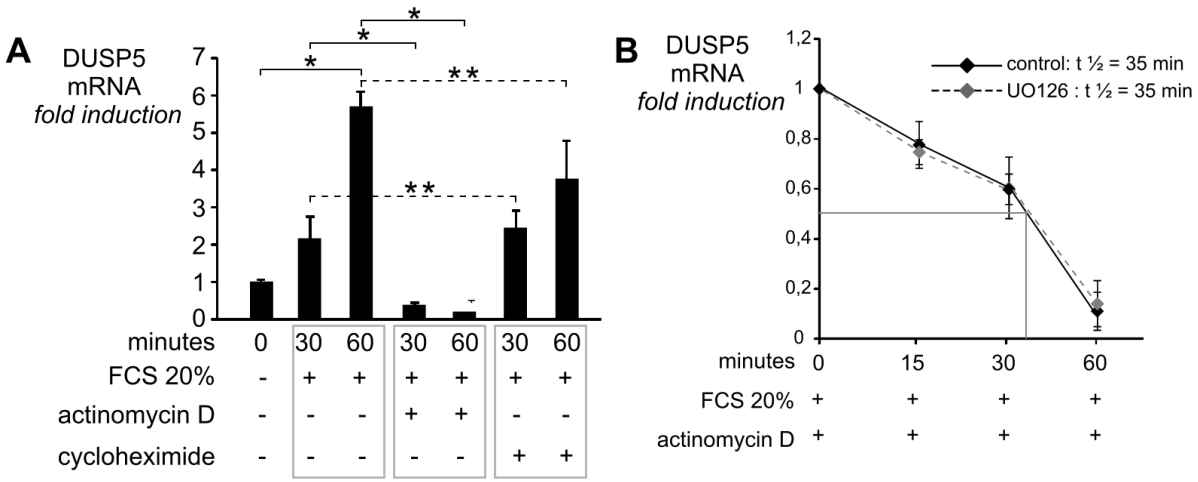

Figure 2

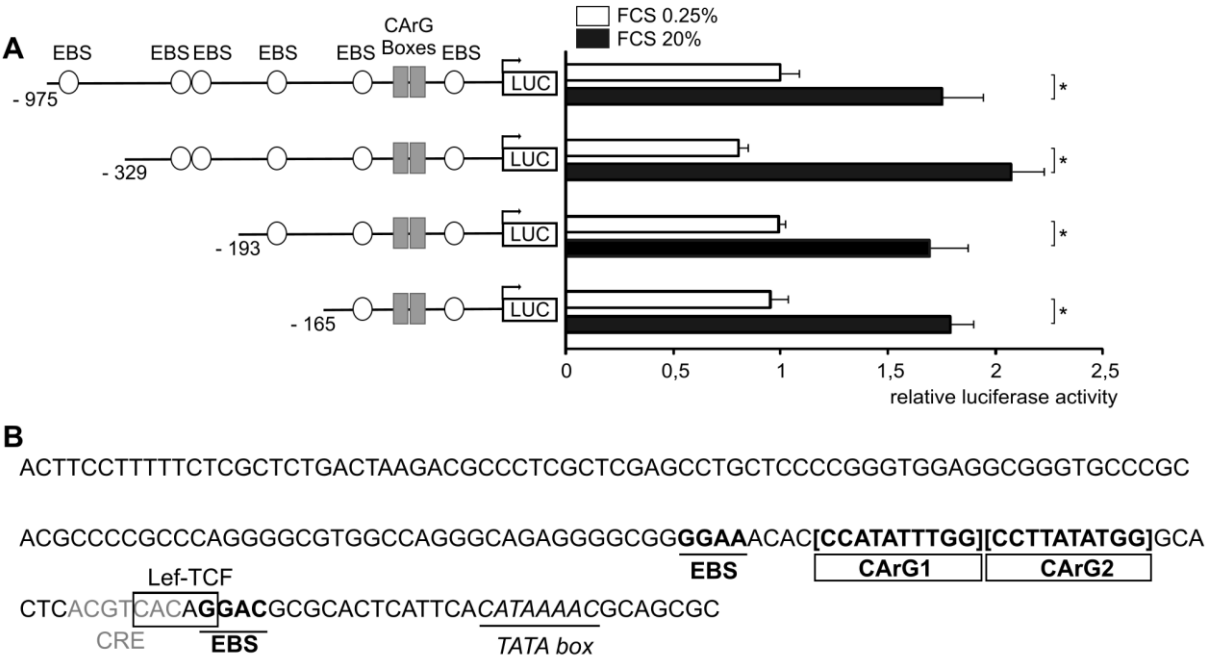

Figure 3

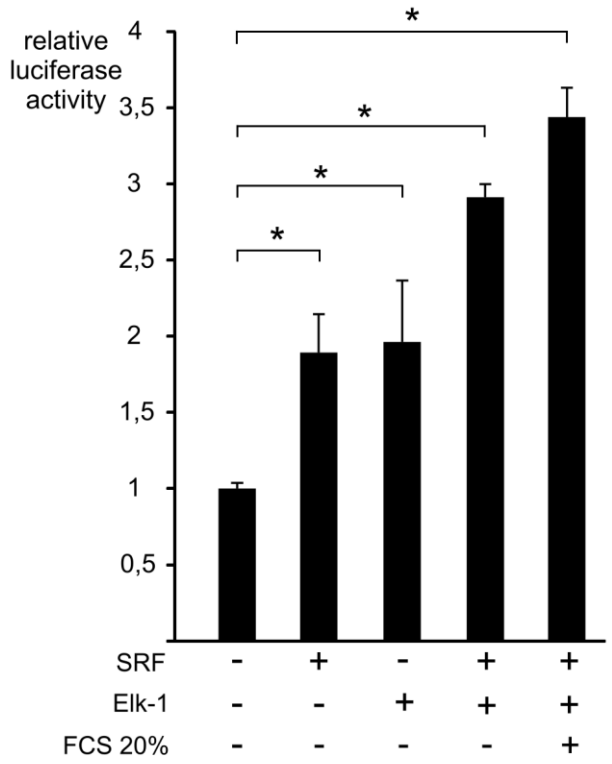

Figure 4

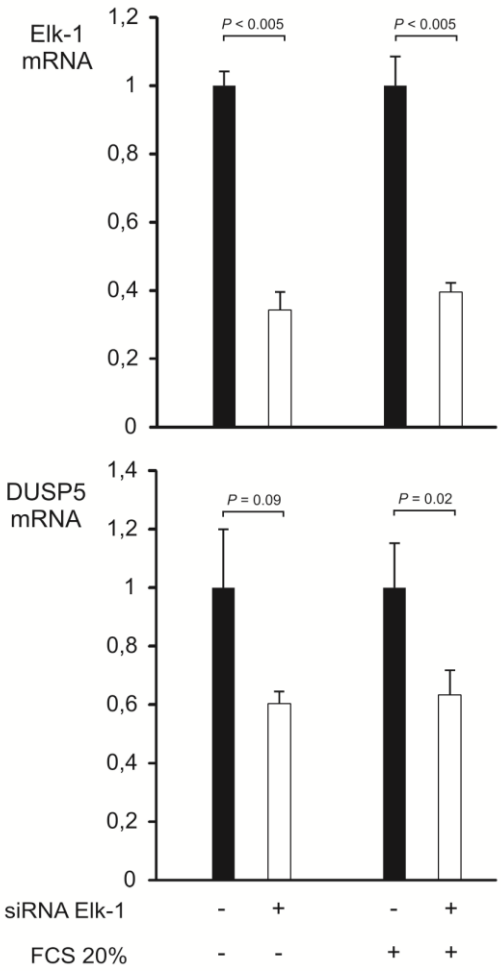

Figure 5

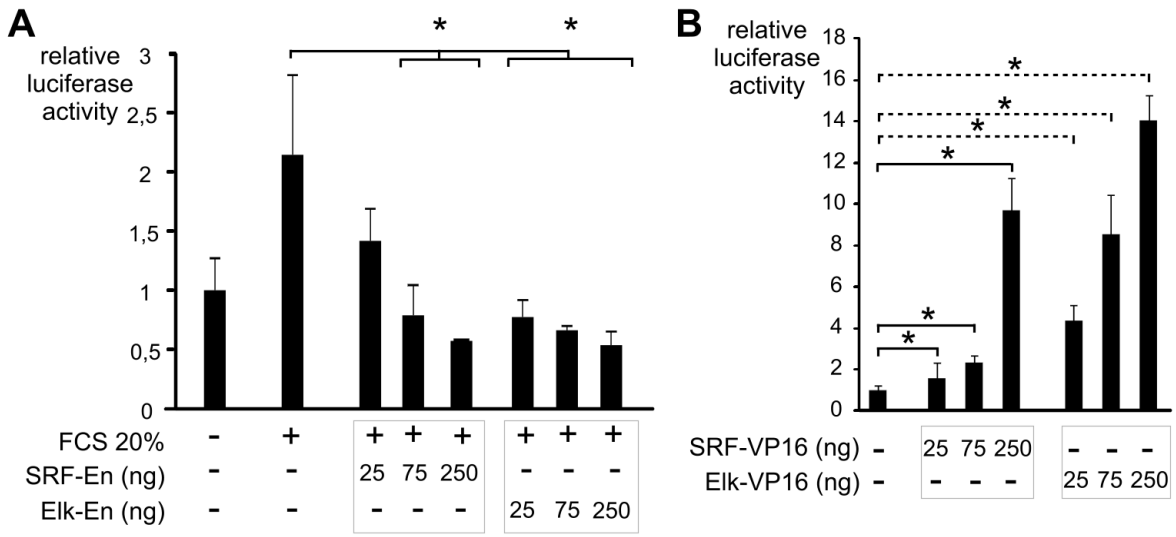

Figure 6

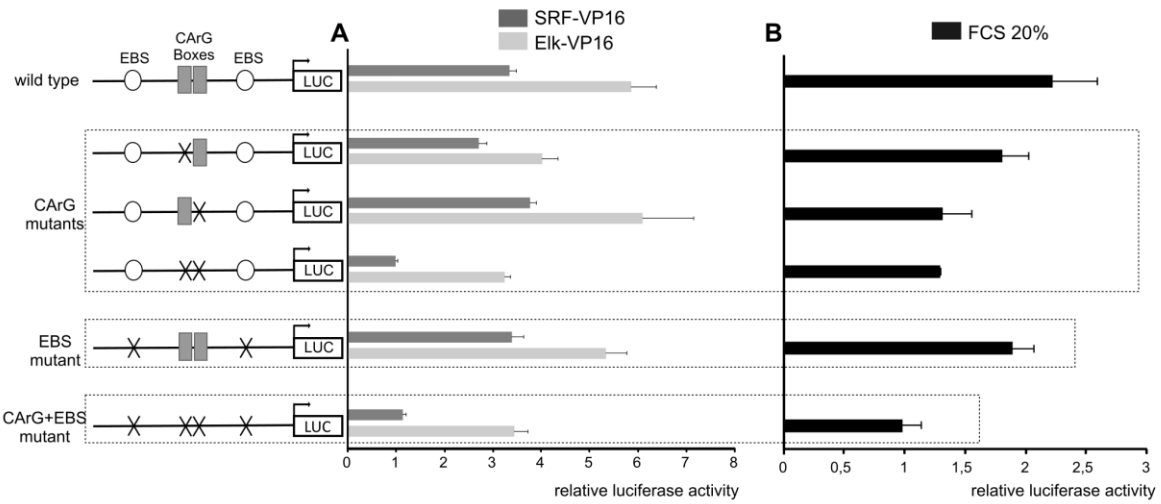

Figure 7

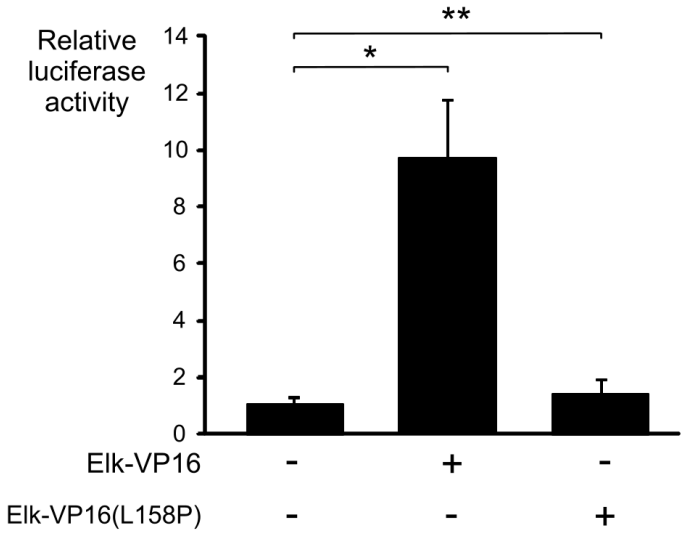

Figure 8

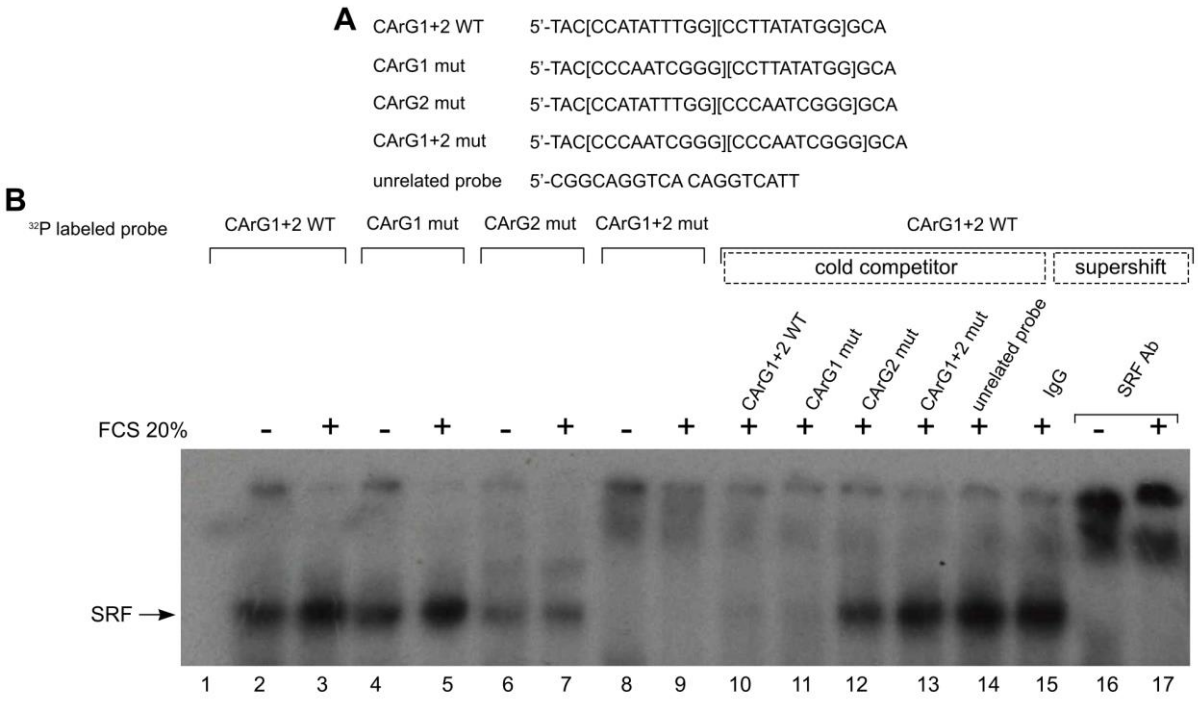

Figure 9

A

CArG2 WT+EBS WT	5' TGG[CCTTATATGG]GCACTCACGTCACA[GGAC]GCGCAC
CArG2 WT +EBS mut	5' TGG[CCTTATATGG]GCACTCACGTCACA[TTCC]GCGCAC
CArG2 mut + EBS WT	5' TGG[CCCAATCGGG]GCACTCACGTCACAGGACGCGCAC
CArG2 mut + EBS mut	5' TGG[CCCAATCGGG]GCACTCACGTCACA[TTCC]GCGCAC
unrelated probe	5' CGGCAGGTCACAGGTCATT

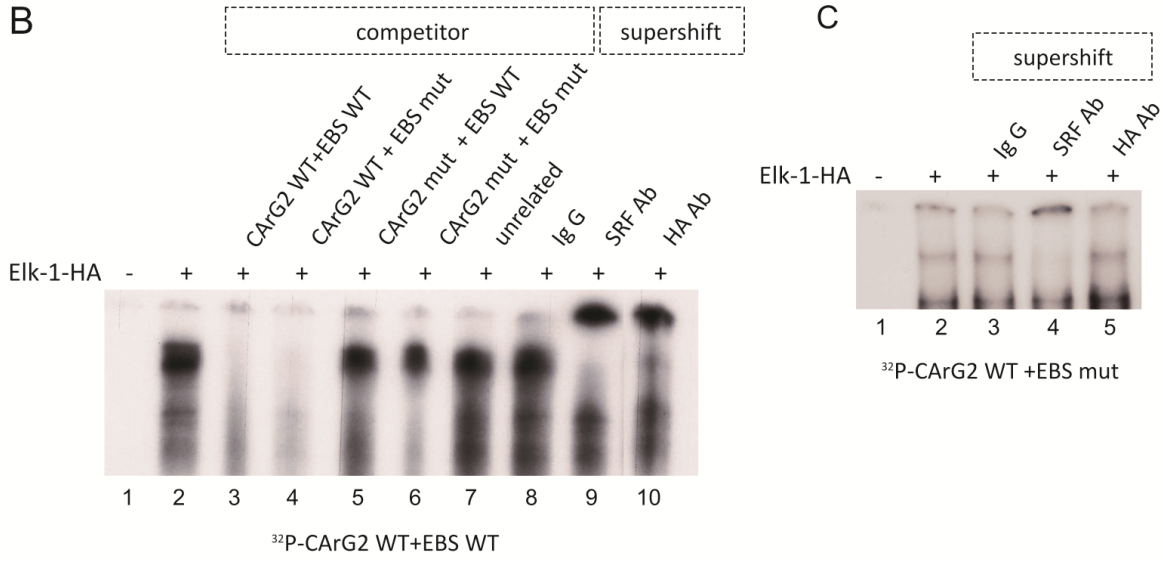

Figure 10

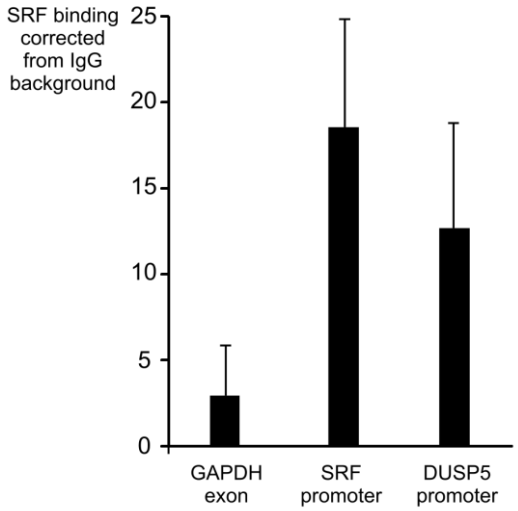
SRF binding corrected from IgG background
25
20
15
10
5
0
GAPDH exon
SRF promoter
DUSP5 promoter

Figure 11

Discussion

Nos données vont dans le sens d'une **activation différente** de la **voie MAPK** au sein des CPT, selon le niveau de l'anomalie moléculaire mise en évidence. Il faut bien noter que ces différentes anomalies moléculaires sont situées sur la même voie de signalisation et conduisent donc toutes à une augmentation en cascade de la phosphorylation des acteurs en aval. Malgré cela, l'activation de la **voie MAPK parait plus forte** dans les **tumeurs mutées pour B-RAF** en comparaison avec les tumeurs porteuses d'une autre anomalie moléculaire. Cette plus forte activation de la voie MAPK pourrait être un élément d'explication de leur agressivité plus importante sur le plan clinique.

Une hypothèse permettant d'expliquer l'activation différentielle de la voie MAPK est la possibilité pour un oncogène de conduire à une plus forte stimulation par rapport aux autres oncogènes situés à un niveau différent sur cette voie de signalisation. Ainsi, l'activité kinasique de B-RAF^{V600E} mesurée *in vitro* est 5 fois supérieure à celle de la protéine B-RAF non mutée (activée par H-RAS^{G12V}) [47]. Cette activité kinasique nettement plus importante de l'oncogène B-RAF^{V600E} est probablement l'explication en aval de niveaux de p-MEK plus importants. Ceci a pu être documenté par western blot dans un autre modèle de cancer où la voie MAPK joue un rôle central : le mélanome. En effet, dans des lignées cellulaires dérivées de mélanomes humains les niveaux de p-MEK étaient nettement plus élevés dans celles porteuses d'une mutation B-RAF^{V600E} en comparaison avec celles sans mutation de B-RAF [101]. Des résultats similaires avaient également été suggérés dans deux lignées cellulaires dérivées de CPT mutés pour B-RAF, en comparaison à une lignée porteuse d'un réarrangement RET/PTC [102]. Dans ce même travail, les auteurs avaient analysé les niveaux d'ARNm de Spry 2 (appartenant à la famille Sprouty et régulant négativement l'activation de la voie MAPK), dans 30 CPT humains dont 10 étaient mutés B-RAF. La surexpression de Spry2 plus importante dans les CPT mutés pour B-RAF par rapport aux autres CPT suggérait un degré d'activation de la voie MAPK plus important en présence d'une mutation de B-RAF [102]. Notre travail confirme également, *in vitro*, dans 11 lignées cellulaires dérivées de CPT humains, la présence de niveaux de p-MEK plus élevés dans les lignées avec mutation B-RAF^{V600E} en comparaison avec les lignées sans mutation de B-RAF.

Une autre hypothèse pour l'activation différentielle de la voie MAPK selon l'anomalie moléculaire identifiée au sein d'une tumeur pourrait être liée au rôle de certains inhibiteurs de la voie. A titre d'exemple, DUSP4, phosphatase nucléaire capable de déphosphoryler ERK, semble jouer un rôle spécifiquement dans les CPT avec une mutation de RAS. DUSP4 a été identifiée comme surexprimée dans des lignées cellulaires humaines de cancer du pancréas, notamment celles porteuses d'une mutation RAS [353] et dans des lignées cellulaires humaines de cancer de la thyroïde [354]. Les données de transcriptome réalisé sur 65 patients ayant un cancer colo-rectal ont révélé une surexpression de DUSP4 dans les cancers porteurs d'une mutation K-RAS [355]. ERK induit l'expression de DUSP4, qui à son tour déphosphoryle et inactive ERK. Nous avons observé dans les lignées PCCL3 que l'expression de l'oncogène H-RAS^{V12} pendant 24 à 72h, s'accompagne d'une augmentation du niveau d'ARNm de DUSP4 d'un facteur 2 à 4 (données non publiées). En revanche, le niveau d'ARNm de DUSP4 reste constant dans les lignées PCCL3 B-RAF^{V600E} et PCCL3 RET/PTC3. Cette surexpression de DUSP4, dans les lignées avec mutation RAS, est susceptible d'expliquer l'absence d'augmentation des niveaux de p-ERK observée dans les lignées PCCL3 après expression de l'oncogène H-RAS^{V12}.

Les données antérieures de la littérature obtenues sur des CPT humains n'étaient pas en faveur de l'hypothèse d'une activation différentielle de la voie MAPK selon l'anomalie moléculaire présente au sein de la tumeur. En effet, les niveaux de p-MEK, quantifiés en immunohistochimie, de CPT porteurs d'une mutation B-RAF^{V600E} étaient très variables d'une tumeur à l'autre et non corrélés aux niveaux d'un autre marqueur d'activation de la voie, comme Sprouty2 [291]. D'autres auteurs n'avaient pas pu montrer de différences concernant les niveaux de p-MEK et de p-ERK, en immunohistochimie, entre des CPT porteurs ou non de la mutation B-RAF^{V600E}. De plus, il n'a pas été mis en évidence de différence significative d'activation de cette voie par western blot (analyse des niveaux de pMEK et pERK) dans des lignées cellulaires humaines de cancer de la thyroïde avec ou sans mutation B-RAF^{V600E} [269]. Dans ces études la quantification en immunohistochimie était réalisée de façon sommaire et subjective, à l'aide d'un score visuel, déterminé par un seul anatomopathologiste. Enfin, certains avaient observé que les niveaux de p-ERK, en immunohistochimie et en western blot, dans des CPT mutés B-RAF, n'étaient supérieurs à celui du tissu sain adjacent, que pour 7% des tumeurs [268]. Ce dernier résultat pourrait être expliqué par la présence de rétrocontrôles négatifs au niveau de ERK, notamment par les phosphatases DUSP5 et DUSP6 venant déphosphoryler ERK. Dans notre travail, la présence de niveaux plus élevés d'ARNm de DUSP5 et de DUSP6 dans 21 CPT humains porteurs d'une mutation B-RAF en

comparaison à 18 CPT avec une autre ou sans anomalie moléculaire identifiée est également en faveur d'un degré d'activation de la voie MAPK plus important dans les CPT mutés pour B-RAF. Nous avons également analysé par western blot les niveaux de p-MEK/t-MEK dans 14 CPT humains (3 sans anomalie moléculaire identifiée, 2 porteurs d'un réarrangement RET/PTC, 3 d'une mutation du gène *N-RAS* ou *H-RAS* et 6 du gène *B-RAF*) sans pouvoir mettre en évidence de différence selon l'anomalie moléculaire identifiée (résultat non publié). L'hétérogénéité des tissus tumoraux extraits (variabilité du tissu stromal associé par exemple) pourrait rendre difficile la mise en évidence d'une différence d'activation de la voie des MAPK, reposant avant tout sur des niveaux plus élevés de phosphorylation de MEK.

L'activation de la voie MAPK est un phénomène dynamique complexe, avec comme discuté en introduction différents mécanismes de rétrocontrôles négatifs à différents niveaux de la voie. Cet aspect dynamique de l'activation et de l'inactivation de la voie rend peut être difficile la mise en évidence de différences subtiles mais réelles de niveaux de p-MEK ou p-ERK. Des techniques sensibles, voire dynamiques, permettraient de quantifier cette activation de manière plus fines. A ce titre, la technique récente de puces protéiques en phase réverse parait être intéressante. Il s'agit d'une approche de dot-blot miniaturisé où une très faible quantité de lysats protéiques est déposée sur des lames couvertes de nitrocellulose, avec une incubation ensuite en présence d'anticorps primaires spécifiques. Elle permet une détection très sensible de niveaux protéiques différents, ainsi que de leur phosphorylation, à partir d'une petite quantité de matériel tumoral humain pouvant être obtenu par microdissection par laser [356, 357]. La technologie Nanopro® est également intéressante. Cette technique automatisée est basée sur le principe d'électrophorèse par focalisation en capillaire. Elle présente l'avantage de nécessiter peu de matériel (environ 25 cellules par condition analysée), de séparer, détecter et quantifier des différences de phosphorylation d'une même protéine (corrélée à son état d'activation). En raison de sa sensibilité, elle pourrait mettre évidence des différences de phosphorylation de ERK (forme simplement phosphorylée inactive ou doublement phosphorylée active) ou de MEK (phosphorylation de deux sérines responsables de l'activation de MEK1/2, phosphorylation d'autres résidus responsables d'une inhibition de MEK [358]), impossible à objectiver par western blot ou immunohistochimie. A l'avenir, ces deux technologies récentes pourraient également être utilisées pour analyser finement les modifications dynamiques de phosphorylation des acteurs de la voie MAPK en réponse aux inhibiteurs pharmacologiques, notamment les inhibiteurs de tyrosine kinase.

DUSP5 et **DUSP6** sont des **marqueurs d'activation de la voie MAPK** dans les cancers papillaires de la thyroïde et ne semblent pas avoir de rôle de gène suppresseur de tumeur.

Une méta-analyse de transcriptomes de cancers de la thyroïde révèle que *DUSP6* fait partie de la liste des 39 gènes dont l'expression est significativement modifiée par rapport au tissu sain dans la plupart de ces transcriptomes. DUSP6 a été identifiée comme sur-exprimée dans les cancers entre 3.7 et 5.2 fois plus que dans le tissu sain [270] et 2.3 fois ($P = 0.001$) dans notre travail. DUSP5 ne faisait pas partie de cette liste même si cette phosphatase a déjà été identifiée comme sur-exprimée dans 2 transcriptomes ([198] ; TCGA ; http://www.cbioportal.org). Dans notre travail, elle est en moyenne 1,43 fois plus exprimée au sein des CPT que du tissu sain ($P = 0.001$). Un transcriptome récent de 496 CPT a permis également d'identifier DUSP4 comme étant largement surexprimée dans les CPT porteur de la mutation $BRAF^{V600E}$ (TCGA ; http://www.cbioportal.org). L'hypothèse permettant d'expliquer que dans notre travail, la perte d'expression d'une ou des deux phosphatases n'ait pas de conséquence en terme de prolifération cellulaire est la possibilité de compensation de l'une par l'autre, ou par d'autres phosphatases, permettant ainsi de maintenir des niveaux régulés, constants de p-ERK non délétères pour la cellule (voir discussion paragraphe ci-dessous). Des résultats similaires ont été observés dans la lignée humaine de cancer du col utérin HeLa [359]. En effet, l'inactivation de DUSP1 ou DUSP2 ou DUSP4 par interférence ARN n'avait pas d'effet sur les niveaux de la forme doublement phosphorylé, donc active de ERK2 (pp-ERK2), après application de stimuli responsables d'une activation de la voie MAPK (ester de phorbol activant la protéine kinase C ou EGF). En revanche, l'inactivation concomitante des 3 DUSPs étaient associées à une augmentation significative des niveaux de pp-ERK2, par rapport à la situation contrôle. Néanmoins, cet effet semblait stimulus dépendant puisqu'il n'était observé qu'après stimulation par ester de phorbol et pas avec l'EGF. Au niveau de l'ARNm, l'inactivation de DUSP1 s'accompagnait d'une augmentation significative, compensatoire, du niveau de DUSP2 après stimulation par ester de phorbol et vice versa. Cette compensation d'une DUSP par l'autre pourrait expliquer l'absence d'effet sur les niveaux de pp-ERK2 lorsqu'une seule des DUSP est inactivée. A l'inverse, après stimulation par l'EGF et inactivation d'une seule des 3 DUSPs, aucune compensation significative n'était observée sur le niveau d'ARNm des 2 autres. Dans notre travail, on peut faire l'hypothèse que l'inactivation de DUSP5 et/ou DUSP6 puisse entrainer notamment une surexpression de DUSP1 pouvant déphosphoryler la MAPK, c-Jun-NH2-kinase (JNK). Cette dernière ayant des effets pro-apoptotiques, la surexpression de DUSP1 qui l'inactive pourrait empêcher la survenue d'une apoptose. En effet, la surexpression de DUSP1 est associée à une

augmentation de la prolifération et du potentiel invasif de lignées cellulaires humaines de cancers du poumon non à petites cellules [360]. Sa surexpression est aussi corrélée à la chimiorésistance de lignées cellulaires cancéreuses, via l'inhibition de JNK. L'inactivation de DUSP1, par exemple par approche d'interférence ARN permettait de restaurer cette sensibilité [360]. A ce titre, il pourrait être intéressant d'analyser spécifiquement les conséquences de l'inactivation de DUSP5 et/ou DUSP6 sur le niveau d'expression de DUSP1.

Nos données suggèrent qu'une **« hyperactivation » de la voie MAPK** pourrait avoir un **effet délétère pour la survie cellulaire**. En effet, dans notre travail le BCI (inhibiteur pharmacologique de DUSP6) est responsable d'une activation accrue de la voie MAPK, se traduisant par une augmentation des niveaux de ERK activé, avec pour conséquence une baisse de la prolifération cellulaire, liée au moins en partie à une apoptose cellulaire. Cet inhibiteur de DUSP6 n'est pas tout à fait spécifique de cette phosphatase, étant donné la grande conservation des protéines de cette famille. En effet, il a été démontré que le BCI était également capable d'inhiber DUSP1. On peut supposer qu'il inhibe également d'autres phosphatases et entraîne ainsi une « hyper-activation » de ERK. Plusieurs données de la littérature montrent que l'activation de la voie MEK-ERK peut entrainer différentes formes de mort cellulaire : apoptose (mort cellulaire programmée), autophagie (dégradation cellulaire partielle de la cellule par ses propres lysosomes), senescence (arrêt irréversible du cycle cellulaire), ceci aussi bien, *in vitro*, dans différents modèles cellulaires en réponse à différents stimuli, mais également *in vivo* [224]. L'activation de cette voie pourrait ainsi, dans certaines situations, promouvoir la prolifération et dans d'autres la mort cellulaire, en fonction de la durée et de l'amplitude de l'activation de ERK. La principale hypothèse est qu'une activation soutenue de ERK (maintien de l'état doublement phosphorylé de ERK pendant 6 à 72h) conduirait à la mort cellulaire, alors qu'une activation transitoire, régulée, stimulerait la prolifération. L'activation de ERK s'accompagne de la mise en place de nombreux rétrocontrôles négatifs en différents points de la voie MAPK ayant pour but de limiter l'activation de la voie. On peut supposer que tout agent empêchant l'action de ces rétrocontrôles négatifs puisse entraîner la mort cellulaire. Il a été suggéré que les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) étaient capables d'inhiber les phosphatases DUSP1 et DUSP6 [361, 362], entraînant ainsi une activation prolongée de ERK. Les ROS peuvent également activer la voie MEK-ERK en activant certains récepteurs à activité tyrosine kinase (PDGFR

ou EGFR), des protéines impliquées dans l'activation de RAF ou encore en promouvant directement l'activation de RAF ou MEK. Une hypothèse alternative pour expliquer la mort cellulaire par activation de la voie MAPK, est le rôle de la localisation cellulaire de ERK. De façon physiologique, la localisation de ERK dans les différents compartiments cellulaires est finement régulée. Suite à son activation par MEK, ERK transloque dans le noyau où il a accès à ses différents substrats. ERK est alors inactivé par déphosphorylation et est rapidement exporté hors du noyau. Dans un certain nombre de situation l'activation prolongée de ERK ne suffit pas à elle seule à entraîner la mort cellulaire. L'apoptose induite par certains agents pharmacologiques (tamoxifène, doxorubicine) pourrait dépendre d'une localisation aberrante, prolongée de ERK dans le noyau. A l'inverse une séquestration de ERK activé dans le cytoplasme par PEA-15 (Astrocytic phosphoprotein), DAPK (Death-Associated Protein kinase) ou Bik (BCL2-interacting killer) pourrait promouvoir l'autophagie ou la senescence cellulaire.

Le rôle pro-apoptotique de l'activation de ERK est bien documenté pour l'apoptose induite par certains agents responsables de dommage de l'ADN, comme l'étoposide, la doxorubicine ou les rayons gamma. On peut prédire que l'inhibition de ERK par des composés pharmacologiques anti-tumoraux classiques utilisés en combinaison avec les précédents puissent diminuer l'efficacité anti-tumorale. Il peut être anticipé que la cellule tumorale puisse développer des mécanismes d'échappement à la mort cellulaire induite par ERK, en augmentant sa dépendance vis-à-vis d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K-AKT.

Différents inhibiteurs de phosphatases ont ainsi été développés, compte tenu de leur rôle potentiel dans l'induction de la mort cellulaire, suite à une hyperactivation de ERK, puis testés *in vitro* et *in vivo* [235]. Un inhibiteur pharmacologique de DUSP1 et de DUSP6 (nommé NSC 95397) était capable d'annuler les effets cytoprotecteurs de la dexamethasone sur des lignées cellulaires humaines de cancer du sein [363]. Un autre inhibiteur de DUSP1 (TPI-3) est également capable, *in vitro* et *in vivo* chez des souris nude, de faciliter l'apoptose induite par des chimiothérapies ou des biothérapies dans des modèles de mélanome, de cancer du côlon et de leucémie [235]. L'absence d'effet indésirable de cet inhibiteur chez la souris, bien que sa spécificité vis-à-vis de DUSP1 ne soit pas précisée, en fait un candidat pour un développement clinique. Un inhibiteur de DUSP3 stoppait la progression dans le cycle cellulaire de lignées cellulaires de leucémie B [235]. Un autre inhibiteur spécifique de DUSP3 était capable de diminuer la prolifération d'une lignée cellulaire de cancer du col utérin, dans

laquelle la phosphatase DUSP3 est surexprimée [235]. Enfin, l'inhibiteur de DUSP26 (NSC-87877) pourrait être intéressant à utiliser pour les cancers anaplasiques de la thyroïde, compte tenu des données démontrant que cette phosphatase est impliquée dans la survie de lignées cellulaires de ce type de cancer [364]. Néanmoins, aucun inhibiteur de DUSP n'est actuellement commercialisé en thérapeutique.

Compte tenu du caractère conservé des DUSPs, il parait difficile d'inhiber pharmacologiquement spécifiquement une seule DUSP. Par ailleurs, il semble exister une redondance fonctionnelle au sein de cette famille. Néanmoins, l'inhibition simultanée de plusieurs DUSPs pourrait être intéressante pour entraîner une « hyper-activation » de ERK et donc l'apoptose, avec la réserve des toxicités secondaires. Les DUSPs paraissent être des cibles thérapeutiques d'autant plus séduisantes, qu'en raison de leur structure relativement simple et de leur petite taille, le développement d'inhibiteur pharmacologique est moins difficile que pour d'autres composés [365]. Cette stratégie nécessite de bien connaitre l'oncogenèse du modèle tumoral ciblé, étant donné le niveau d'expression variable et le rôle opposé des DUSPs selon le modèle étudié : oncogène versus gène suppresseur de tumeurs (cf tableau 6). Cette stratégie nécessite aussi d'analyser soigneusement les effets « off-target » de l'inhibition de DUSPs.

On peut supposer que le niveau d'expression des DUSPs variables selon le modèle tumoral étudié, soit lié en partie à une régulation tissu-spécifique, par des miRNA (petits ARN non-codants pouvant dégrader l'ARNm ou réprimer la traduction de cet ARNm). DUSP5 et DUSP6 font ainsi l'objet, chez la souris, d'une régulation post-transcriptionnelle par le miRNA-181a, qui était responsable d'une diminution des niveaux d'ARNm et de protéines de ces 2 phosphatases dans un modèle cellulaire de lymphocytes T [366]. On peut faire l'hypothèse, en cancérogenèse, qu'une anomalie d'expression de miRNA ciblant les DUSPs puissent impacter ces inhibiteurs naturels de la voie des MAPK et expliquer, en partie, le rôle variable des DUSPs sur la prolifération d'un modèle tumoral à l'autre.

Dans une deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à la **régulation de l'expression de DUSP5**, dont les données dans la littérature sont rares, contrairement à celle de DUSP6. L'analyse des conséquences d'un modèle « knock-out » DUSP5, non encore publié à ce jour, pourrait être intéressante. Ce type de modèle permettrait de préciser le rôle de DUSP5 dans le développement, en particulier du système immunitaire où les DUSPs jouent

un rôle important. Nous avons montré que *DUSP5* est un gène de réponse précoce, régulé au niveau transcriptionnel. Nous avons proposé un mécanisme de régulation de l'expression de DUSP5 suite à l'activation de la voie MAPK, via le facteur de transcription Elk-1, lui-même régulé par cette voie et qui peut se lier sur des éléments de réponse situés sur le promoteur de *DUSP5*. Nous avons également identifié des éléments de réponse pour le facteur de transcription SRF, nommé CArG Box, à proximité des sites de liaison à Elk-1, nommé EBS (Ets binding site). L'interaction entre les facteurs de transcription de la famille TCF, en particulier Elk-1, et le SRF est bien connue, notamment pour d'autres gènes de réponse précoce comme *c-fos*. Le modèle classique connu pour le gène *c-fos* (détaillé dans le chapitre 6 de l'introduction) est celui de la liaison à l'état basal d'un dimère de SRF sur une CArG Box [367]. Suite à la phosphorylation de l'extrémité C-terminale d'un des facteurs de transcription de la famille TCF, ce facteur forme un complexe avec SRF et est ainsi recruté à son élément de réponse [221]. A côté de ce modèle classique, différentes autres modalités d'activation de *c-fos* ont été décrites :

- une liaison de Sap-1 (SRF accessory protein1), un autre des membres de la famille TCF, à son élément de réponse, indépendamment de SRF bien que la coopération entre SRF et Sap1 ait également été rapportée [368].

- une liaison du facteur de transcription SRF, via sa liaison à l'ADN, indépendamment de la liaison du TCF [316].

- une liaison d'un complexe quaternaire comprenant un dimère SRF et 2 molécules Elk-1 [368].

Certains arguments de la littérature laissaient suggérer que DUSP5 pouvait être régulé par le facteur de transcription Elk-1. Lors d'un crible large, visant à identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par Elk-1, Odrowaz et coll. [329] avaient montré une diminution du niveau d'expression de DUSP5 après déplétion de cellules mammaires humaines en Elk-1, par technique d'interférence ARN. De plus, lors d'un CHIP-Seq avec Elk-1, dans ces mêmes cellules, un enrichissement significatif était observé pour une région chromosomique correspondant au gène de *DUSP5*. La région identifiée était néanmoins très à distance du site d'initiation de la transcription, contrairement aux sites EBS que nous avons étudiés. Néanmoins, les modalités de liaison d'un facteur de transcription à l'ADN peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre et selon les conditions de culture [305]. Il est intéressant de noter

que lors de ce CHIP-Seq, sur 2 répétitions de l'expérience, DUSP5 n'avait été identifié qu'une seule fois.

D'autres arguments de la littérature laissaient suggérer que DUSP5 pouvait être régulé par SRF, via la voie MAL/MRTF (Myocardin-related transcription factor). L'actine G peut réguler des co-activateurs transcriptionnels nommés MAL/MRTF. Leur activation dépend de Rho GTPases et de modification dynamique de l'actine. MAL contient des motifs de liaison à l'actine G. Sous l'influence de stimulus activant les Rho GTPases, comme le sérum, MAL est relâché d'un complexe inhibiteur avec l'actine G monomérique, se lie à SRF et active fortement l'expression de ses gènes cibles [332]. Le niveau d'expression de DUSP5 augmentait d'un facteur 8, après traitement de cellules NIH3T3 par de la cytochalasine D responsable d'une activation de MAL suite à sa libération du complexe que MAL forme avec l'actine G. D'autre part, dans un crible large, visant à identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par la voie MEK-ERK ou la voie PI3K, la région promotrice de *DUSP5* était identifiée comme significativement enrichie lors d'un CHIP avec un anticorps anti-SRF [202].

Nous avons proposé un modèle dans lequel SRF serait lié constitutivement au promoteur de *DUSP5* ; après activation de la voie MEK-ERK, Elk-1 est phosphorylé et pourrait former un complexe ternaire avec SRF lié à l'ADN, sans nécessairement liaison de Elk-1 sur son élément de réponse EBS. Ce modèle permet d'expliquer la persistance d'une activation de l'expression de DUSP5 dans nos expériences de mesure d'activité luciférase après stimulation par le sérum ou par le vecteur constitutivement actif Elk-VP16 lorsque les éléments de réponse EBS sont mutés. Une hypothèse alternative pouvant expliquer cette activation, pourrait être un relais par la voie MAL/MRTF/actine-G, comme précédemment décrit pour *c-fos* [332, 369]. En effet, la mutation de l'élément de réponse EBS dans le promoteur *c-fos* activait la régulation de l'expression de ce gène par la voie MAL/MRTF plutôt que par la voie ERK [332, 369].

Conclusion et perspectives

En conclusion, nos travaux suggèrent que le degré d'activation de la voie MAPK dépend de l'anomalie moléculaire présente au sein d'un CPT. Ainsi, il semble que les CPT porteurs d'une mutation de type B-RAF^{V600E} aient une activation plus importante de la voie MAPK par rapport aux CPT n'ayant pas cette anomalie moléculaire. Les données *in vitro* montrent que les niveaux de phosphorylation de ERK sont relativement constants quelle que soit l'anomalie moléculaire survenant au niveau de la voie MAPK, du fait de la boucle de rétrocontrôle négatif exercée par les phosphatases (DUSPs). En revanche, les niveaux de phosphorylation de MEK (*in vitro* également) semblent plus importants dans les modèles avec mutation de B-RAF. Cette donnée reste à étudier plus finement dans les tumeurs humaines, avec des techniques quantitatives plus appropriées que le simple Western blot ou l'immunohistochimie. L'analyse fine des niveaux de p-MEK et p-ERK, est maintenant envisageable par les techniques récentes de type puces protéiques en phase réverse ou de type Nanopro®. Il serait intéressant de corréler les niveaux de phosphorylation de ces deux kinases au sein de CPT humains caractérisés sur le plan des anomalies moléculaires.

D'un point de vue thérapeutique, cette notion d'activation différentielle de la voie des MAPK en fonction de l'anomalie moléculaire présente, semble très importante. En effet des données *in vitro*, suggérant que la ré-expression du symporteur NIS dans des CPT réfractaires à l'irathérapie nécessite une inhibition puissante de la voie MAPK, laissent anticiper une moindre efficacité des thérapies ciblant cette voie dans les CPT avec mutation B-RAF^{V600E}. Les résultats de l'étude de Ho et coll., conduite chez des patients métastatiques réfractaires à l'irathérapie, avec le selumetinib (inhibiteur de MEK), vont dans le sens d'une récupération du captage de l'iode plus facile pour les tumeurs mutées pour RAS par rapport à celles mutées pour B-RAF [184]. Compte tenu de ces données, il pourrait être intéressant pour les cancers mutés pour B-RAF d'envisager des combinaisons d'inhibiteurs de tyrosine kinase (par exemple un inhibiteur de B-RAF^{V600E} et un inhibiteur de MEK), afin d'obtenir une inhibition profonde de la voie MAPK permettant une ré-expression du NIS et ainsi un recaptage de l'iode par des lésions initialement réfractaires.

Nos données concernant les phosphatases DUSP5 et DUSP6, en font des marqueurs d'activation de la voie MAPK dans notre modèle tumoral et non des gènes suppresseur de

tumeurs. Nous nous sommes focalisés sur la régulation de DUSP5 pour décortiquer les mécanismes de sa régulation transcriptionnelle par la voie des MAPK. DUSP5 semble être un bon exemple de gène de réponse précoce activé par la voie MAPK, grâce à des facteurs de transcription cible de p-ERK, comme le facteur Elk-1. La régulation positive de DUSP5 et DUSP6 par la voie MAPK participe à un mécanisme de rétrocontrôle négatif permettant de réguler finement les niveaux de p-ERK. L'étude de la voie des MAPK dans de nombreux modèles cellulaires a montré que la régulation fine des niveaux de p-ERK est un élément déterminant pour le devenir cellulaire : prolifération *versus* apoptose. Nos travaux dans les lignées de cancers thyroïdiens suggèrent fortement l'existence d'un phénomène de compensation au sein de la famille des DUSPs, après l'inactivation de l'une ou des deux. Ceci explique les niveaux de p-ERK constants, avec l'absence de conséquence délétère en termes de prolifération. Pour mieux cerner les acteurs impliqués dans ce phénomène de compensation, et comprendre leur part respective sur les niveaux p-ERK, une analyse exhaustive des phosphatases pourrait être intéressante. A ce titre, une analyse transcriptomique des modifications d'expression des phosphatases contrôlant le niveau de p-ERK, lorsqu'une ou plusieurs d'entre elles sont inactivées dans des lignées de cancer thyroïdien pourrait être envisagée.

Bibliographie

1. Leenhardt, L. and P. Grosclaude, *[Epidemiology of thyroid carcinoma over the world].* Ann Endocrinol (Paris), 2011. **72**(2): p. 136-48.
2. Nikiforova, M.N. and Y.E. Nikiforov, *Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis.* Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(1): p. 83-95.
3. Davies, L. and H.G. Welch, *Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002.* Jama, 2006. **295**(18): p. 2164-7.
4. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova, *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer.* Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(10): p. 569-80.
5. Mazzaferri, E.L. and R.T. Kloos, *Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(4): p. 1447-63.
6. Smallridge, R.C. and J.A. Copland, *Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies.* Clin Oncol (R Coll Radiol), 2010. **22**(6): p. 486-97.
7. Xing, M., *Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer.* Nat Rev Cancer, 2013. **13**(3): p. 184-99.
8. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
9. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation.* Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
10. Neuzillet, C., et al., *MEK in cancer and cancer therapy.* Pharmacol Ther, 2014. **141**(2): p. 160-71.
11. Jhiang, S.M., et al., *Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas.* Endocrinology, 1996. **137**(1): p. 375-8.
12. Sagartz, J.E., et al., *Thyroid-stimulating hormone promotes growth of thyroid carcinomas in transgenic mice with targeted expression of the ret/PTC1 oncogene.* Lab Invest, 1997. **76**(3): p. 307-18.
13. Santoro, M., et al., *Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice.* Oncogene, 1996. **12**(8): p. 1821-6.
14. La Perle, K.M., S.M. Jhiang, and C.C. Capen, *Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in ret/PTC1-induced thyroid carcinomas.* Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 671-7.
15. Ciampi, R., et al., *HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma.* Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(2): p. 445-52.
16. Bounacer, A., et al., *High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation.* Oncogene, 1997. **15**(11): p. 1263-73.

17. Rabes, H.M., et al., *Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 1093-103.
18. Nikiforov, Y.E., *RET/PTC rearrangement in thyroid tumors.* Endocr Pathol, 2002. **13**(1): p. 3-16.
19. Karga, H., et al., *Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms.* J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(4): p. 832-6.
20. Esapa, C.T., et al., *Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia.* Clin Endocrinol (Oxf), 1999. **50**(4): p. 529-35.
21. Namba, H., S.A. Rubin, and J.A. Fagin, *Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis.* Mol Endocrinol, 1990. **4**(10): p. 1474-9.
22. Ricarte-Filho, J.C., et al., *Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers.* J Clin Invest, 2013. **123**(11): p. 4935-44.
23. Ciampi, R., et al., *Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer.* J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 94-101.
24. Chiosea, S., et al., *A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma.* Endocr Pathol, 2009. **20**(2): p. 122-6.
25. Hou, P., D. Liu, and M. Xing, *Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer.* Cell Cycle, 2007. **6**(3): p. 377-9.
26. Franco, A.T., et al., *Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1615-20.
27. Charles, R.P., et al., *Mutationally Activated BRAFV600E Elicits Papillary Thyroid Cancer in the Adult Mouse.* Cancer Res, 2011.
28. Knauf, J.A., et al., *Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation.* Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4238-45.
29. Chakravarty, D., et al., *Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation.* J Clin Invest, 2011. **121**(12): p. 4700-11.
30. Xing, M., *BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications.* Endocr Rev, 2007. **28**(7): p. 742-62.
31. Xing, M., et al., *Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer.* JAMA, 2013. **309**(14): p. 1493-501.
32. Greco, A., C. Miranda, and M.A. Pierotti, *Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **321**(1): p. 44-9.
33. Russell, J.P., et al., *The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium.* Oncogene, 2000. **19**(50): p. 5729-35.
34. Nikiforova, M.N., et al., *Targeted Next-Generation Sequencing Panel (ThyroSeq) for Detection of Mutations in Thyroid Cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(11): p. E1852-60.
35. Kelly, L.M., et al., *Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014.
36. Perot, G., et al., *Identification of a recurrent STRN/ALK fusion in thyroid carcinomas.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87170.

37. Godbert, Y., et al., *Remarkable Response to Crizotinib in Woman With Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged Anaplastic Thyroid Carcinoma.* J Clin Oncol, 2014.
38. Hamatani, K., et al., *Rearranged anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in adult-onset papillary thyroid cancer amongst atomic bomb survivors.* Thyroid, 2012. **22**(11): p. 1153-9.
39. Demeure, M.J., et al., *Whole-genome sequencing of an aggressive BRAF wild-type papillary thyroid cancer identified EML4-ALK translocation as a therapeutic target.* World J Surg, 2014. **38**(6): p. 1296-305.
40. Wang, Y.L., et al., *Incidentally simultaneous occurrence of RET/PTC, H4-PTEN and BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma.* Cancer Lett, 2008. **263**(1): p. 44-52.
41. Guerra, A., et al., *Concomitant BRAF(V600E) mutation and RET/PTC rearrangement is a frequent occurrence in papillary thyroid carcinoma.* Thyroid, 2014. **24**(2): p. 254-9.
42. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 180-6.
43. Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais, *The RAF proteins take centre stage.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 875-85.
44. Ramos, J.W., *The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(12): p. 2707-19.
45. Emuss, V., et al., *Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF.* Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9719-26.
46. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
47. Wan, P.T., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.* Cell, 2004. **116**(6): p. 855-67.
48. Garnett, M.J. and R. Marais, *Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene.* Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 313-9.
49. Rahman, M.A., et al., *B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer.* Exp Mol Pathol, 2013. **95**(3): p. 336-42.
50. Imielinski, M., et al., *Oncogenic and sorafenib-sensitive ARAF mutations in lung adenocarcinoma.* J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1582-6.
51. Palanisamy, N., et al., *Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma.* Nat Med, 2010. **16**(7): p. 793-8.
52. Kumagai, A., et al., *No evidence of ARAF, CRAF and MET mutations in BRAFT1799A negative human papillary thyroid carcinoma.* Endocr J, 2006. **53**(5): p. 615-20.
53. Nelson, D.S., et al., *Somatic activating ARAF mutations in Langerhans cell histiocytosis.* Blood, 2014. **123**(20): p. 3152-5.
54. Jones, D.T., et al., *Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma.* Oncogene, 2009. **28**(20): p. 2119-23.
55. Dhomen, N. and R. Marais, *BRAF signaling and targeted therapies in melanoma.* Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 529-45, ix.
56. Xing, M., *BRAF mutation in thyroid cancer.* Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(2): p. 245-62.

57. Tiacci, E., et al., *BRAF mutations in hairy-cell leukemia.* N Engl J Med, 2011. **364**(24): p. 2305-15.
58. Thomas, R.K., et al., *High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer.* Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 347-51.
59. Schultz, N.A., et al., *Frequencies and prognostic role of KRAS and BRAF mutations in patients with localized pancreatic and ampullary adenocarcinomas.* Pancreas, 2012. **41**(5): p. 759-66.
60. Emile, J.F., et al., *BRAF mutations in Erdheim-Chester disease.* J Clin Oncol, 2013. **31**(3): p. 398.
61. Haroche, J., et al., *Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation.* Blood, 2013. **121**(9): p. 1495-500.
62. Pujals, A., et al., *BRAF V600E mutations in bile duct adenomas.* Hepatology, 2014.
63. Brastianos, P.K., et al., *Exome sequencing identifies BRAF mutations in papillary craniopharyngiomas.* Nat Genet, 2014. **46**(2): p. 161-5.
64. Schonleben, F., et al., *Molecular analysis of PIK3CA, BRAF, and RAS oncogenes in periampullary and ampullary adenomas and carcinomas.* J Gastrointest Surg, 2009. **13**(8): p. 1510-6.
65. Hutchinson, K.E., et al., *BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(24): p. 6696-702.
66. Beltran, H., et al., *Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity.* Eur Urol, 2013. **63**(5): p. 920-6.
67. Holderfield, M., et al., *Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond.* Nat Rev Cancer, 2014. **14**(7): p. 455-67.
68. Gunson, T.H., N. Hashim, and G.R. Sharpe, *Generalized lentiginosis, short stature, and multiple cutaneous nodules--quiz case. LEOPARD syndrome (LS) associated with multiple granular cell tumors (GCTs).* Arch Dermatol, 2010. **146**(3): p. 337-42.
69. Sarkozy, A., et al., *Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum.* Hum Mutat, 2009. **30**(4): p. 695-702.
70. Koudova, M., E. Seemanova, and M. Zenker, *Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence.* Eur J Med Genet, 2009. **52**(5): p. 337-40.
71. Roberts, A.E., et al., *Noonan syndrome.* Lancet, 2013. **381**(9863): p. 333-42.
72. Li, C., et al., *BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis.* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(12): p. 4559-70.
73. Xing, M., *Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **321**(1): p. 86-93.
74. Xing, M., et al., *BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6373-9.
75. Abubaker, J., et al., *Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(2): p. 611-8.

76. Elisei, R., et al., *BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 3943-9.
77. Kim, T.Y., et al., *The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma.* Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **65**(3): p. 364-8.
78. Kim, S.K., et al., *Clinical and pathological features and the BRAF(V600E) mutation in patients with papillary thyroid carcinoma with and without concurrent Hashimoto thyroiditis.* Thyroid, 2009. **19**(2): p. 137-41.
79. Kebebew, E., et al., *The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer.* Ann Surg, 2007. **246**(3): p. 466-70; discussion 470-1.
80. Riesco-Eizaguirre, G., et al., *The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na+/I- targeting to the membrane.* Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 257-69.
81. Sclafani, F., et al., *BRAF mutations in melanoma and colorectal cancer: a single oncogenic mutation with different tumour phenotypes and clinical implications.* Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **87**(1): p. 55-68.
82. Gallagher, S.J., et al., *p16INK4a expression and absence of activated B-RAF are independent predictors of chemosensitivity in melanoma tumors.* Neoplasia, 2008. **10**(11): p. 1231-9.
83. Kumar, R., et al., *BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3362-8.
84. Chang, D.Z., et al., *Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma.* J Transl Med, 2004. **2**(1): p. 46.
85. Houben, R., et al., *Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis.* J Carcinog, 2004. **3**(1): p. 6.
86. De Roock, W., et al., *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.* Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 753-62.
87. Laurent-Puig, P., et al., *Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer.* J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5924-30.
88. Richman, S.D., et al., *KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial.* J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5931-7.
89. Ince, W.L., et al., *Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab.* J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(13): p. 981-9.
90. Durante, C., et al., *BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(7): p. 2840-3.
91. Riesco-Eizaguirre, G., et al., *The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer.* Cancer Res, 2009. **69**(21): p. 8317-25.
92. Liu, D., et al., *Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1341-9.

93. Arturi, F., et al., *Expression pattern of the pendrin and sodium/iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors.* Eur J Endocrinol, 2001. **145**(2): p. 129-35.

94. Ringel, M.D., et al., *Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer.* Mod Pathol, 2001. **14**(4): p. 289-96.

95. Romei, C., et al., *BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer.* Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(2): p. 511-20.

96. Mesa, C., Jr., et al., *Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling.* Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6521-9.

97. Baquero, P., et al., *(V600E)BRAF promotes invasiveness of thyroid cancer cells by decreasing E-cadherin expression through a Snail-dependent mechanism.* Cancer Lett, 2013. **335**(1): p. 232-41.

98. Knauf, J.A., et al., *Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling.* Oncogene, 2011. **30**(28): p. 3153-62.

99. Mitsutake, N., et al., *Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2465-73.

100. Xing, M., *Gene methylation in thyroid tumorigenesis.* Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 948-53.

101. Pratilas, C.A., et al., *(V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4519-24.

102. Xu, L., et al., *Spry2 expression correlates with BRAF mutation in thyroid cancer.* Surgery, 2010. **148**(6): p. 1282-7; discussion 1287.

103. Zhang, Z., et al., *Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer.* Endocr Relat Cancer, 2014. **21**(2): p. 161-73.

104. Oler, G. and J.M. Cerutti, *High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes.* Cancer, 2009. **115**(5): p. 972-80.

105. Liu, X., et al., *Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers.* Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(4): p. 603-10.

106. Landa, I., et al., *Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(9): p. E1562-6.

107. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond.* Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 611-22.

108. Liu, X., et al., *TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(6): p. E1130-6.

109. Xing, M., et al., *BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence.* J Clin Oncol, 2014. **32**(25): p. 2718-26.

110. Huang, F.W., et al., *Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma.* Science, 2013. **339**(6122): p. 957-9.

111. Joseph, E.W., et al., *The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14903-8.

112. Xing, F., et al., *Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF.* Oncogene, 2012. **31**(4): p. 446-57.

113. Wilhelm, S., et al., *Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(10): p. 835-44.

114. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.* Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7099-109.

115. Carlomagno, F., et al., *BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(5): p. 326-34.

116. Bollag, G., et al., *Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma.* Nature, 2010. **467**(7315): p. 596-9.

117. Bollag, G., et al., *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer.* Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(11): p. 873-86.

118. Tsai, J., et al., *Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3041-6.

119. King, A.J., et al., *Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e67583.

120. Solit, D.B. and N. Rosen, *Resistance to BRAF inhibition in melanomas.* N Engl J Med, 2011. **364**(8): p. 772-4.

121. Heidorn, S.J., et al., *Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF.* Cell, 2010. **140**(2): p. 209-21.

122. Poulikakos, P.I., et al., *RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF.* Nature, 2010. **464**(7287): p. 427-30.

123. Hatzivassiliou, G., et al., *RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth.* Nature, 2010. **464**(7287): p. 431-5.

124. Lito, P., et al., *Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas.* Cancer Cell, 2012. **22**(5): p. 668-82.

125. Su, F., et al., *RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors.* N Engl J Med, 2012. **366**(3): p. 207-15.

126. Lacouture, M.E., et al., *Induction of cutaneous squamous cell carcinomas by RAF inhibitors: cause for concern?* J Clin Oncol, 2012. **30**(3): p. 329-30.

127. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial.* Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.

128. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.* N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
129. Flaherty, K.T., et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma.* N Engl J Med, 2010. **363**(9): p. 809-19.
130. McArthur, G.A., et al., *Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF and BRAF mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study.* Lancet Oncol, 2014.
131. Sosman, J.A., et al., *Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib.* N Engl J Med, 2012. **366**(8): p. 707-14.
132. Montero-Conde, C., et al., *Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas.* Cancer Discov, 2013. **3**(5): p. 520-33.
133. Kim, K.B., et al., *Clinical responses to vemurafenib in patients with metastatic papillary thyroid cancer harboring BRAF(V600E) mutation.* Thyroid, 2013. **23**(10): p. 1277-83.
134. Dadu, R., et al., *Role of salvage targeted therapy in differentiated thyroid cancer patients who failed first-line sorafenib.* J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(6): p. 2086-94.
135. Rosove, M.H., P.F. Peddi, and J.A. Glaspy, *BRAF V600E inhibition in anaplastic thyroid cancer.* N Engl J Med, 2013. **368**(7): p. 684-5.
136. Falchook, G.S., et al., *Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial.* Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. 782-9.
137. Nucera, C., et al., *Targeting BRAFV600E with PLX4720 displays potent antimigratory and anti-invasive activity in preclinical models of human thyroid cancer.* Oncologist, 2011. **16**(3): p. 296-309.
138. Abdel-Wahab, O., et al., *Efficacy of intermittent combined RAF and MEK inhibition in a patient with concurrent BRAF- and NRAS-mutant malignancies.* Cancer Discov, 2014. **4**(5): p. 538-45.
139. Solit, D.B., et al., *BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition.* Nature, 2006. **439**(7074): p. 358-62.
140. Flaherty, K.T., et al., *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma.* N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
141. Salerno, P., et al., *Cytostatic activity of adenosine triphosphate-competitive kinase inhibitors in BRAF mutant thyroid carcinoma cells.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(1): p. 450-5.
142. Hayes, D.N., et al., *Phase II efficacy and pharmacogenomic study of Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in iodine-131 refractory papillary thyroid carcinoma with or without follicular elements.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(7): p. 2056-65.
143. Bucheit, A.D. and M.A. Davies, *Emerging insights into resistance to BRAF inhibitors in melanoma.* Biochem Pharmacol, 2014. **87**(3): p. 381-9.
144. Kopetz, S., *PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors*, 2010, J. Clin. Oncol.
145. Prahallad, A., et al., *Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR.* Nature, 2012. **483**(7387): p. 100-3.

146. Planchard, D., *Interim results of phase II study BRF113928 of dabrafenib in BRAF V600E mutation–positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients.*, 2013, J. Clin. Oncol.

147. Nazarian, R., et al., *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation.* Nature, 2010. **468**(7326): p. 973-7.

148. Girotti, M.R., et al., *Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma.* Cancer Discov, 2013. **3**(2): p. 158-67.

149. Sun, C., et al., *Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma.* Nature, 2014. **508**(7494): p. 118-22.

150. Straussman, R., et al., *Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion.* Nature, 2012. **487**(7408): p. 500-4.

151. Villanueva, J., et al., *Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K.* Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 683-95.

152. Wilson, T.R., et al., *Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors.* Nature, 2012. **487**(7408): p. 505-9.

153. Gibney, G.T. and K.S. Smalley, *An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance.* Cancer Discov, 2013. **3**(3): p. 260-3.

154. Whittaker, S.R., et al., *A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition.* Cancer Discov, 2013. **3**(3): p. 350-62.

155. Maertens, O., et al., *Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis.* Cancer Discov, 2013. **3**(3): p. 338-49.

156. Poulikakos, P.I., et al., *RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E).* Nature, 2011. **480**(7377): p. 387-90.

157. Johannessen, C.M., et al., *COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation.* Nature, 2010. **468**(7326): p. 968-72.

158. Shi, H., et al., *Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 724.

159. Montagut, C., et al., *Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma.* Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4853-61.

160. Solit, D.B. and N. Rosen, *Towards a unified model of RAF inhibitor resistance.* Cancer Discov, 2014. **4**(1): p. 27-30.

161. Antony, R., et al., *C-RAF mutations confer resistance to RAF inhibitors.* Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4840-51.

162. Marusiak, A.A., et al., *Mixed lineage kinases activate MEK independently of RAF to mediate resistance to RAF inhibitors.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 3901.

163. Wagle, N., et al., *Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling.* J Clin Oncol, 2011. **29**(22): p. 3085-96.

164. Van Allen, E.M., et al., *The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma.* Cancer Discov, 2014. **4**(1): p. 94-109.

165. Wagle, N., et al., *MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition.* Cancer Discov, 2014. **4**(1): p. 61-8.

166. Shi, H., et al., *Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors.* Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 414-24.

167. Trunzer, K., et al., *Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma.* J Clin Oncol, 2013. **31**(14): p. 1767-74.

168. Watson, I.R., et al., *The RAC1 P29S Hotspot Mutation in Melanoma Confers Resistance to Pharmacological Inhibition of RAF.* Cancer Res, 2014.

169. Boussemart, L., et al., *eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies.* Nature, 2014.

170. Lito, P., N. Rosen, and D.B. Solit, *Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors.* Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1401-9.

171. Corcoran, R.B., et al., *EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib.* Cancer Discov, 2012. **2**(3): p. 227-35.

172. Flaherty, K.T., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations.* N Engl J Med, 2012. **367**(18): p. 1694-703.

173. Nissan, M.H., N. Rosen, and D.B. Solit, *ERK pathway inhibitors: how low should we go?* Cancer Discov, 2013. **3**(7): p. 719-21.

174. Cheng, H., et al., *Identification and optimization of new dual inhibitors of B-Raf and epidermal growth factor receptor kinases for overcoming resistance against vemurafenib.* J Med Chem, 2014. **57**(6): p. 2692-703.

175. Hartsough, E., Y. Shao, and A.E. Aplin, *Resistance to RAF inhibitors revisited.* J Invest Dermatol, 2014. **134**(2): p. 319-25.

176. Morris, E.J., et al., *Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors.* Cancer Discov, 2013. **3**(7): p. 742-50.

177. Ishii, N., et al., *Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity.* Cancer Res, 2013. **73**(13): p. 4050-60.

178. Das Thakur, M., et al., *Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance.* Nature, 2013. **494**(7436): p. 251-5.

179. Suda, K. and T. Mitsudomi, *Unintentional weakness of cancers: the MEK-ERK pathway as a double-edged sword.* Mol Cancer Res, 2013. **11**(10): p. 1125-8.

180. Hoftijzer, H., et al., *Beneficial effects of sorafenib on tumor progression, but not on radioiodine uptake, in patients with differentiated thyroid carcinoma.* Eur J Endocrinol, 2009. **161**(6): p. 923-31.

181. Coelho, S.M., et al., *Retinoic acid in patients with radioiodine non-responsive thyroid carcinoma.* J Endocrinol Invest, 2004. **27**(4): p. 334-9.

182. Simon, D., et al., *Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. **29**(6): p. 775-82.

183. Handkiewicz-Junak, D., et al., *13-cis-retinoic acid re-differentiation therapy and recombinant human thyrotropin-aided radioiodine treatment of non-Functional metastatic thyroid cancer: a single-center, 53-patient phase 2 study.* Thyroid Res, 2009. **2**(1): p. 8.

184. Ho, A.L., et al., *Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer.* N Engl J Med, 2013. **368**(7): p. 623-32.

185. Lloyd, A.C., *Distinct functions for ERKs?* J Biol, 2006. **5**(5): p. 13.

186. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 827-37.

187. Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh, *MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation.* Gene, 2013. **513**(1): p. 1-13.

188. Caunt, C.J., et al., *Spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases.* J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26612-23.

189. Kim, H.J. and D. Bar-Sagi, *Modulation of signalling by Sprouty: a developing story.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 441-50.

190. Dhillon, A.S., et al., *Phosphatase and feedback regulation of Raf-1 signaling.* Cell Cycle, 2007. **6**(1): p. 3-7.

191. Brondello, J.M., J. Pouyssegur, and F.R. McKenzie, *Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation.* Science, 1999. **286**(5449): p. 2514-7.

192. Caunt, C.J. and S.M. Keyse, *Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling.* FEBS J, 2013. **280**(2): p. 489-504.

193. Camps, M., A. Nichols, and S. Arkinstall, *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function.* FASEB J, 2000. **14**(1): p. 6-16.

194. Owens, D.M. and S.M. Keyse, *Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3203-13.

195. Bermudez, O., G. Pages, and C. Gimond, *The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer.* Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(2): p. C189-202.

196. Patterson, K.I., et al., *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets.* Biochem J, 2009. **418**(3): p. 475-89.

197. Mandl, M., D.N. Slack, and S.M. Keyse, *Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1830-45.

198. Giordano, T.J., et al., *Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis.* Oncogene, 2005. **24**(44): p. 6646-56.

199. Kucharska, A., et al., *Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK.* Cell Signal, 2009. **21**(12): p. 1794-805.

200. Nunes-Xavier, C.E., et al., *Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester.* J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26417-30.

201. Zhang, Z., et al., *Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells.* Carcinogenesis, 2010. **31**(4): p. 577-86.

202. Tullai, J.W., et al., *Identification of transcription factor binding sites upstream of human genes regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase and MEK/ERK signaling pathways.* J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20167-77.

203. Bellou, S., et al., *VEGF autoregulates its proliferative and migratory ERK1/2 and p38 cascades by enhancing the expression of DUSP1 and DUSP5 phosphatases in endothelial cells.* Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(6): p. C1477-89.

204. Ekerot, M., et al., *Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter.* Biochem J, 2008. **412**(2): p. 287-98.

205. Bermudez, O., et al., *Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia.* J Cell Physiol, 2011. **226**(1): p. 276-84.

206. Zeliadt, N.A., L.J. Mauro, and E.V. Wattenberg, *Reciprocal regulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and mitogen activated protein kinase phosphatase-3.* Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **232**(3): p. 408-17.

207. Karlsson, M., et al., *Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal.* J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41882-91.

208. Arkell, R.S., et al., *DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5.* Cell Signal, 2008. **20**(5): p. 836-43.

209. Muda, M., et al., *The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27205-8.

210. Fjeld, C.C., et al., *Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase.* J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 6749-57.

211. Karlsson, M., M. Mandl, and S.M. Keyse, *Spatio-temporal regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling by protein phosphatases.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 842-5.

212. Marchetti, S., et al., *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, 2005. **25**(2): p. 854-64.

213. Bermudez, O., et al., *Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway.* Oncogene, 2008. **27**(26): p. 3685-91.

214. Li, C., et al., *Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development.* Development, 2007. **134**(1): p. 167-76.

215. Maillet, M., et al., *DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility.* J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31246-55.

216. Reffas, S. and W. Schlegel, *Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells.* Biochem J, 2000. **352 Pt 3**: p. 701-8.

217. Eblaghie, M.C., et al., *Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos.* Curr Biol, 2003. **13**(12): p. 1009-18.

218. Smith, T.G., et al., *Negative feedback predominates over cross-regulation to control ERK MAPK activity in response to FGF signalling in embryos.* FEBS Lett, 2006. **580**(17): p. 4242-5.

219. Kawakami, Y., et al., *MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(6): p. 513-9.

220. Furukawa, T., et al., *Feedback regulation of DUSP6 transcription responding to MAPK1 via ETS2 in human cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(1): p. 317-20.

221. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.

222. Piya, S., et al., *DUSP6 is a novel transcriptional target of p53 and regulates p53-mediated apoptosis by modulating expression levels of Bcl-2 family proteins.* FEBS Lett, 2012. **586**(23): p. 4233-40.

223. Tsang, M., et al., *A role for MKP3 in axial patterning of the zebrafish embryo.* Development, 2004. **131**(12): p. 2769-79.

224. Cagnol, S. and J.C. Chambard, *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence.* FEBS J, 2010. **277**(1): p. 2-21.

225. Ueda, K., H. Arakawa, and Y. Nakamura, *Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53.* Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5586-91.

226. Delys, L., et al., *Gene expression and the biological phenotype of papillary thyroid carcinomas.* Oncogene, 2007. **26**(57): p. 7894-903.

227. Huang, Y., et al., *Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15044-9.

228. Jarzab, B., et al., *Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications.* Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1587-97.

229. Weber, F., et al., *Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 2512-21.

230. Lee, J.U., et al., *Dual specificity phosphatase 6 as a predictor of invasiveness in papillary thyroid cancer.* Eur J Endocrinol, 2012. **167**(1): p. 93-101.

231. Hodis, E., et al., *A landscape of driver mutations in melanoma.* Cell, 2012. **150**(2): p. 251-63.

232. Furukawa, T., et al., *Genomic analysis of DUSP6, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer.* Cytogenet Cell Genet, 1998. **82**(3-4): p. 156-9.

233. Pramanik, K., et al., *Dusp-5 and Snrk-1 coordinately function during vascular development and disease.* Blood, 2009. **113**(5): p. 1184-91.

234. Degl'Innocenti, D., et al., *DUSP6/MKP3 is overexpressed in papillary and poorly differentiated thyroid carcinoma and contributes to neoplastic properties of thyroid cancer cells.* Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(1): p. 23-37.

235. Nunes-Xavier, C., et al., *Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment.* Anticancer Agents Med Chem, 2011. **11**(1): p. 109-32.

236. MacKeigan, J.P., L.O. Murphy, and J. Blenis, *Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 591-600.

237. Molina, G., et al., *Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages.* Nat Chem Biol, 2009. **5**(9): p. 680-7.

238. Schories, B., et al., *Downregulation of genes involved in DNA repair and differential expression of transcription regulators and phosphatases precede IgM-induced*

apoptosis in the Burkitt's lymphoma cell line BL60-2. Biochim Biophys Acta, 2004. **1676**(1): p. 83-95.

239. Ortega-Paino, E., et al., *Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by DNA microarrays and RNA interference.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1617-24.
240. Cossa, G., et al., *Differential outcome of MEK1/2 inhibitor-platinum combinations in platinum-sensitive and -resistant ovarian carcinoma cells.* Cancer Lett, 2014.
241. Furukawa, T., et al., *Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas.* Mod Pathol, 2005. **18**(8): p. 1034-42.
242. Furukawa, T., et al., *Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer.* Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1807-15.
243. Xu, S., et al., *Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer.* J Hum Genet, 2005. **50**(4): p. 159-67.
244. Warmka, J.K., L.J. Mauro, and E.V. Wattenberg, *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 is a tumor promoter target in initiated cells that express oncogenic Ras.* J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33085-92.
245. Lucci, M.A., et al., *Expression profile of tyrosine phosphatases in HER2 breast cancer cells and tumors.* Cell Oncol, 2010. **32**(5-6): p. 361-72.
246. Cui, Y., et al., *Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance.* Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5950-9.
247. Croonquist, P.A., et al., *Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2581-92.
248. Bloethner, S., et al., *Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines.* Carcinogenesis, 2005. **26**(7): p. 1224-32.
249. Li, W. and D.W. Melton, *Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance.* Oncogene, 2012. **31**(19): p. 2412-22.
250. Li, W., et al., *Increased levels of DUSP6 phosphatase stimulate tumourigenesis in a molecularly distinct melanoma subtype.* Pigment Cell Melanoma Res, 2012. **25**(2): p. 188-99.
251. Ramnarain, D.B., et al., *Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells.* Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 867-74.
252. Messina, S., et al., *Dual-specificity phosphatase DUSP6 has tumor-promoting properties in human glioblastomas.* Oncogene, 2011. **30**(35): p. 3813-20.
253. Okudela, K., et al., *Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis.* Am J Pathol, 2009. **175**(2): p. 867-81.
254. Lee, H., et al., *Differential expression of DUSP6 with expression of ERK and Ki-67 in non-small cell lung carcinoma.* Pathol Res Pract, 2011. **207**(7): p. 428-32.
255. Okamura, J., et al., *Downregulation of insulin-like growth factor-binding protein 7 in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer.* Cancer Biol Ther, 2012. **13**(3): p. 148-55.

256. Chen, H.Y., et al., *A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2007. **356**(1): p. 11-20.

257. Chan, D.W., et al., *Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells.* Carcinogenesis, 2008. **29**(9): p. 1742-50.

258. Wong, V.C., et al., *Tumor suppressor dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) impairs cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated phenotype.* Int J Cancer, 2012. **130**(1): p. 83-95.

259. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.* Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.

260. Whitmarsh, A.J., *Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1285-98.

261. O'Donnell, A., Z. Odrowaz, and A.D. Sharrocks, *Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know?* Biochem Soc Trans, 2012. **40**(1): p. 58-66.

262. Avraham, R., et al., *EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors.* Sci Signal, 2010. **3**(124): p. ra43.

263. Fagin, J.A., *How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy.* J Endocrinol, 2004. **183**(2): p. 249-56.

264. Kimura, E.T., et al., *High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma.* Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1454-7.

265. Lee, J.H., E.S. Lee, and Y.S. Kim, *Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis.* Cancer, 2007. **110**(1): p. 38-46.

266. O'Neill, C.J., et al., *BRAF(V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer.* Surgery, 2010. **148**(6): p. 1139-45; discussion 1145-6.

267. Lupi, C., et al., *Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(11): p. 4085-90.

268. Zuo, H., et al., *Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma.* Pathol Int, 2007. **57**(1): p. 12-20.

269. Mitsiades, C.S., et al., *Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(3): p. 1070-8.

270. Griffith, O.L., et al., *Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers.* J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5043-51.

271. Shirokawa, J.M., et al., *Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(11): p. 1725-38.

272. Wang, J., et al., *Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels.* Mol Endocrinol, 2003. **17**(7): p. 1425-36.

273. Heldin, N.E., et al., *Coexpression of functionally active receptors for thyrotropin and platelet-derived growth factor in human thyroid carcinoma cells.* Endocrinology, 1991. **129**(4): p. 2187-93.

274. Yano, Y., et al., *Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylcyclase activator.* Oncol Rep, 2007. **18**(2): p. 441-5.

275. Tanaka, J., et al., *Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model.* Virology, 1987. **161**(1): p. 62-72.

276. Chung, S.H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation induces cell cycle arrest via the p53-independent pathway in human anaplastic thyroid cancer cells.* Jpn J Cancer Res, 2002. **93**(12): p. 1358-65.

277. Gioanni, J., et al., *[Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland].* Bull Cancer, 1991. **78**(11): p. 1053-62.

278. Gustavsson, B., et al., *Decreased growth rate and tumour formation of human anaplastic thyroid carcinoma cells transfected with a human thyrotropin receptor cDNA in NMRI nude mice treated with propylthiouracil.* Mol Cell Endocrinol, 1996. **121**(2): p. 143-51.

279. Xu, X., et al., *High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines.* Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4561-7.

280. Kurebayashi, J., et al., *All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2889-96.

281. Lee, J.J., et al., *Molecular cytogenetic profiles of novel and established human anaplastic thyroid carcinoma models.* Thyroid, 2007. **17**(4): p. 289-301.

282. Fabien, N., et al., *Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers.* Cancer, 1994. **73**(8): p. 2206-12.

283. Ito, T., et al., *In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement.* Cancer Res, 1993. **53**(13): p. 2940-3.

284. Schweppe, R.E., et al., *Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11): p. 4331-41.

285. Schweppe, R.E., et al., *Distinct genetic alterations in the mitogen-activated protein kinase pathway dictate sensitivity of thyroid cancer cells to mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibition.* Thyroid, 2009. **19**(8): p. 825-35.

286. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades.* Adv Cancer Res, 1998. **74**: p. 49-139.

287. Friday, B.B., et al., *BRAF V600E disrupts AZD6244-induced abrogation of negative feedback pathways between extracellular signal-regulated kinase and Raf proteins.* Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6145-53.

288. Anderson, N.G., et al., *Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase.* Nature, 1990. **343**(6259): p. 651-3.

289. Sala, E., et al., *BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells.* Mol Cancer Res, 2008. **6**(5): p. 751-9.

290. Long, G.V., et al., *Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma.* J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1239-46.

291. Dultz, L.A., et al., *Clinical and therapeutic implications of Sprouty2 feedback dysregulation in BRAF V600E-mutation-positive papillary thyroid cancer.* Surgery, 2013. **154**(6): p. 1239-44; discussion 1244-5.

292. Krauthammer, M., et al., *Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma.* Nat Genet, 2012. **44**(9): p. 1006-14.

293. Bluthgen, N., et al., *A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts.* FEBS J, 2009. **276**(4): p. 1024-35.

294. Hornberg, J.J., et al., *Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control.* FEBS J, 2005. **272**(1): p. 244-58.

295. Shin, S.H., S.Y. Park, and G.H. Kang, *Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 in gastric cancer by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis.* Am J Pathol, 2013. **182**(4): p. 1275-85.

296. Arora, D., et al., *Expression of protein-tyrosine phosphatases in Acute Myeloid Leukemia cells: FLT3 ITD sustains high levels of DUSP6 expression.* Cell Commun Signal, 2012. **10**(1): p. 19.

297. Dorfman, K., et al., *Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts.* Oncogene, 1996. **13**(5): p. 925-31.

298. Yang, R., S. Piperdi, and R. Gorlick, *Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(20): p. 6396-404.

299. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.

300. Groom, L.A., et al., *Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase.* Embo J, 1996. **15**(14): p. 3621-32.

301. Muda, M., et al., *The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity.* J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9323-9.

302. Keyse, S.M., *Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling.* Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 186-92.

303. Dowd, S., A.A. Sneddon, and S.M. Keyse, *Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases.* J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 22)**: p. 3389-99.

304. Knauf, J.A. and J.A. Fagin, *Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets.* Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 296-303.

305. Hollenhorst, P.C., L.P. McIntosh, and B.J. Graves, *Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 437-71.

306. Foulds, C.E., et al., *Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10954-64.

307. McCarthy, S.A., et al., *Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2401-12.

308. Yang, B.S., et al., *Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 538-47.
309. Vickers, E.R., et al., *Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(23): p. 10340-51.
310. Dalton, S. and R. Treisman, *Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element.* Cell, 1992. **68**(3): p. 597-612.
311. Stritt, C., et al., *Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression.* Nat Neurosci, 2009. **12**(4): p. 418-27.
312. Vanhoutte, P., et al., *Opposing roles of Elk-1 and its brain-specific isoform, short Elk-1, in nerve growth factor-induced PC12 differentiation.* J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5189-96.
313. Bucher, P., *Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences.* J Mol Biol, 1990. **212**(4): p. 563-78.
314. Boros, J., et al., *Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery.* Genome Res, 2009. **19**(11): p. 1963-73.
315. Price, M.A., A.E. Rogers, and R. Treisman, *Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET).* Embo J, 1995. **14**(11): p. 2589-601.
316. Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman, *Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain.* Embo J, 1994. **13**(22): p. 5421-32.
317. Hill, C.S., et al., *Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex.* Cell, 1993. **73**(2): p. 395-406.
318. Pellegrini, L., S. Tan, and T.J. Richmond, *Structure of serum response factor core bound to DNA.* Nature, 1995. **376**(6540): p. 490-8.
319. Withers, D.A. and S.I. Hakomori, *Human alpha (1,3)-fucosyltransferase IV (FUTIV) gene expression is regulated by elk-1 in the U937 cell line.* J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40588-93.
320. Shaw, P.E. and J. Saxton, *Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases.* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1210-26.
321. Janknecht, R. and A. Nordheim, *Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(13): p. 3317-24.
322. Treisman, R., R. Marais, and J. Wynne, *Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins.* EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4631-40.
323. Ling, Y., et al., *Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1.* EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2431-40.
324. Spencer, J.A. and R.P. Misra, *Expression of the serum response factor gene is regulated by serum response factor binding sites.* J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16535-43.
325. Ishibashi, T., et al., *A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock.* J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29897-902.

326. Kwak, S.P. and J.E. Dixon, *Multiple dual specificity protein tyrosine phosphatases are expressed and regulated differentially in liver cell lines.* J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1156-60.

327. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation.* Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 320-8.

328. Kabnick, K.S. and D.E. Housman, *Determinants that contribute to cytoplasmic stability of human c-fos and beta-globin mRNAs are located at several sites in each mRNA.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3244-50.

329. Odrowaz, Z. and A.D. Sharrocks, *ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes.* PLoS Genet, 2012. **8**(5): p. e1002694.

330. Sun, Q., et al., *Defining the mammalian CArGome.* Genome Res, 2006. **16**(2): p. 197-207.

331. Blanchette, M., et al., *Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner.* Genome Res, 2004. **14**(4): p. 708-15.

332. Posern, G. and R. Treisman, *Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction.* Trends Cell Biol, 2006. **16**(11): p. 588-96.

333. Chai, J. and A.S. Tarnawski, *Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing.* J Physiol Pharmacol, 2002. **53**(2): p. 147-57.

334. Konig, H., et al., *Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression.* Embo J, 1989. **8**(9): p. 2559-66.

335. Shaw, P.E., H. Schroter, and A. Nordheim, *The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter.* Cell, 1989. **56**(4): p. 563-72.

336. Hipskind, R.A., et al., *Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF.* Nature, 1991. **354**(6354): p. 531-4.

337. Sharrocks, A.D., *Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture.* Biochem Soc Trans, 2002. **30**(2): p. 1-9.

338. Hassler, M. and T.J. Richmond, *The B-box dominates SAP-1-SRF interactions in the structure of the ternary complex.* EMBO J, 2001. **20**(12): p. 3018-28.

339. Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman, *The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain.* Cell, 1993. **73**(2): p. 381-93.

340. Janknecht, R., et al., *Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases.* EMBO J, 1993. **12**(13): p. 5097-104.

341. Schratt, G., et al., *SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development.* EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1834-44.

342. Norman, C., et al., *Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element.* Cell, 1988. **55**(6): p. 989-1003.

343. Mo, Y., et al., *Crystal structure of a ternary SAP-1/SRF/c-fos SRE DNA complex.* J Mol Biol, 2001. **314**(3): p. 495-506.

344. Shore, P. and A.D. Sharrocks, *The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(5): p. 3283-91.

345. Iyer, D., et al., *Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4516-21.

346. Gille, H., A.D. Sharrocks, and P.E. Shaw, *Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter.* Nature, 1992. **358**(6385): p. 414-7.

347. Rivera, V.M., et al., *A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6260-73.

348. Janknecht, R., et al., *Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties.* EMBO J, 1992. **11**(3): p. 1045-54.

349. Manak, J.R. and R. Prywes, *Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(7): p. 3652-9.

350. Manak, J.R. and R. Prywes, *Phosphorylation of serum response factor by casein kinase II: evidence against a role in growth factor regulation of fos expression.* Oncogene, 1993. **8**(3): p. 703-11.

351. Kasza, A., et al., *The ETS domain transcription factor Elk-1 regulates the expression of its partner protein, SRF.* J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1149-55.

352. O'Donnell, A., S.H. Yang, and A.D. Sharrocks, *MAP kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch.* Mol Cell, 2008. **29**(6): p. 780-5.

353. Yip-Schneider, M.T., A. Lin, and M.S. Marshall, *Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(4): p. 992-7.

354. Lee, E.K., et al., *DNA methylation of MAPK signal-inhibiting genes in papillary thyroid carcinoma.* Anticancer Res, 2013. **33**(11): p. 4833-9.

355. Gaedcke, J., et al., *Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas.* Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(11): p. 1024-34.

356. Sevecka, M., A. Wolf-Yadlin, and G. MacBeath, *Lysate microarrays enable high-throughput, quantitative investigations of cellular signaling.* Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(4): p. M110 005363.

357. Spurrier, B., S. Ramalingam, and S. Nishizuka, *Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis.* Nat Protoc, 2008. **3**(11): p. 1796-808.

358. Roskoski, R., Jr., *MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(1): p. 5-10.

359. Caunt, C.J., et al., *Epidermal growth factor receptor and protein kinase C signaling to ERK2: spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases.* J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6241-52.

360. Lawan, A., et al., *Diversity and specificity of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 functions.* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(2): p. 223-37.

361. Kamata, H., et al., *Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases.* Cell, 2005. **120**(5): p. 649-61.

362. Levinthal, D.J. and D.B. Defranco, *Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons.* J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5875-83.

363. Vogt, A., et al., *A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(2): p. 330-40.

364. Song, M., et al., *NSC-87877, inhibitor of SHP-1/2 PTPs, inhibits dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26).* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(4): p. 491-5.

365. Huang, C.Y. and T.H. Tan, *DUSPs, to MAP kinases and beyond.* Cell Biosci, 2012. **2**(1): p. 24.

366. Li, Q.J., et al., *miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection.* Cell, 2007. **129**(1): p. 147-61.

367. Treisman, R., *Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element.* EMBO J, 1987. **6**(9): p. 2711-7.

368. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *Ets ternary complex transcription factors.* Gene, 2004. **324**: p. 1-14.

369. Murai, K. and R. Treisman, *Interaction of serum response factor (SRF) with the Elk-1 B box inhibits RhoA-actin signaling to SRF and potentiates transcriptional activation by Elk-1.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 7083-92.